



INSTITUTO DE REPRODUCCION ANIMAL CORDOBA



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

---

# **TRATAMIENTOS QUE PROLONGAN EL PROESTRO USANDO ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN VAQUILLONAS DE LECHE**

**Martín Gonzalo Ré**

Tesis

Para Obtener el Grado Académico de  
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados  
Instituto de Reproducción Animal Córdoba

(IRAC)

Córdoba, 2018

**Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en  
vaquillonas de leche.**

**Martín Gonzalo Ré**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Med. Vet. (MSc, PhD) Gabriel A. Bó. ....

**Co-director:** Biol. (Dr.) Mariana Caccia. ....

**Tribunal Examinador de Tesis**

1. Med. Vet. (M.Sc., Dr.) Santiago Callejas. ....

2. Med. Vet. (Esp., M.Sc.) Pablo M. Chesta. ....

3. Med. Vet. (Esp., M.Sc.) Juan Carlos Tschopp. ....

**Presentación formal académica:** Córdoba, 26 de septiembre de 2018.

Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Universidad Nacional de Córdoba.

## AGRADECIMIENTOS

*A Gabriel Bó, por su transmisión de conocimientos, apoyo incondicional y su espíritu superador que contagia. Fundamentalmente por su simpleza y su gran personalidad.*

*A mis padres, mi familia en general, por la enseñanza de los valores básicos de la vida.*

*Al establecimiento agropecuario Don Orlando, empresa familiar, donde cultivamos el trabajo todos los días, y me permitió realizar gran parte de los trabajos de esta tesis.*

*A Diego Racca y Luis Filippi, por permitirme trabajar en el establecimiento El Embrujo.*

**Gracias.**

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis está dedicada a Gabriel y a mi gran familia.*

## RESUMEN

La técnica de IA a tiempo fijo (IATF) se ha transformado en una herramienta que permite estandarizar el manejo reproductivo de los rodeos comerciales de carne y leche. Recientemente se ha demostrado un aumento en las tasas de preñez en vaquillonas de leche con protocolos para IATF que disminuyen el periodo de inserción del dispositivo y prolongan el proestro, llamado protocolos Co-Synch de 5 días. En Sudamérica, los protocolos de IATF utilizan principalmente benzoato de estradiol (EB) y dispositivos con progesterona. El protocolo J-Synch es un protocolo que utiliza estradiol y dispositivos con progesterona, en el cual se reduce el periodo de inserción del dispositivo a 6 días y se alarga el proestro administrando GnRH y haciendo la IATF a las 72 h de la remoción del dispositivo. Este protocolo se presenta como una opción interesante por su practicidad de aplicación y los resultados son muy alentadores en cuanto a las tasas de preñez. El objetivo de esta tesis fue comparar el protocolo J-Synch con el protocolo Co-Synch de 5 días (ambos presentan proestro prolongado) con el protocolo convencional (proestro corto), uno de los más utilizados en Sudamérica. Los resultados obtenidos confirman que los protocolos cortos prolongan el proestro en relación al protocolo convencional; siendo en el caso particular del J-Synch de 21 h más largo. Las tasas de preñez no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los protocolos, sin embargo, en todas las réplicas realizadas los resultados de preñez fueron superiores en el protocolo J-Synch que para el protocolo convencional. El tratamiento J-Synch fue eficiente para sincronizar la ovulación de vaquillonas de leche, además de su practicidad de aplicación con la necesidad de solo tres encierres de los animales para completar el tratamiento.

*Palabras claves: IATF, proestro prolongado, vaquillonas de leche, ovulación.*

## ABSTRACT

The technique of timed artificial insemination (TAI) has been transformed into a tool to standardize the reproductive management of commercial beef and dairy herds. It has recently been shown an increase in pregnancy rates to TAI in dairy heifers using protocols that reduce the period of insertion of the device and prolong the proestrous period, called 5-day Co-Synch protocols. In South America, TAI protocols used mainly estradiol benzoate (EB) and progesterone devices. The J-Synch protocol is a protocol that uses estradiol and progesterone devices in which the device insertion period is reduced to 6 days and the proestrous period is prolonged by administering GnRH and performing the TAI at 72 hours after removal of the progesterone device. This protocol is presented as an interesting option for its practicality of implementation and the results are very encouraging in terms of pregnancy rates. The aim of this thesis was to compare the J-Synch protocol with the 5- day Co-Synch protocol (both have prolonged proestrus) to the conventional protocol (short proestrus), one of the most widely used TAI protocols in South America. The results confirm that the J-Synch protocol presents a proestrus that was, on average, 21 hours longer than the conventional protocol. Although, pregnancy rates were not significantly different between protocols, pregnancy results were higher in the J-Synch protocol than in the conventional protocol in all replicates performed. The J-Synch treatment was efficient to synchronize ovulation in dairy heifers and in addition, its application is practical because it requires to manage the animals only three times.

***Keywords:*** IATF, prolonged proestrus, heifers milk, ovulation.

## TABLA DE CONTENIDOS

Página

Capítulo 1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Población mundial, alimentación y cambio climático.....	1
Implicancias de la Inseminación Artificial y de las biotecnologías reproductivas en bovinos en el mundo y en la Argentina.....	3
Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en bovinos.....	6
Protocolos de sincronización basados en estradiol y progesterona.....	7
Protocolos de sincronización basados en la combinación de prostaglandina F2 $\alpha$ y GnRH. Ovsynch y Co-Synch .....	9
Protocolo Ovsynch y dispositivo intravaginal con progesterona.....	15
Protocolo corto: Co-Synch 5 días (proestro prolongado).....	18
Protocolo corto: J-Synch (proestro prolongado).....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	27
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICO</b> .....	27
Capítulo 2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
<b>METODOLOGÍA GENERAL</b> .....	29
Animales e instalaciones.....	29
Semen utilizado.....	29
Ultrasonografía.....	30
Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales.....	30
Análisis estadístico.....	31
Experimento 1.....	32
Experimento 2.....	33
Experimento 3.....	34
Experimento 4.....	35
Experimento 5.....	35
Capítulo 3. <b>RESULTADOS</b> .....	38
Experimento 1.....	38
Experimento 2.....	43

Experimento 3.....	44
Experimento 4.....	48
Experimento 5.....	49
Capítulo 4. <b>DISCUSIÓN</b> .....	51
Capítulo 5. <b>CONCLUSIONES</b> .....	66
Capítulo 6. <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68

## LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 3.1. Tasa ovulatoria, hora media ( $\pm$ EE) de ovulación, tamaño del folículo preovulatorio (FO) al momento del retiro del DIV y antes de la ovulación, tasa de crecimiento folicular y porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.....	<b>38</b>
Tabla 3.2. Tasa de preñez en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.....	<b>44</b>
Tabla 3.3. Hora media ( $\pm$ EE) de ovulación, tamaño del folículo preovulatorio, tasa de crecimiento folicular y % preñez en vaquillonas Holando Argentino tratadas con el protocolo J-Synch utilizando dispositivos con 0.5 o 1g de P4 y la GnRH administrada a las 56 o 72 h.....	<b>45</b>
Tabla 3.4. Tasa de preñez en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.....	<b>49</b>
Tabla 3.5. Tasa de preñez en vaquillonas Holstein inseminadas con el protocolo J-Synch.....	<b>50</b>
Tabla 3.6. Distribución de celos y Tasa de preñez en las vaquillonas del Grupo J-Synch Sexado DIV 0,5 g. A las 72 h, todos los animales recibieron la dosis de GnRH.....	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 2.1. Diseño experimental para el Experimento 1.....	33
Figura 2.2. Diseño experimental 2 x 2 factorial, 4 grupos, n= 20 por grupo.....	35
Figura 2.3. Diseño experimental para el Experimento 5.....	37
Figura 3.1. Tasa ovulatoria en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.....	39
Figura 3.2 Tamaño folicular promedio (diámetro en mm) en los tres protocolos del experimento 1 luego del retiro del DIV. T1: al momento del retiro del DIV y la aplicación de PGF2 $\alpha$ . T2, T3 y T4: a las 24, 48 y 60 h de la PGF2 $\alpha$ . T5: tamaño del FO registrado antes de cada ovulación.....	39
Figura 3.3. Distribución de las ovulaciones luego del retiro de los dispositivos en el experimento 1.....	40
Figura 3.4. Porcentaje de Vaquillonas preñadas respecto a las ovuladas (P<0.09) en el experimento 1.....	41
Figura 3.5. Distribución de las vaquillonas preñadas según momento de las ovulaciones en el protocolo Convencional en el experimento 1.....	41
Figura 3.6. Distribución de las vaquillonas preñadas según momento de las ovulaciones en el protocolo Co-Synch 5 días en el experimento 1.....	42
Figura 3.7. Distribución de las vaquillonas preñadas según momento de las ovulaciones en el protocolo J-Synch en el experimento 1.....	42
Figura 3.8. Concentración plasmática promedio de progesterona en vaquillonas según tratamiento del experimento 1 (a, b: valores con letras diferentes P<0.01).....	43
Figura 3.9. Tasa ovulatoria del protocolo J-Synch con sus variantes. No hubo diferencias entre los grupos (P>0,5).....	46
Figura 3.10. Concentración plasmática de P4 (ng/ml) según DIV utilizado en el experimento 3. Valores con letras diferentes tienden a diferir (P=0,0896).....	47
Figura 3.11 Concentración plasmática de P4 (ng/ml) en los diferentes grupos del protocolo J-Synch correspondientes al experimento 3.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

**am:** antes del meridiano

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**BE:** Benzoato de

estradiol

**CIDR:** dispositivo de aplicación intravaginal a base de progesterona

**CPE:** Cipionato de estradiol

**CL:** Cuerpo lúteo

**DIB:** Dispositivo intravaginal bovino

**DS:** Desviación estándar

**eCG:** Gonadotropina coriónica equina

**EE:** error estándar

**E-17 $\beta$ :** Estradiol-17 $\beta$

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FIV:** Fertilización *in vitro*

**FD:** Folículo Dominante

**FO:** Folículo ovulatorio

**g:** Gramo

**GEI:** Gases de efecto invernadero

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**h:** hora

**IA:** Inseminación Artificial

**IACD:** Inseminación Artificial a Celo Detectado

**IATF:** Inseminación Artificial a Tiempo Fijo

**IM:** Intramuscular

**LH:** Hormona Luteinizante

**mg:** Miligramos

**ml:** Mililitro

**MHz:** Megahercio

**n:** número de animales

**ng:** Nanogramo

**NU:** Organización de las Naciones Unidas

**P4:** Progesterona

**pm:** después del meridiano

**PGF2 $\alpha$ :** Prostaglandina F2 $\alpha$

**PRID:** dispositivo de aplicación intravaginal a base de progesterona

**RIA:** Radioinmunoanálisis

**RPM:** revoluciones por minuto

**TE:** Transferencia de embriones

**TETF:** Transferencia de embriones a tiempo fijo

**TMR:** Ración total mezclada

### INTRODUCCIÓN

#### **Población mundial, alimentación y cambio climático.**

La población mundial aumenta en forma constante y datos recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), determinan que 795 millones de personas se subalimentan alrededor del planeta cada día, esto significa que, actualmente, un poco más de una de cada nueve personas en el mundo (7200 millones de personas; NU, 2014) no puede consumir alimentos suficientes para llevar una vida activa y saludable (FAO, 2015). En este sentido, los sistemas de producción de alimentos en general, y los de origen animal en particular, deben mejorar su eficiencia para responder a esta demanda creciente, además de lograr sustentabilidad económica y armonía con el ambiente a través del tiempo.

A medida que el cambio climático evoluciona, la agricultura y la alimentación tienen que seguir el mismo camino. El aumento de las temperaturas, los cambios en las precipitaciones, los patrones climáticos erráticos y la prevalencia de plagas y enfermedades causadas por el cambio climático amenazan la productividad agrícola y por tanto perjudican a la seguridad alimentaria mundial.

Al mismo tiempo, la población mundial crece de manera constante y se espera que llegue a 9600 millones de personas en el año 2050. Para cubrir una demanda tan grande, los sistemas agrícolas y alimentarios tendrán que adaptarse a los efectos adversos del cambio climático y hacerse más resilientes, productivos y sostenibles.

La agricultura representa aproximadamente el 14,6% de las emisiones globales de gases de efecto invernadero (GEI), mientras que la ganadería es responsable de casi dos tercios de los GEI agrícolas, y del 78% de las emisiones de metano de origen

agrícolas (FAO, 2016). Los rumiantes son responsables del 30% de las emisiones globales de metano siendo los bovinos responsables del 77% de esas emisiones (14% búfalos y 9% pequeños rumiantes). Sin embargo, es importante remarcar que los rumiantes son esenciales para el sustento de millones de ganaderos y críticos para la salud humana, la seguridad nutricional y la alimentación mundial. La producción de carne y leche bovina en el contexto mundial se lleva a cabo en una amplia gama de sistemas de producción y eficiencias, que incluye desde sistemas extensivos de pastoreo hasta lecherías intensivas o engordes a corral.

Los rumiantes suministran el 51% de todas las proteínas del sector ganadero; de las cuales el 67% es de la leche y el 33% es de la carne (estimación global). El 80 % de la proteína proveniente de especies de rumiantes se deriva del bovino, mientras búfalos, ovejas y cabras contribuyen con el 11%, 5% y 4%, respectivamente.

El aumento en la productividad animal es clave para mejorar los medios de vida rural y la seguridad alimentaria mundial, mientras que se reduce las emisiones de metano entérico por unidad de producto animal.

La mejora de la productividad animal más allá del sistema utilizado puede lograrse con esfuerzo en tres áreas básicas:

- Alimentación y nutrición animal.
- Salud animal.
- Reproducción y mejoramiento genético.

La mejora de la calidad del forraje se puede lograr mediante una mejor gestión de los pastizales y especies de pastos mejorados. El uso de suplementos, preferiblemente disponibles localmente, dietas balanceadas, preparación y preservación adecuada de la alimentación mejorará el suministro de nutrientes, la productividad y la fertilidad de los animales.

Es necesario controlar la incidencia de enfermedades endémicas que limitan la producción y que tienen una serie de resultados negativos, incluyendo la muerte o el sacrificio de animales, afectan la ganancia de peso vivo y la producción de leche, lo que se traduce en menor productividad del sistema y mayor emisiones de GEI por unidad de producto logrado.

La mejora de la eficiencia reproductiva y prolongar la vida útil de los animales aumenta el rendimiento por animal mientras se reducen las emisiones de metano por unidad de producto logrado. El mejoramiento genético es un medio fundamental para aumentar la productividad en los sistemas ganaderos de carne y leche. Además, el mejoramiento genético, puede colaborar para favorecer la adaptación de los animales a condiciones locales, también puede abordar los problemas asociados con la reproducción, vulnerabilidad al estrés, la capacidad de adaptación al cambio climático, y disminuir la incidencia de enfermedades. En este sentido, la gestión de prácticas adecuadas de manejo reproductivo, como puede ser la inseminación artificial (IA) y las demás biotecnologías reproductivas, pueden acelerar las ganancias del mejoramiento genético.

### **Implicancias de la Inseminación Artificial y de las biotecnologías reproductivas en bovinos en el mundo y en la Argentina.**

En los últimos 80 años se han logrado grandes innovaciones en el área de la biotecnología reproductiva animal. La introducción de éstas técnicas a lo largo de la historia ha permitido a los productores y sus empresas de producción animal ser más eficientes y rentables. Entre los años 1930 y 1960, se produjo la introducción de grandes innovaciones para la época, tales como la IA, la criopreservación del semen, la sincronización del estro y la transferencia de embriones (TE). A partir de 1980 y 1990 ocurrió la próxima generación de biotecnologías que revolucionaron el mundo de la TE: la ultrasonografía, el congelamiento y sexado de embriones, la fecundación *in vitro* (FIV), clonación y sexado del semen. Finalmente, en el siglo XXI, asistimos a una innovación más que revolucionó el negocio agrícola: la genómica (Blondin, 2015). La genómica ha cambiado a la industria de la genética bovina. El intervalo de generaciones

ha sido significativamente reducido con la identificación de los próximos animales con genética de élite del sexo masculino y femenino, con la utilización de las tecnologías genómicas. Esto permite acelerar el progreso genético animal y contribuir a la mejora de la productividad de los sistemas ganaderos (Shojaei Saadi *et al.*, 2014).

La actual situación de la ganadería exige a los productores máxima eficiencia reproductiva para garantizar el retorno económico. En este contexto, la optimización de la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen para mejorar las ganancias. A pesar de que la IA es la técnica más apropiada para acelerar el avance genético y el retorno económico de una explotación ganadera, el porcentaje del rodeo bovino incluido en estos esquemas en el mundo continúa siendo bajo (Alberio, 2003; Cutaia *et al.*, 2003). Estimaciones globales correspondientes al año 1998 (Thibiera y Wagner, 2000) reportan la existencia de 648 centros de recolección de semen registrados y 1635 los bancos de semen. Más de 40000 toros (41084) fueron alojados en estos centros y se produjeron 264 millones de dosis de semen (95% congelado: 50% en Europa, 27% en el Lejano Oriente, 16% en América del Norte y 2% en otros orígenes). Respecto a las razas involucradas, se considera que aproximadamente el 75% de las dosis de semen se originó a partir de las razas lecheras *Bos taurus*. Los movimientos internacionales de semen fueron bastante importantes, con cerca de 20 millones de dosis exportadas en 1998. Más del 50% de las inseminaciones se realizaron en el Lejano Oriente con más de 58 millones, 34% en Europa y 10% en América del Norte.

Mientras tanto, la producción de embriones bovinos ha crecido más del 250% entre los años 1997 y 2013. La producción *in vivo* de embriones aumentó significativamente entre 1997 y 2005. Luego, la producción de embriones *in vivo* se estabilizó y ha disminuido ligeramente en los años siguientes hasta 2013. Por otro lado, la producción *in vitro* de embriones viene creciendo significativamente año tras año, a tal punto, que en el año 1997 representaba menos del 5% de los embriones producidos y en 2013, de un total 1.275.874 de embriones logrados, el 42% corresponden a embriones *in vitro*. Es importante notar que durante 2013, América del Sur, principalmente Brasil, produjo el 73% de los embriones por FIV, mientras que en América del Norte produjo el 22%. Curiosamente, de los embriones de FIV transferidos

en América del Norte cerca del 20% fueron congelados, mientras que sólo el 5% de los embriones de FIV transferidos en América del Sur fueron congelados (Blondin, 2015; Baruselli *et al.*, 2015). Algunas de las razones del crecimiento exponencial de la producción de embriones *in vitro* en los últimos años son: mejora sustancial de los medios de cultivos, mayor tolerancia al congelamiento, introducción del uso del semen sexado en la FIV, el advenimiento de la genómica para acortar el intervalo generacional de los animales élites, mayor número de embriones obtenidos por unidad de tiempo respecto al método convencional (Abe *et al.*, 2002; Farin *et al.*, 2006; Garner y Seidel, 2008; Shojaei Saadi *et al.*, 2014).

En Argentina se comercializaron 5.758.381 dosis de semen para IA, de las cuales, corresponden a ganado de leche 3.237.024 de dosis y a ganado de carne 2.521.357 de dosis (CABIA, 2014). Del rodeo lechero de Argentina conformado, por aproximadamente por 2.400.000 vacas, se inseminan artificialmente alrededor del 62% (Brogliatti, 2006). Por otro lado, 3.000.000 de vacas de carne (el 15% del stock de vacas) se incluyeron en programas de IA a tiempo fijo (IATF) (Bó et al., 2016).

Los programas de IATF facilitan la adopción de la IA por parte de establecimientos que no la emplean (Marcantonio, 2007). En muchas ocasiones, estos programas han sido la herramienta que permite el acceso de la IA en establecimientos con escasa estructura tecnológica.

El uso adecuado de la IA, tiene un impacto positivo en cualquier explotación ganadera: permite el uso de toros genéticamente superiores lo que favorece el avance productivo de un rodeo. Uno de los inconvenientes de la técnica es la necesidad de personal capacitado y responsable para la detección de celo (Bavera, 2005).

Muchas estrategias surgen para mejorar la detección de celo, incluyendo detectores de monta con pintura sobre el anca, incremento de la frecuencia de las observaciones visuales, el uso de podómetros que registran automáticamente el incremento de la actividad locomotora o el registro de la monta sobre un sensor de presión. Sin embargo, es todavía la detección de celo un importante problema de

manejo (Cutaia y Bó, 2006).

### **Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en bovinos.**

La IA se ha utilizado ampliamente en el ganado lechero, y se ha convertido en una de las técnicas más importantes para el mejoramiento genético del ganado. Una de las principales razones de la baja tasa de adopción en los rodeos de carne es la detección de celo, que requiere mucho tiempo, mano de obra especializada y está sujeta a errores, especialmente en grandes rebaños.

Los programas de IATF eliminan la necesidad de detección de celo y se convierten en una herramienta para mejorar la eficiencia reproductiva en los rodeos bovinos (Cutaia, 2006). Además, la IATF, permite aumentar significativamente el número de animales inseminados en los establecimientos ganaderos (Brogliatti, 2003) y permiten lograr tasas efectivas de preñez de alrededor del 50% (Cutaia *et al.*, 2003; Bó *et al.*, 2016). Como resultado, la técnica de IATF se ha convertido en una parte integral del manejo reproductivo en muchos rodeos lecheros y la aplicación de estos programas ofrece a los productores de carne la oportunidad de incorporar la IA en sus rodeos (Colazo, 2014).

Se pueden enumerar las siguientes ventajas de la IATF:

- Permite el manejo de grupos de animales sin la necesidad de ocuparse de un animal individual (porque evita la detección de celos).
- Permite estandarizar y programar los servicios. El personal de campo puede destinar más tiempo a otras tareas, como la alimentación de los animales.
- Proyectar el manejo del parto y las pariciones, como así también la profilaxis contra diarreas neonatales y el calostro dirigido de las crías a nacer.
- Mejor exposición para comercializar excedentes de vaquillonas al parir (venta de genética), debido a la uniformidad del grupo de hembras preñadas

el mismo día.

- Favorece el avance genético mediante el uso de toros superiores al inseminar mayor cantidad de animales.
- Permite incorporar la IA a rodeos de cría sin afectar parámetros reproductivos.
- Permite incluir a las vacas con terneros al pie en programas de IA con esquemas simples de trabajo y sin detección de celos.
- Mejoras en los pesos al destete y en la homogeneidad de los lotes.
- Se facilita la implementación de los cruzamientos de razas.
- Permite producir terneros en gran escala y atendiendo las demandas del mercado.

### **Protocolos de sincronización basados en estradiol y progesterona.**

Los tratamientos con estradiol y dispositivos intravaginales con progesterona para sincronizar la emergencia de la onda folicular y la ovulación se usan más comúnmente en América del Sur y México. En muchos países incluyendo EE.UU., Canadá y Europa las formulaciones con estradiol no se encuentran disponibles en el mercado veterinario (Colazo, 2014).

Desde hace tiempo se ha avanzado en el desarrollo de tratamientos para IATF en rodeos bovinos, basados en la utilización de distintas sales de estradiol y progestágenos (Bó *et al.*, 1995a, 1995b; Caccia y Bó, 1998; Moreno *et al.*, 2001). La combinación de estradiol y progesterona suprime la FSH y la liberación de LH y el crecimiento de folículos antrales. En cambio, el estradiol solo (en un momento de bajos niveles de progesterona circulante) estimula la liberación de LH e induce la ovulación de folículos ováricos. Una vez que el estradiol es metabolizado (estradiol-17 $\beta$  muy rápidamente, aunque los ésteres tardan más tiempo), la FSH en circulación aumenta y una nueva onda folicular emerge, en promedio, cuatro días después del tratamiento.

El mecanismo responsable de la supresión del crecimiento folicular inducida por

estrógenos aparentó ser más sistémico que local (Bó *et al.*, 2000) e incluyó la supresión de la FSH (Bó *et al.*, 1994). El estradiol-17 $\beta$  (E-17 $\beta$ ) es el más potente de los principales estrógenos que se encuentra tanto en animales como en humanos. Los ésteres de estradiol (benzoato, valerato y cipionato) poseen absorción retardada después de su administración intramuscular. Dichos ésteres son absorbidos desde el lugar de inyección y el E-17 $\beta$  activo es liberado después de la hidrólisis. El E-17 $\beta$  es la hormona activa que resulta del clivaje de los ésteres de estradiol. Debido a que un éster es una cadena compuesta principalmente de átomos de carbono, la esterificación lleva a la protección contra el ataque metabólico y a la prolongación del efecto. Cuánto más larga es la cadena del éster, más baja la solubilidad en agua y más demorará en absorberse la dosis completa (Mapletoft *et al.*, 2003). Los trabajos realizados para evaluar el comportamiento de los diferentes ésteres de estradiol en la emergencia de una nueva onda folicular, han establecido que dosis bajas de benzoato de estradiol combinado con progesterona tuvo como resultado la emergencia de una onda folicular en  $4,1 \pm 0,1$  días con una variabilidad de 3,5 a 5 días (Moreno *et al.*, 2001), semejante a lo observado con el E-17 $\beta$  ( $4,3 \pm 0,2$  días; Bó *et al.*, 1995a). En cambio, el cipionato de estradiol por tratarse de un éster de cadena más larga respecto al benzoato de estradiol, tiene un efecto más prolongado y tuvo como resultado un intervalo más variable en la emergencia de la onda folicular (2 a 7 días; Thundathil *et al.*, 1997).

Diferentes protocolos de sincronización que utilizan progestágenos, estradiol, GnRH, prostaglandinas y gonadotropina coriónica equina han sido utilizados en vaquillonas (Bó *et al.*, 2003; Lamb *et al.*, 2010; Sá Filho *et al.*, 2010). Se logran índices de concepción de alrededor del 50% aplicando un dispositivo intravaginal con progesterona y una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) al inicio del protocolo, retiro del dispositivo y una dosis de prostaglandina (PGF $2\alpha$ ) a los 7 u 8 días, una dosis de BE de 1 mg 24 h más tarde e IATF a las 48-60 h de retirado el dispositivo (Bó *et al.*, 2003).

El dispositivo con progesterona y el BE inducen la emergencia de una nueva onda folicular (aproximadamente 4 días después; Bó *et al.*, 1994,1995a, 1995b, 1996a, 1996b) y la aplicación de BE 24 h de retirado el dispositivo induce y sincroniza un pico

de LH (aproximadamente 16 a 18 horas después del tratamiento) y la ovulación (aproximadamente 24 a 32 horas más tarde; Martínez *et al.*, 2000, 2005). Alternativamente, 0,5 mg de cipionato de estradiol se puede dar al momento del retiro del dispositivo con progesterona (Colazo *et al.*, 2003), por lo tanto los animales se encierran y pasan por la manga sólo 3 veces, y la IATF se realiza entre 48 y 56 horas más tarde. Numerosos trabajos han confirmado que puede utilizarse el cipionato de estradiol como inductor de la ovulación con la recomendación de utilizar un estrógeno de vida media corta (E-17 $\beta$  o BE) para asegurar una sincronía de la nueva onda folicular (Colazo *et al.*, 2002, 2003 y 2004; Bó *et al.*, 2005; Cutaia *et al.*, 2005; Giacusa *et al.*, 2005; Madero *et al.*, 2007; Cesaroni *et al.*, 2007). Debido a la practicidad de un encierre menos en la operatoria del campo, el protocolo con cipionato se ha difundido rápido y es el más utilizado en ganadería de carne en América del Sur (Bó *et al.*, 2014a).

#### **Protocolos de sincronización basados en la combinación de prostaglandina F2 $\alpha$ y GnRH. Ovsynch y Co-Synch.**

Las implicancias del uso de la GnRH en programas de sincronización de celos se vieron mejor utilizadas con el desarrollo de protocolos de IATF en rodeos lecheros (Pursley *et al.*, 1995) y de carne (Geary *et al.*, 2001) en los EE.UU. y Canadá. El desarrollo del protocolo Ovsynch se basó en la combinación de tratamientos para controlar la dinámica folicular y luteal de manera tal que el tiempo de ovulación pudiera ser sincronizado con precisión.

El protocolo Ovsynch contempla la aplicación de una primera dosis de GnRH con el objetivo de producir la ovulación del folículo dominante y sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular (1,6 días después). El tratamiento con GnRH induce la liberación de LH y la ovulación en animales que contemplen un folículo dominante > 10 mm de diámetro (Thatcher *et al.*, 1989; Macmillan y Thatcher, 1991; Twagiramungu *et al.*, 1994, 1995; Martínez *et al.*, 1999). Al día 7 una dosis de PGF2 $\alpha$ , y el día 9 la segunda inyección de GnRH (36 y 48 horas después de la PGF2 $\alpha$ ) para inducir una ovulación sincrónica, realizando la IATF 16 h posteriores a la segunda GnRH (Thatcher *et al.*, 1993; Twagiramungu *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1995). El rango

horario recomendado para realizar la IATF es entre las 16 y 20 horas después de la segunda GnRH (Pursley *et al.*, 1998).

Desde que el Ovsynch se introdujo en 1995, este protocolo ha sido muy utilizado y sus diferentes modificaciones han originado variantes tales como: Co-Synch, Pre-synch, Heat-synch, Select-synch, Modified Targeted Breeding, y más recientemente, CIDR-synch.

Co-synch es una modificación del protocolo Ovsynch en el que se da el segundo tratamiento con GnRH simultáneamente con la IATF. Los protocolos Co-Synch se utilizan con mayor frecuencia en el ganado de carne, ya que requiere el manejo de los animales solamente 3 veces (en vez de cuatro). La mayoría de los protocolos de IATF, utilizados en Canadá y EE.UU. hoy en día, son variaciones del protocolo Ovsynch (Colazo, 2014).

Los protocolos Ovsynch en el ganado lechero han resultado en tasas de preñez (definida como el número de vacas gestantes sobre el número de vacas tratadas o elegibles) similares a los obtenidos con la IA a celo detectado (Pursley *et al.*, 1997; de la Sota *et al.*, 1998). Sin embargo, la tasa de concepción (definida como el número de vacas preñadas sobre el número de vacas inseminadas) es generalmente menor en las vacas tratadas con Ovsynch porque la ovulación no se sincroniza adecuadamente en aproximadamente un tercio de los animales. Se reportó que en vacas Holstein en lactación tratadas con el Ovsynch el 11% ovuló antes de la IATF, el 12% no respondió al tratamiento con PGF2 $\alpha$  y un 9% no ovularon después del segundo tratamiento con GnRH (Colazo *et al.*, 2009), lo que indica que la tasa de sincronización (definida como el porcentaje de vacas cuyo CL sufrió regresión y ovularon dentro de las 24 horas después de IATF) fue sólo del 68%.

La eficacia de la primera GnRH, varía según la categoría animal y la fase del ciclo estral en que se encuentre el animal (Pursley *et al.*, 1995; Geary *et al.*, 2000; Atkins *et al.*, 2008, 2010; Souza *et al.*, 2009). Este programa de sincronización es más factible utilizarlo en animales con dos ondas foliculares y solo en presencia de un cuerpo lúteo. El Ovsynch en ausencia de CL permite obtener tasas de concepción menores al 15% con

altas tasas de muerte embrionaria (Sterry *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la etapa del ciclo estral en el momento en que se inicia un protocolo Ovsynch afecta las tasas de sincronización y de preñez (Vasconcelos *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000). Vacas en que la primera GnRH se administró entre los días 1 y 4 del ciclo, la tasa de ovulación no fue superior al 23%. Cuando se administra GnRH durante el metaestro (días 1-3), el folículo dominante no ovula, y comienza a sufrir atresia aproximadamente en el momento en que se inyecta la PGF2 $\alpha$ , por lo tanto no responderá a la segunda GnRH.

La mejor ventana del ciclo estral para comenzar un programa Ovsynch es entre los días 5 y 10 del ciclo, debido a la presencia de un folículo dominante mayor a 10 mm lo que explica la tasa de ovulación después de la GnRH del 96% y una sincronización adecuada de la nueva onda folicular.

La tasa de ovulación desciende a 54% si la administración de la GnRH se realiza entre los días 11 y 15 del ciclo. Hasta el día 11, a veces el día 12 del ciclo, es posible que la respuesta ovulatoria sea todavía muy alta, si el folículo dominante de la primera onda es todavía activo.

Entre los días 9-10 del ciclo, se inicia la segunda onda folicular: el folículo dominante de la primera onda entrará en atresia, mientras que sólo los días 14-15, ocurrirá la desviación del segundo folículo dominante.

Si la administración de la primera GnRH ocurre entre los días 16 y 21 del ciclo, la tasa ovulatoria es del 77%, más baja que en la ventana de ciclo estral 5-10 días, a pesar de una configuración folicular similar. Esta diferencia en la respuesta ovulatoria se explica por la diferencia en los niveles de progesterona (el día 16 la progesterona disminuye bruscamente; Vasconcelos *et al.*, 1999).

Sin embargo, en los establecimientos comerciales, el Ovsynch encuentra

justificación simplemente por la presencia de un CL, independiente del diámetro del folículo dominante (Gnemmi y Maraboli, 2014). En la práctica habría un efecto de dilución del factor de riesgo, cuando la muestra es muy grande. En esencia, sólo 3-4 días de todo el ciclo estral no garantizan una respuesta ovulatoria a la primera GnRH (Pursley *et al.*, 2011), lo que explica por qué es posible simplificar el programa en el campo, a través de la selección de los animales sobre la base de la presencia de un CL; en el caso de grupos muy grandes, el efecto de dilución de la muestra, implicaría un efecto negativo mínimo.

La presincronización con PGF2 $\alpha$  ("Presynch") se utiliza comúnmente en los rebaños lecheros para asegurar que las vacas estén en la etapa más apropiada del ciclo estral en el momento de la primera GnRH. El objetivo es que la mayoría de los animales se encuentren entre los días 5 y 12 del ciclo estral. La presincronización con dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 14 días, y la administración de la primera GnRH del Ovsynch a los 12 días después de la segunda PGF2 $\alpha$  aumenta la probabilidad de que un folículo sensible a la liberación de LH esté presente en el momento de la primera GnRH. En dos estudios iniciales (Moreira *et al.*, 2001; El- Zarkouny *et al.*, 2004), la tasa de preñez después de la IATF fue mayor en vacas tratadas con "Presynch - Ovsynch" que en las tratadas sólo con Ovsynch (49 vs. 37 %; 47 vs. 38 %, P < 0.01).

El efecto de variar el intervalo entre la segunda PGF2 $\alpha$  del Presynch y la iniciación de Ovsynch sobre la tasa de preñez en vacas lecheras en lactación ha sido recientemente investigado. Aunque un intervalo de 12 días entre la segunda PGF2 $\alpha$  y la primera GnRH resultó en un mejoramiento de la preñez del 10 al 12%, los productores lecheros han adoptado un intervalo de 14 días, así todos los tratamientos se llevan a cabo en los mismos días de la semana. Recientemente, Galvão *et al.* (2007) demostraron que una reducción en el intervalo entre Presynch y la primera GnRH de 14 a 11 días, incrementó el porcentaje de animales ovulando a la primera GnRH (61 vs. 45%, P < 0.01) y en consecuencia aumentó la tasa de preñez (41 vs. 34%, P < 0.05). En otro estudio (Stevenson, 2011), un intervalo de 12 días desde la última PGF2 $\alpha$  de Presynch y la primera GnRH resultó numéricamente en una mayor tasa de preñez a los 32 días (37%) después de la IATF que un intervalo de 14 (32%) ó 10 (35%) días, o sin presincronización (solamente Ovsynch; 34%). Recientemente se ha comparado la

respuesta ovulatoria a la primera GnRH, la tasa de sincronización y la tasa de preñez en 241 vacas lecheras sometidas al protocolo Ovsynch iniciado ya sea 9 o 12 días después de la segunda PGF2 $\alpha$  del protocolo Presynch (Colazo et al., 2013b). Las respuestas a los tratamientos fueron determinadas por las concentraciones de progesterona plasmática y ultrasonografía transrectal. Se consideraron como “sincronizadas” a las vacas que habían respondido a la PGF2 $\alpha$  (progesterona plasmática < 0.5 ng/ml a la IATF) y ovularon dentro de las 24 horas después de la segunda GnRH. El porcentaje de vacas que ovularon después de la primera GnRH (62%) fue similar entre los dos grupos. Sin embargo, una reducción del intervalo de 12 a 9 días redujo la tasa de sincronización (73 vs. 61%) y la tasa de preñez a los 32 (44 vs. 34%) y 60 (43 vs. 32%) días después de la IATF.

Bello *et al.* (2006) desarrollaron un nuevo protocolo de presincronización que combina PGF2 $\alpha$  y GnRH. El objetivo de este protocolo es aumentar el porcentaje de animales que responden a la primera inyección de GnRH del protocolo Ovsynch incrementando la probabilidad de que un folículo de tamaño ovulatorio se encuentre presente al inicio del Ovsynch. Un total de 137 vacas lecheras en lactación se asignaron a uno de cuatro grupos; un grupo no recibió ningún tratamiento de presincronización antes del Ovsynch (Control), mientras que los otros tres grupos fueron tratados con PGF2 $\alpha$ , seguido 2 días más tarde con la GnRH administrada a 4, 5 o 6 días antes de la primera GnRH del Ovsynch. Los porcentajes de animales que ovularon después de la primera GnRH del Ovsynch fueron 54, 56, 67 y 85%, respectivamente. La preñez a la IATF tendió a ser mayor en aquellos animales en los que se inició el Ovsynch a los 6 días después de la presincronización con PGF2 $\alpha$  y GnRH (“G6G”) que en los animales control (50 vs. 27%,  $P < 0.08$ ). Más recientemente, el protocolo de presincronización G6G se ha evaluado en un mayor número de animales (Ribeiro *et al.*, 2011), resultando en tasas de preñez similares a los reportados por Bello *et al.* (2006). Sin embargo, la tasa de preñez con el protocolo G6G no difirió de la tasa de preñez con el protocolo “Presynch-Ovsynch” (50 vs. 49%, respectivamente; Ribeiro *et al.*, 2011).

Doble Ovsynch es otro protocolo que incluye una presincronización de PGF2 $\alpha$  y GnRH (Souza *et al.*, 2008). Básicamente, el protocolo doble Ovsynch implica dos protocolos Ovsynch seguidos uno del otro, con el tercer tratamiento de GnRH

administrado 7 días después del segundo. En un primer estudio, el protocolo Doble Ovsynch resultó en una tasa de preñez más alta que el protocolo Presynch - Ovsynch en vacas primíparas (65 vs. 45%,  $P < 0.05$ ), pero no en multíparas (38 vs. 40%; Souza *et al.*, 2008). Con el doble Ovsynch, la tasa de preñez, se mejora por dos motivos, una mayor probabilidad de tener un folículo dominante que ovule después de la tercera GnRH, y una más elevada concentración de progesterona circulante antes de la administración de la PGF2 $\alpha$  del segundo Ovsynch (Wiltbank *et al.*, 2012). Astiz y Fargas, (2013) no reportaron diferencias en el porcentaje de preñez entre Doble Ovsynch (36%) y G6G (35%), después de evaluar 7805 primo IA provenientes de 27 hatos lecheros del este de España. Sin embargo, el protocolo Doble Ovsynch resultó en mejores porcentajes de preñez en vacas primíparas (44%) que multíparas (31%).

Cabe destacar, que en general, el Ovsynch no ha sido muy efectivo para sincronizar la ovulación en vaquillonas (Pursley *et al.*, 1997). Esto puede deberse a una duración menor de las ondas foliculares (un recambio folicular más rápido y más ciclos de tres ondas) en vaquillonas que en vacas en lactancia. La reducción en la duración de las ondas foliculares aumenta las posibilidades de administrar la 1 $^{\circ}$  inyección de GnRH sin la presencia de un folículo dominante y/o en el comienzo de una onda folicular antes de que la ovulación pueda ser inducida por la 2 $^{\circ}$  inyección de GnRH (Wiltbank y Haughian, 2003).

También se ha investigado los efectos de la presincronización con PGF2 $\alpha$  antes de un protocolo Co-Synch en la sincronía del estro, y la tasa de preñez después de la IATF en vaquillonas de carne (Small *et al.*, 2010). La presincronización redujo la proporción de vaquillonas en estro antes de la IATF (3 vs. 24%), lo que sugeriría que la presincronización podría ser útil en la aplicación exitosa de los protocolos basados en GnRH en vaquillonas de carne. Sin embargo, la tasa de preñez a la IATF no se vio estadísticamente afectada en este estudio (38 vs. 30%). En otro estudio, se investigó si la presincronización con PGF2 $\alpha$  aumentaría la tasa de preñez en vaquillonas Aberdeen Angus ( $n = 462$ ) sincronizadas con un dispositivo intravaginal que contiene progesterona y 12.5 mg de LH porcina (pLH) o 100 mg de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular y la ovulación (Colazo *et al.*, 2007). La presincronización con PGF2 $\alpha$  tendió a aumentar la tasa de ovulación al primer tratamiento (64 vs. 47%,  $P < 0.09$ ), pero no afectó la tasa de preñez (60 vs. 54%).

Aunque la presincronización con PGF2 $\alpha$  parece ser eficaz en vacas lecheras en lactación, los beneficios en vaquillonas de carne fueron mucho menos evidentes. Sin embargo, se supone que el ganado que no está ciclando no se beneficia de una presincronización con PGF2 $\alpha$ , ya que no tienen un CL, aunque en un estudio reciente se ha reportado que el tratamiento con PGF2 $\alpha$  adelantó la primera ovulación en vaquillonas de carne prepúberes (Pfeifer *et al.*, 2009).

Los dispositivos intravaginales con progesterona permiten un mejor control de la sincronía de la ovulación de vaquillonas durante los protocolos de IATF. La inclusión de un dispositivo con progesterona suprime la ovulación durante los 7 días de presencia del dispositivo, permitiendo por ende, que el 100% de los animales puedan ser destinados a la IATF sin afectar la fertilidad (Rivera *et al.*, 2005). Diversos trabajos han demostrado que se logran mayores tasas de preñez con la adición de dispositivos intravaginales con progesterona a los protocolos Ovsynch y Co-Synch en vacas de leche y carne en anestro y en vaquillonas (Pursley *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2001).

Otra alternativa para mejorar la madurez del folículo y aumentar las concentraciones periovulatoria de estradiol es el uso de gonadotrofina coriónica equina (eCG). La eCG es una glicoproteína de larga vida media, que en la vaca tiene un efecto similar a la FSH y LH y es utilizada para estimular el crecimiento de los folículos en los protocolos de sincronización. Múltiples estudios han demostrado que el tratamiento con eCG incrementa el porcentaje de preñez en vacas con cría con alta incidencia de anestros (Bó *et al.*, 2013). En un estudio en vacas lecheras en anestro, la adicción de 400 UI de eCG en el momento de la inyección de PGF2 $\alpha$ , aumentó el porcentaje de animales preñados en un protocolo utilizando estradiol y dispositivos con progesterona (Bryan *et al.*, 2010) y un protocolo tipo Ovsynch con un dispositivo con progesterona (Bryan *et al.*, 2013).

#### **Protocolo Ovsynch y dispositivo intravaginal con progesterona.**

El-Zarkouny *et al.* (2004) utilizaron 91 vacas en lactación en cada grupo que

fueron tratadas con el protocolo Ovsynch con o sin la adición de un CIDR (CIDR-B, Zoetis, Argentina). Solamente el 44% de las vacas estaban ciclando al inicio del estudio. Los porcentajes de preñez a los 29 (59% vs 36%) y 57 (45% vs 20%) días después de la IATF fueron mayores en las vacas tratadas con Ovsynch + CIDR que en aquellas tratadas con el Ovsynch solo. La fertilidad fue particularmente mejorada en aquellos animales que estaban en anestro al inicio del tratamiento. En un segundo experimento realizado por los mismos autores, la inclusión de un CIDR no mejoró la tasa de preñez (43 vs 32% en Ovsynch y Ovsynch + CIDR, respectivamente) en un rebaño lechero con el 80% de las vacas ciclando al inicio del Ovsynch.

En un experimento más completo, que agrupó rebaños lecheros de 6 Universidades en EE.UU. (Stevenson *et al.*, 2006), el uso de un CIDR en vacas tratadas con Ovsynch aumentó la preñez a la IATF en un 10% (40 vs 50%). La ciclicidad del rebaño al inicio del estudio ni tampoco su interacción con la aplicación de un CIDR afectaron el porcentaje de preñez. Sin embargo, el CIDR aumentó la preñez en animales que tenían niveles de progesterona bajos a la administración de PGF2 $\alpha$  (del 17% al 33% y del 19% al 38% en vacas en anestro y cíclicas, respectivamente). Resultados de este estudio, sugeriría que la adición de un dispositivo intravaginal con progesterona solo aumentaría la fertilidad de vacas en anestro que no responden al primer tratamiento con GnRH. La repuesta ovulatoria a la primera inyección de GnRH es generalmente alta en vacas en anestro, por lo tanto la decisión o no del uso de un dispositivo con progesterona dependerá de cuan profundo es el anestro y de su incidencia en cada rebaño lechero. Este último estudio también indicaría que algunos animales cíclicos se benefician con la suplementación de progesterona. Los mecanismos por los cuales la fertilidad es mejorada en animales cíclicos tratados con Ovsynch + CIDR podría incluir muchas posibilidades. En animales que se inicia el Ovsynch en un diestro tardío, la aplicación de un dispositivo con progesterona prevendría una ovulación temprana y mejoraría la sincronía de la ovulación. El *priming* con progesterona podría también alterar el ambiente folicular incrementando la liberación de estrógeno, mejorando la fertilización y consecuentemente la función luteal. Esta posibilidad es de suma importancia sobre todo en vacas en anestro que no responden a la primera inyección de GnRH. Además, de ejercer un efecto positivo sobre el ambiente uterino que mejoraría el

establecimiento de la gestación (Colazo, 2014).

Uno de los objetivos de la presincronización es también incrementar el número de animales que ovulan después de la primera inyección de GnRH, lo cual resultaría en un CL adicional y aún más progesterona en circulación. Aunque, Folman *et al.* (1990) demostraron que el uso de un dispositivo con progesterona antes de la IA en vacas lecheras aumenta la fertilidad, el efecto fue cuadrático. En otras palabras, el tratamiento con progesterona aumentó la fertilidad solo en vacas que previo al tratamiento tenían baja progesterona plasmática pero redujo la fertilidad en vacas con altas concentraciones plasmáticas de progesterona. Varios estudios (El-Zarkouny *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Galvão *et al.*, 2004; Colazo *et al.*, 2013a) indicarían que el uso de un dispositivo de progesterona no aumentaría significativamente la fertilidad en vacas lactantes cíclicas que fueron presincronizadas antes del inicio del Ovsynch.

En un estudio se ha evaluado el efecto de la administración de un PRID (Sanofi, Canadá) sobre la respuesta ovárica, las concentraciones de progesterona plasmática, y la preñez en 608 vacas Holstein en lactación (Colazo *et al.*, 2013a). Las vacas fueron sometidas a un Ovsynch de 7 días con o sin presincronización. Las vacas que recibieron un PRID durante el protocolo Ovsynch tuvieron una tasa de sincronización superior (78 frente a 71%) debido a que un menor número de vacas tuvieron ovulación prematura (6 frente a 11%) comparado con aquéllas que no recibieron el PRID. La administración de un PRID tendió a aumentar las concentraciones de progesterona plasmática ( $4.4 \pm 0.2$  vs.  $3.9 \pm 0.2$  ng/ml) y aumentó la preñez en vacas sometidas a un Ovsynch sin presincronización (41 vs. 25%). Sin embargo, la adición de un PRID no aumentó significativamente la fertilidad en vacas presincronizadas (40 vs. 42%). Aunque la administración de un PRID en vacas sometidas a un Ovsynch sin presincronización mejoró la tasa general de la sincronización y la preñez, también se observó un aumento en la tasa de preñez cuando sólo las vacas sincronizadas fueron consideradas en el análisis estadístico (52 vs. 38%).

Las vacas cíclicas que son presincronizadas con PGF2 $\alpha$  tendrían un nivel adecuado de progesterona en plasma a la iniciación de Ovsynch. La presincronización

también aumenta la probabilidad de ovulación a la primera inyección de GnRH (46% frente a 28%), lo que daría lugar a un CL adicional y más progesterona circulante. Por lo tanto, la suplementación con progesterona antes de la IATF no beneficiaría a las vacas cíclicas sometidas a un protocolo Presynch-Ovsynch.

En cuanto a las vacas anovulatorias, la inclusión de un PRID aumentó la preñez de 22% a 35%. Sin embargo, la fertilidad dependió de la respuesta ovulatoria a la primera GnRH, siendo muy baja en vacas que no ovularon a la primera GnRH y no difirió significativamente si (9%) o no (4%) recibieron PRID.

### **Protocolo corto: Co-Synch 5 días (proestro prolongado).**

Se dedujo que una mayor tasa de preñez a la IATF podría lograrse si el protocolo Co-Synch + P4 (con un dispositivo con progesterona) era modificado reduciendo el intervalo entre el primer tratamiento de GnRH y la inyección de PGF2 $\alpha$  y retiro del dispositivo con P4 a 5 días, y alargando además el intervalo entre la PGF2 $\alpha$  y la segunda inyección de GnRH junto con la IATF a 3 días (Co-synch + P4 de 5 días; Bridges *et al.*, 2008). Este tratamiento Co-Synch + P4 de 5 días, ha tenido como propósito modificar la duración del proestro, que se define como el período comprendido entre la administración de la PGF2 $\alpha$  hasta la aplicación de GnRH como inductor de la ovulación (Bridges *et al.*, 2008; Rabaglino *et al.*, 2010b; Colazo y Ambrose, 2011; Lima *et al.*, 2013). Esta modificación ha llevado a alcanzar tasas de concepción en vaquillonas de leche de aproximadamente 60% (Rabaglino *et al.*, 2009) y en otros trabajos porcentajes superiores (Bridges *et al.*, 2008). Incluso, este protocolo para IATF se ha utilizado con semen sexado en aproximadamente 1600 vaquillonas, lográndose una tasa de preñez aceptable del 41,5% (Rabaglino *et al.*, 2009). Resultados más recientes reportados por Whittier *et al.* (2013) encontraron también una tasa de preñez significativamente mayor en las vacas tratadas con el Co-Synch de 5 días que en las tratadas con el protocolo Co-Synch de 7 días. Santos *et al.* (2010) también informaron resultados similares en vacas lecheras.

Se ha investigado la influencia de la maduración del folículo ovulatorio en la

fertilidad en vaquillonas de carne (Perry *et al.*, 2005; Mussard *et al.*, 2003 a y b, 2007; Bridges *et al.*, 2010). Una hipótesis era que el diámetro del folículo ovulatorio era el indicador más adecuado de la maduración de dicho folículo y que las vaquillonas inducidas a ovular pequeños folículos tenían menor fertilidad que aquellas inducidas a ovular folículos mayores. En tres experimentos esta hipótesis fue soportada (Mussard *et al.*, 2003 a y b, 2007), pero a medida que se fueron sumando nuevos trabajos, la relación del diámetro del folículo con la tasa de concepción fue inconsistente. Considerando estos experimentos, el predictor más consistente de la tasa de concepción parecía ser la duración del proestro (intervalo del inicio de la regresión del CL con la PGF2 $\alpha$  hasta la administración de GnRH y el consecuente pico preovulatorio de LH; Day, 2015).

Los proestros largos (de 2 a 4 días) se relacionan con mejores tasas de concepción a la IATF, con mayores producciones de estradiol provenientes del folículo dominante y de progesterona luteal en el ciclo subsiguiente, en comparación con los proestros de corta duración (1 día; Bridges *et al.*, 2010). En este trabajo fue demostrado que con un diámetro de folículo ovulatorio constante, la longitud del proestro tuvo una influencia substancial en la tasa de concepción. Se determinó una fuerte relación positiva entre la duración del proestro con el grado de maduración del folículo y con la fertilidad y también que el diámetro del folículo ovulatorio por sí solo no fue un predictor consistente de maduración del folículo.

El efecto del diámetro del folículo ovulatorio en la ovulación inducida por GnRH o en la ovulación espontánea también fue valorado (Perry *et al.*, 2005 y 2007). El diámetro del folículo ovulatorio no influenció la tasa de concepción en vacas. En las vacas que no presentan celo, el diámetro del folículo ovulatorio fue positivamente asociado con la tasa de concepción cuando la ovulación fue inducida con GnRH. Asimismo, si un proestro espontáneo completo ocurre en vacas (confirmado por la exhibición del estro), el diámetro del folículo no tiene efecto en la fertilidad; no obstante, el diámetro del folículo ovulatorio, cuando la ovulación fue inducida con GnRH, influenció la tasa de concepción; con una duración constante del proestro.

Se encontró que las vacas tratadas con el Co-Synch de 7-días que no ovularon

después de la primera de GnRH tuvieron una reducción marginal en el diámetro del folículo dominante ovulatorio y una reducción substancial de las concentraciones de estradiol en el periodo preovulatorio y de progesterona en la fase luteal subsiguiente que las que habían ovulado después de la primera GnRH. Por el contrario, en las vacas tratadas con el Co-Synch de 5 días los parámetros endocrinos y las características foliculares fueron similares entre las vacas que ovularon o no a la primera GnRH (Bridges *et al.*, 2014). En este trabajo se observó una tendencia a presentar un mayor pico de estradiol de los folículos ovulatorios de diámetros similares sometidos al protocolo Co-Synch de 5 días respecto al protocolo de 7 días. Una explicación lógica para esa diferencia de concentraciones de estradiol es el periodo prolongado de estimulación por los pulsos de LH en alta frecuencia del protocolo corto. Además se estima que el retiro anticipado del efecto inhibitorio de la secreción de LH causado por la progesterona (del CI y del dispositivo) también contribuye para el aumento del estradiol sistémico en el protocolo de 5 días. En el protocolo de 5 días en comparación con el protocolo de 7 días, los folículos resultantes de la nueva onda folicular iniciada después de la primera inyección de GnRH serían aproximadamente de 3 a 4 días vs 5 a 6 días de edad, respectivamente, en el momento de la administración de la PGF2 $\alpha$  y la retirada del dispositivo (Day, 2015). Ha sido establecido que folículos dominantes en crecimiento 4 días después de la emergencia de la onda, presentan concentraciones de estradiol intrafoliculares y la capacidad para producir estradiol *in vitro* aumentadas en relación a folículos dominantes no atrésicos en un momento posterior en la onda folicular (Valdez *et al.*, 2005). Aumentando la duración del proestro y removiendo la progesterona en una altura en que la capacidad esteroidogénica del folículo dominante es óptima, puede contribuir con el aumento de las concentraciones máximas de estradiol y/o aumentar el período de concentraciones elevadas durante el proestro. La concentración de estradiol durante el período preovulatorio en bovinos es cada vez más reconocida como un factor clave que influencia la fertilidad (Bridges *et al.*, 2012a, 2013; Atkins *et al.*, 2013; Jinks *et al.*, 2013; Geary *et al.*, 2013).

Además del efecto sobre los folículos, se propone también que una mayor concentración de estradiol durante el periodo preovulatorio, y de progesterona en la fase luteal, se produce una mayor expresión de receptores de progesterona en el epitelio

uterino, favoreciendo la función uterina durante el período pre-implantacional de la preñez (Bridges *et al.*, 2012b). Sin embargo, debido a un intervalo más corto entre la primera GnRH y la inducción de la luteólisis en el protocolo de 5 días, puede ser necesario administrar dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  con 6 a 24 horas de intervalo, para inducir la regresión completa del CL inducido por la GnRH (Kasimanickam *et al.*, 2009). Las investigaciones más recientes realizadas sugieren algunas variaciones cuando los protocolos se utilizan en vacas o vaquillonas de carne y leche. Kasimanickam *et al.* (2012) informaron que las vaquillonas de carne inseminadas a las 56 horas en un protocolo de Co-Synch de 5 días tenían, en promedio, una tasa de preñez a la IA 10,3% más elevada que las vaquillonas inseminadas a las 72 horas. A la inversa, Lima *et al.* (2011) observaron un aumento de la tasa de preñez en vaquillonas lecheras que recibieron la GnRH final al mismo tiempo que la IA a las 72 horas después de la remoción del dispositivo con progesterona en comparación con la administración de GnRH a las 56 horas e IATF 16 horas después. Por lo tanto, se recomienda hacer la GnRH e IATF en vaquillonas de carne a las 56-60 horas y a las vaquillonas de leche a las 72 horas de la remoción del dispositivo con progesterona (Bó *et al.*, 2014 a y b).

A partir de estos trabajos se generaron dos incógnitas a resolver respecto del protocolo de 5 días, por un lado si es necesario o no la aplicación de la primera GnRH y si es suficiente sólo una o dos inyecciones de PGF2 $\alpha$ . Recientemente en un estudio se demostró que solamente se produce un 31,7% de respuesta ovulatoria al primer tratamiento con GnRH, incluso en dicho experimento, no hubo diferencias significativas en la tasa de preñez cuando se comparó el protocolo Co-Synch + P4 de 5 días con y sin la administración de la primera GnRH (Colazo *et al.*, 2011). Además, tanto Lima *et al.* (2011) como Colazo y Ambrose (2011) y Blanco *et al.* (2013) también mostraron que no hubo diferencias en las tasas de preñez entre vaquillonas que recibieron o no una primera GnRH en el momento de la inserción del dispositivo con progesterona.

Por el lado de la PGF2 $\alpha$ , Rabaglino *et al.* (2010b) no encontraron diferencias en las tasas de preñez en vaquillonas lecheras, pero Peterson *et al.* (2011) encontraron una tendencia por mayores tasas de preñez cuando dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  fueron administradas con 6 horas de intervalo en vaquillonas de carne. Para tratar de resolver

estos dilemas se han realizado recientemente dos trabajos en vaquillonas de leche y uno en vaquillonas de carne. Lima *et al.* (2013) realizaron un experimento con 2117 vaquillonas de leche y encontraron las mejores tasas de preñez cuando se colocó GnRH en el día de la inserción del dispositivo con progesterona y dos inyecciones de PGF2 $\alpha$ , con 24 h de intervalo, en el momento de la remoción del dispositivo con progesterona. Las tasas de preñez fueron del 61,7% (439/711) en las que recibieron GnRH en el Día 0 y dos PGF2 $\alpha$  en el Día 5, y 53,0% (376/710) y 55,0% (383/696) en las que no recibieron GnRH en el Día 0 con una o dos dosis de PGF2 $\alpha$  en el Día 5.

Finalmente, Kasimanickam *et al.* (2014) realizaron recientemente un trabajo en el que utilizaron vaquillonas de carne (n=1018) y leche (n=1137) con un diseño 2x2 factorial para determinar los efectos de la GnRH en el Día 0 y una o dos PGF2 $\alpha$  (con 6 horas de intervalo) en el Día 5. En este trabajo las vaquillonas Angus fueron IATF a las 56 horas y las Holstein a las 72 horas de la remoción del dispositivo con progesterona. En las vaquillonas Angus las tasas de preñez fueron mayores cuando se utilizó GnRH en el Día 0, pero no hubo influencia del número de inyecciones de PGF2 $\alpha$  sobre las tasas de preñez. Sin embargo en las Holstein el uso de GnRH en el Día 0 o el uso de una o dos PGF2 $\alpha$  no influyó en las tasas de preñez. Es necesario indicar que en este trabajo las tasas de preñez en las vaquillonas Holstein fueron en general inferiores a las obtenidas con las Angus y sobre todo menores a las obtenidas por Lima *et al.* (2013). Por lo tanto, se podría interpretar que en vaquillonas de carne es necesario usar GnRH en el Día 0 pero no hace falta utilizar dos PGF2 $\alpha$  en el Día 5 (Bó *et al.* 2014b). Mientras tanto, en las vaquillonas de leche existe controversia si es necesario utilizar GnRH en el Día 0 y una o dos PGF2 $\alpha$  en el Día 5. En este sentido, la utilización del protocolo Co-Synch de 5 días (sin la dosis inicial de GnRH y una sola PGF2 $\alpha$ ) ha resultado en tasas de preñez mayores del 60% en vaquillonas de leche cíclicas (Colazo and Ambrose, 2011; Macmillan *et al.*, 2017). Sin embargo, la administración de una dosis inicial de GnRH en el protocolo Co-Synch de 5 días resultó necesaria en vaquillonas de carne acíclicas para optimizar la preñez (López-Helguera *et al.*, 2018). En vacas de carne la mayoría de los resultados indican la necesidad de utilizar dos dosis de PGF2 $\alpha$ , aunque en uno de los trabajos no se encontraron diferencias significativas en vacas tratadas con dos dosis de PGF2 $\alpha$  con 8 horas de intervalo o una dosis doble PGF2 $\alpha$  administrada en el mismo momento

(Bridges *et al.*, 2012b).

Colazo y Ambrose (2011) informaron que más del 75% de las vaquillonas Holstein cíclicas ovularon dentro de las 24 h de la IATF cuando se utilizó el protocolo Co-Synch de 5 días, lo cual tiene implicancias para el uso de semen sexado. El uso de semen sexado se ha informado que resulta en inferiores tasas de preñez respecto al semen convencional, en un 10% (Seidel Jr., 2014). La duración reducida de la fertilidad óptima del semen sexado en el tracto reproductivo femenino significa que los espermatozoides deben depositarse en el útero cerca del momento de la ovulación. Por lo tanto, un protocolo que resulta en la ovulación más cercana al momento de la IATF sería ideal. Aunque un protocolo de IATF no requiere de detección de celo, un aumento de la preñez en vaquillonas de carne y leche ha sido reportado cuando el celo se detectó antes de la inseminación (Colazo and Mapletoft, 2017; Thomas *et al.*, 2017). Macmillan *et al.* (2017) también encontraron una tendencia a una mayor preñez para vaquillonas lecheras detectadas en celo antes de la IATF con semen sexado, que podría deberse a un intervalo más corto y menos variable entre la IA y la ovulación (Colazo y Mapletoft, 2017). La detección del estro requiere trabajo y tiempo, por lo tanto, utilizando ayudas indirectas como pintura o parches se facilita la tarea mientras que se logra una alta sensibilidad y especificidad para determinar el estro (Davis *et al.*, 2014).

Un estudio reciente (Colazo *et al.*, 2018) tuvo como objetivo principal comparar la tasa de preñez en vaquillonas de carne tratadas con el protocolo Co-Synch de 5 días e inseminadas con semen sexado o convencional. En este estudio también se determinó si la expresión del estro antes de la IATF se asocia a un aumento de la preñez, para lo cual se utilizaron parches en la base de la cola como método indirecto de detección de celos. Las vaquillonas (1690) fueron escaneadas por ultrasonografía para determinar la presencia de un CL y normalidad del tracto reproductivo. Las vaquillonas con un CL (n= 1331) recibieron un CIDR-B en el día 0, el día 5 se retiró el CIDR y se aplicó una inyección de PGF2 $\alpha$ , en el día 8 se administró GnRH junto con la IATF. Las vaquillonas sin un CL (n= 275) recibieron el mismo tratamiento con la adición de GnRH en el día 0. El día 5, todas las vaquillonas recibieron parches para la detección indirecta del celo (Estrotect <sup>TM</sup>, USA) que se puntuaron de 0 a 3, según el cambio de

color entre la aplicación inicial y el día 8 (0= sin cambios,  $1 \leq 50\%$  de cambio de color,  $2 \geq 50\%$  de cambio de color, 3= perdido). Se definió que el estro se produjo cuando un parche se puntuó en 2 o 3. Las vaquillonas con un CL fueron inseminadas con semen sexado o convencional mientras que las vaquillonas sin un CL fueron inseminadas sólo con semen convencional. La cantidad de espermatozoides del semen sexado y convencional fue de  $2,1 \times 10^6$  y  $\sim 20 \times 10^6$  por dosis, respectivamente. El porcentaje de animales con un CL fue del 83,9% y la respuesta promedio de estro fue del 63,8%. La tasa de preñez fue mayor ( $P < 0.01$ ) en vaquillonas que tenían un CL en el Día 0 (cíclicas) en comparación con las acíclicas (53,3 vs. 36,0%) y tendió a ser mayor ( $P = 1.7$ ) para el semen convencional (52,3 vs. 47,6%), a pesar de que todas las vaquillonas acíclicas fueron inseminadas con semen convencional. Las vaquillonas con un parche que puntuaron 2 (61,1%) o 3 (58,6%) tuvieron mayor ( $P < 0.01$ ) porcentaje de preñez que aquellos anotados como 0 (31,8%) o 1 (33,1%), independientemente del tipo de semen. Por ende, la preñez fue mayor ( $P < 0.01$ ) para vaquillonas detectadas en celo (60,6 vs. 32,3%). En vaquillonas cíclicas que no exhibieron celo, la preñez fue menor ( $P < 0.01$ ) en aquellas inseminadas con semen sexado (27,8 vs. 45,9%), mientras que en las vaquillonas que mostraron celo, la preñez solo tendió a ser más baja con semen sexado respecto al convencional ( $P = 0.08$ ; 56,7 vs. 65,5%). En resumen, la preñez fue mayor en vaquillonas cíclicas, en las inseminadas con semen convencional y en las que exhibieron celo antes de la IATF. Los parches se consideraron útiles para identificar animales para IATF con semen sexado y podría usarse para aumentar la adopción de esta tecnología en rodeos de carne y leche.

### **Protocolo corto: J-Synch (proestro prolongado).**

En Sudamérica son más frecuentes los protocolos para IATF que emplean dispositivos con progesterona y sales de estradiol. Recientemente se presentaron datos de un tratamiento realizado utilizando un protocolo basado en benzoato de estradiol y un dispositivo con progesterona, pero donde la remoción del dispositivo con progesterona fue realizada 6 días después (en lugar de 7 u 8 días) y se prolongó el proestro administrando GnRH como inductor de la ovulación en el momento de la IATF que fue realizada 72 horas después de la remoción del dispositivo, en lugar de hacerlo a las 48 horas (protocolo J-

Synch; de la Mata y Bó, 2012). Esto permitió disminuir el período de dominancia y prolongar el proestro, ya que se demostró que la calidad embrionaria puede verse afectada cuando la dominancia de un folículo ovulatorio aumenta más de 1,5 días (Cerri *et al.*, 2009) y la prolongación del proestro se correlacionó con mayores concentraciones séricas de estradiol, aumentando la fertilidad en la IATF (Bridges *et al.*, 2008; 2010).

En el estudio realizado por de la Mata y Bó (2012) se comparó la eficiencia en la sincronización de celos y consecuente ovulación de dos tratamientos alternativos. Se utilizaron 28 vaquillonas para carne *Bos taurus*, de entre 16 y 17 meses de edad, que fueron divididas al azar en dos grupos. El grupo 1 (J-Synch; n=14) recibió en el Día 0, 2 mg de BE y un DIV con 0,6 g de progesterona. El grupo 2 (CO-Synch 5 d; n=14) recibió en el Día 1, 10,5 µg de GnRH y un DIV con 0,6 g de progesterona. Los dispositivos fueron retirados en ambos grupos en el Día 6 y todas las vaquillonas recibieron 150 µg de D-Cloprostenol. La IATF se realizó a las 72 horas desde la PGF2α (Día 9) y en el mismo momento se aplicó 10,5 µg de GnRH en todos los animales. Durante el transcurso de estos tratamientos, todas las vaquillonas fueron examinadas mediante ultrasonografía transrectal para observar el desarrollo folicular y la ovulación. El día promedio ( $\pm$  DS) de inicio de la nueva onda folicular ocurrió antes ( $P < 0,05$ ) en las vaquillonas tratadas con GnRH ( $2,1 \pm 1,0$ ) que en las tratadas con BE ( $3,7 \pm 0,9$ ). Sin embargo, la tasa ovulatoria (91,6 vs 92,8 %), el diámetro del folículo ovulatorio ( $11,7 \pm 0,2$  vs  $12,0 \pm 0,5$  mm), el intervalo desde la PGF2α hasta la ovulación ( $97,1 \pm 17,4$  vs  $95,1 \pm 12,5$  h) y el porcentaje de concepción (50,0 vs 57,1 %) no difirieron significativamente ( $P > 0,05$ ) entre los grupos. Esto fue repetido en ensayos de campo con un total de 854 vaquillonas inseminadas en rodeos comerciales con este tratamiento alternativo y el promedio de preñez fue del 53,7 %, resultando en datos aceptables y alentadores. En otro estudio, el protocolo J-Synch fue utilizado en receptoras de embriones producidos *in vitro* con semen sexado, los resultados de la tasa de preñez fue mayor respecto a las receptoras tratadas con un protocolo tradicional con cipionato de estradiol que presenta proestro corto (49,3%, 229/464 y 40,9%, 197/481, respectivamente;  $P < 0,05$ ; Menchaca *et al.*, 2015a). En otro trabajo de campo (Bó *et al.*, 2016), que incluyó una gran prueba de campo, implicando dos experimentos con 4947 vaquillonas Angus x Hereford mestizas, realizado en Uruguay, tuvo como objetivos

determinar los efectos en la tasa de preñez del horario de la IATF y la adición de eCG en el momento del retiro del DIV. En el experimento 1, todas las vaquillonas recibieron DIV de 0,5 g de P4 más 2 mg de BE en el día 0. Las vaquillonas en el grupo convencional recibieron PGF2 $\alpha$  y CPE junto al retiro DIV el día 7 am. Las vaquillonas fueron subdivididas para ser IATF el día 9 am o pm (es decir, 48 o 56 horas) después de la remoción del DIV. En tanto, las vaquillonas en el grupo de tratamiento J-Synch recibió la dosis de PGF2 $\alpha$  y se retiró el DIV el día 6 pm, mientras que la dosis de GnRH y la IATF fue el día 9 am o pm (es decir, 60 o 72 horas) después del retiro del DIV. Todas las vaquillonas en este experimento también fueron tratadas con 300 UI eCG en el momento de la remoción del DIV. En el experimento 2, todas las vaquillonas fueron tratadas con el protocolo J-Synch como se describe en el experimento 1, pero en la extracción del dispositivo (día 6 pm), las vaquillonas se dividieron para recibir 300 IU eCG o ningún tratamiento de eCG en ese momento, y las vaquillonas fueron a su vez subdivididas para recibir GnRH y ser IATF el día 9 am o pm (es decir, 60 o 72 horas después de la remoción del DIV). Los resultados de estos dos experimentos fueron los siguientes: en el experimento 1, la tasa de preñez general fue mayor ( $P < 0.05$ ) en vaquillonas tratadas con J-Synch respecto al protocolo convencional (56,1 y 50,7 %, respectivamente), mientras que el tiempo de IATF solo afectó la tasa de preñez en el tratamiento convencional (53,4 y 48 % a las 48 y 56 h respectivamente,  $P < 0.05$ ). Sin embargo, la eliminación de eCG del protocolo J-Synch en el experimento 2 resultó en menor % de preñez cuando las inseminaciones se realizaron el día 9 pm (es decir, 72 horas) después del retiro del DIV (56,3 vs 49,7 % a las 60 y 72 h respectivamente,  $P < 0.05$ ). En resumen, la adición de eCG al protocolo J-Synch proporcionó una ventana más amplia de tiempos de inseminación que facilitó la IATF en grandes grupos de vaquillonas de carne.

A partir de estos datos, se diseñaron los experimentos de esta tesis para evaluar el comportamiento del protocolo J-Synch en vaquillonas de leche y comparar su desempeño como protocolo que prolonga el proestro frente a los tratamientos convencionales para IATF que se vienen utilizando.

## **HIPÓTESIS**

Los tratamientos de IATF a base de GnRH o benzoato de estradiol y dispositivos con progesterona que permiten un proestro prolongado, aumentan significativamente las tasas de preñez con respecto a los protocolos convencionales de IATF en vaquillonas lecheras.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

El Objetivo General es evaluar distintos protocolos a base de estradiol, GnRH y dispositivos con progesterona que permitan un proestro prolongado antes de la IATF.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Evaluar la dinámica folicular, tasa ovulatoria, sincronía de ovulación y concentración de progesterona en vaquillonas tratadas con protocolos que permiten un proestro prolongado utilizando dispositivos con progesterona en combinación con GnRH o estradiol.
2. Comparar la tasa de preñez a la IATF en vaquillonas tratadas con protocolos que permiten un proestro prolongado utilizando dispositivos con progesterona en combinación con GnRH o estradiol.
3. Evaluar la sincronía de la ovulación en vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch, utilizando DIV con 0,5 o 1 g de progesterona y administrando GnRH a las 56 o 72 h de retirado el DIV e IATF a las 72 h.
4. Comparar la tasa de preñez a la IATF en vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch DIV con 0,5 o 1 g de progesterona y administrando GnRH a las 56 o 72 h de retirado el DIV e IATF a las 72 h.

5. Comparar la tasa de preñez a la IATF en vaquillonas de leche tratadas con el protocolo J-Synch e inseminadas con semen convencional o sexado.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### METODOLOGÍA GENERAL

##### **Animales e instalaciones.**

En todos los experimentos se utilizaron vaquillonas cíclicas para primer servicio Holando Argentino de 15-17 meses de edad y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (escala del 1 al 5). Todas las vaquillonas fueron previamente examinadas mediante tacto rectal o ecografía para constatar su aptitud reproductiva normal.

Los experimentos donde se evaluó la dinámica folicular se realizaron en el establecimiento Don Orlando, ubicado en la localidad de Crispi, provincia de Santa Fe, Argentina (Latitud 31°47'25.43"S; Longitud 62° 3'27.64"O). Los experimentos donde se evaluó tasa de preñez se llevaron a cabo en el establecimiento El Embrujo, ubicado en la localidad de El Fortín, provincia de Córdoba, Argentina (Latitud 32° 6'24.86"S; Longitud 62°20'29.91"O).

Las vaquillonas en el establecimiento Don Orlando eran alimentadas con heno de alfalfa y suplementadas con 3-3,5 kg de materia seca de silo de maíz diariamente y agua ad-libitum. Las vaquillonas en el establecimiento El Embrujo eran alimentadas mediante una dieta TMR basada en silo de sorgo y heno de alfalfa y agua ad-libitum.

##### **Semen utilizado.**

Para la IA se utilizaron partidas de semen de toros Holstein de uso comercial que resultaron aptas al examen de calidad seminal determinado por una motilidad individual

mínima de 25% con vigor de 3 al momento del descongelado, menos del 30% de anomalías totales con menos de 15% de anomalías de cabeza y que al menos el 15% de los espermatozoides superara el test de termo resistencia a 37°C durante 2 h. La cantidad de espermatozoides del semen sexado y convencional fue de  $2,1 \times 10^6$  y  $\sim 20 \times 10^6$  células / dosis, respectivamente.

### **Ultrasonografía.**

Para la visualización de las estructuras ováricas se utilizó un equipo Honda 101 V, (Honda Electronics Co., LTD., Japón) provisto de un transductor lineal de 5.0 MHz. Las vaquillonas fueron inmovilizadas en el cepo donde se les efectuó la ecografía transrectal para registrar todas las estructuras ováricas (folículos mayores a 3 mm y CL). Se realizó un monitoreo y registro cada 12 horas de estas estructuras construyéndose un mapeo individual de acuerdo a su ubicación relativa en el ovario para posterior análisis de la dinámica folicular. La ovulación fue definida como el momento en que se detectó la desaparición del folículo de mayor diámetro que estaba presente en la examinación anterior. El área del CL fue calculada utilizando el diámetro mayor y menor de acuerdo a lo reportado por Kastelic *et al.* (1990).

### **Obtención de muestras sanguíneas y determinación de progesterona plasmática.**

Para las determinaciones de progesterona plasmática se tomaron muestras de 5 mL de sangre de la vena coccígea. Se utilizaron jeringas de 5 mL y agujas hipodérmicas (0,8 mm de diámetro y 25 mm de longitud). Las muestras fueron conservadas a 4°C durante 1 hora y fueron centrifugadas a 3500 RPM durante 10 minutos para separar el plasma que se congeló a - 20°C en tubos de 1,5 mL (Eppendorf, USA) hasta su posterior análisis (de Castro *et al.*, 2004).

Todas las muestras fueron tomadas a la mañana siguiendo el siguiente diseño:

En el Experimento 1 se obtuvieron 5 muestras de cada animal. La muestra I se obtuvo el día del retiro del dispositivo; la muestra II a las 24 h, la muestra III a las 48 h; la muestra IV a las 72 h del retiro del dispositivo. La muestra V fue obtenida a los 11 días desde la ovulación de cada animal.

En el Experimento 3 se obtuvieron 3 muestras de cada animal. La muestra I se obtuvo el día del retiro del dispositivo; la muestra II a las 72 h del retiro del dispositivo (día de la IATF); mientras que la muestra III fue obtenida a los 11 días desde la ovulación de cada animal.

Las concentraciones séricas de progesterona fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida de origen comercial (DPC, Coat-A-Count Progesterone, Los Angeles, USA) en el Laboratorio de la Facultad de Veterinaria de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron de 2,9; 1,0 y 2,4 % para valores de 1,3; 4,6 y 19,0 ng/mL, respectivamente. Los coeficientes de variación inter-ensayo en este estudio fueron de 3,3; 1,9 y 3,2 % para valores de 1,4; 4,2 y 19,9 ng/mL, respectivamente. La sensibilidad del método fue estimada en 0,2 ng/mL.

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos de estos experimentos fue realizado con el Software Estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2015). Los resultados fueron analizados mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MGLM), test de comparación de medias o de frecuencias, o sus análogos no paramétricos. En los Experimentos 1 y 3, los análisis del desarrollo folicular, área del CL y concentraciones séricas de progesterona se realizaron mediante MLGM en el que se incluyó a la identificación animal como componente aleatorio y al tratamiento, y día como componentes fijos. En el modelo también se incluyó la interacción día x tratamiento. La tasa de ovulación (vacas con ovulación/vacas tratadas) fue analizada mediante el test exacto de Fisher. En los Experimentos 2, 4 y 5 para evaluar porcentajes de preñez se utilizó el test de regresión logística utilizando una aproximación de MLGM para variables binarias (preñada o

vacía) incluyendo en el modelo los efectos por tratamiento. Los resultados son presentados como media  $\pm$  SEM y las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$ , mientras que una probabilidad entre 0,051 y 0,1 se consideró tendencia ( $P < 0,10$ ).

## **EXPERIMENTO 1**

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos tratamientos de sincronización de la ovulación a base de GnRH o benzoato de estradiol (BE) y dispositivos con progesterona (P4) que permiten un proestro prolongado y compararlos con el protocolo convencional (proestro corto) de IATF en vaquillonas lecheras. El experimento se realizó en el establecimiento Don Orlando ubicado en el Centro-Oeste de Santa Fe (Latitud 31°47'25.43"S; Longitud 62° 3'27.64"O), donde se utilizaron vaquillonas Holando Argentino de 17 meses de edad y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (escala del 1 al 5).

Se utilizaron 3 protocolos de IATF simultáneamente (Figura 2.1.), haciendo coincidir el momento de retiro del dispositivo. Las vaquillonas en el Grupo convencional recibieron un dispositivo intravaginal con P4 (DIV; DIB 1 g P4; Zoetis, Argentina) y 2 mg de BE (Gonadiol, Zoetis) en el Día 0, 500  $\mu$ g de cloprostenol (PGF2 $\alpha$ ; Sincronil, Proagro S.A., Argentina) junto con la remoción del dispositivo en el Día 7, 1 mg de BE en el Día 8 y fueron IATF a las 56 h del retiro del dispositivo. Las del Grupo J-Synch recibieron un DIV y 2 mg BE en el Día 1, PGF2 $\alpha$  junto con el retiro del dispositivo en el Día 7 y en este caso se administró 10  $\mu$ g de acetato de buserelina (GnRH; Receptal, Intervet) y se realizó la IATF a las 72 h del retiro del DIV. Las vaquillonas del Grupo Co-Synch 5 días recibieron un DIV y GnRH en el Día 2. En el Día 7 se retiró el dispositivo y se aplicaron dos dosis de PGF2 $\alpha$  (al mismo tiempo de la remoción del DIV y 12 h después). A las 72 h del retiro del DIV se realizó la IATF y se aplicó GnRH. Se utilizaron 20 vaquillonas por grupo y se realizaron dos réplicas de 30 animales cada una. Se evaluó la dinámica folicular y ovulación por medio de ultrasonografía. Los porcentajes de preñez a la IATF se determinaron mediante ultrasonografía a los 32 días de la IATF. Durante el trabajo se obtuvieron 5 muestras de

sangre por animal para analizar concentración plasmática de progesterona. La muestra 1 se obtuvo al momento del retiro de los dispositivos, las muestras 2, 3 y 4 a las 24, 48 y 72 h del retiro de los dispositivos respectivamente. La muestra 5 se obtuvo a los 11 días de cada ovulación (hora 264).

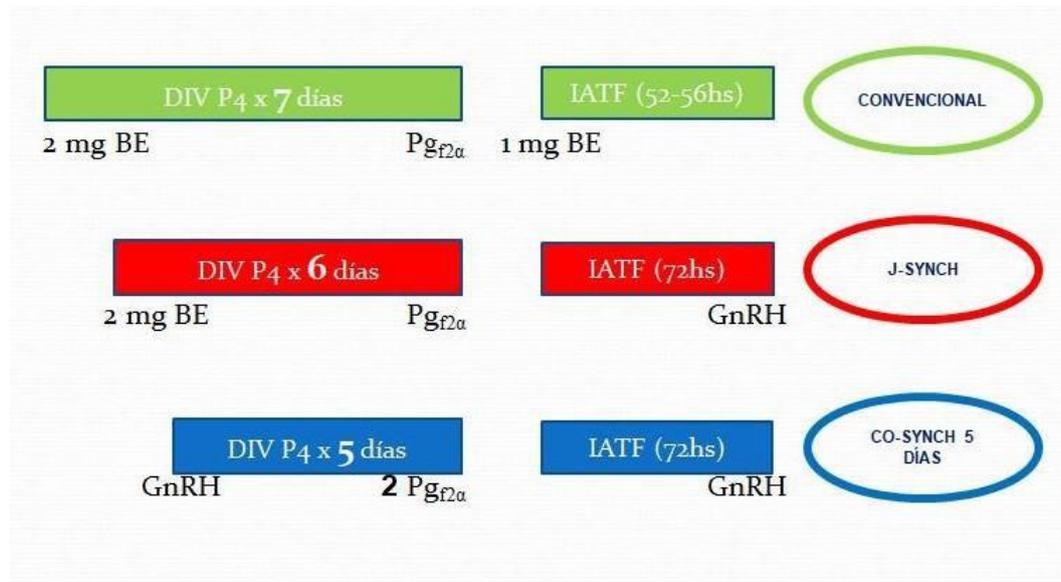


Figura 2.1. Diseño experimental para el Experimento 1.

## EXPERIMENTO 2

El objetivo de este trabajo fue evaluar la tasa de preñez siguiendo el esquema de trabajo del Experimento 1, es decir, se evaluaron dos tratamientos que permiten un proestro prolongado, Co-Synch de 5 días y J-Synch, y compararlos con el protocolo convencional (proestro corto) de IATF en vaquillonas lecheras. El experimento se realizó en el establecimiento El Embrujo, ubicado en la localidad de El Fortín, provincia de Córdoba, Argentina (Latitud 32° 6'24.86"S; Longitud 62°20'29.91"O), donde se utilizaron vaquillonas Holando Argentino de 17 meses de edad y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (escala del 1 al 5).

Se utilizaron 3 protocolos de IATF simultáneamente, haciendo coincidir el momento de retiro del dispositivo: Las vaquillonas en el Grupo convencional recibieron un DIV y 2 mg BE en el Día 0; PGF<sub>2α</sub> junto con la remoción del dispositivo en el Día

7, 1 mg de BE en el Día 8 y fueron IATF a las 56 h del retiro del dispositivo. Las del Grupo J-Synch recibieron un DIV y 2 mg BE en el Día 1, PGF2 $\alpha$  junto con el retiro del dispositivo en el Día 7 y en este caso se administró GnRH y se realizó la IATF a las 72 h del retiro del DIV. Las vaquillonas del Grupo Cosynch-5 días recibieron un DIV y GnRH en el Día 2. En el Día 7 se retiró el dispositivo y se aplicaron dos dosis de PGF2 $\alpha$  (al mismo tiempo de la remoción del DIV y 12 h después). A las 72 h del retiro del DIV se realizó la IATF y se aplicó GnRH. Se utilizaron 562 vaquillonas totales (Grupo convencional *n*: 188; Grupo Co-Synch de 5 días *n*: 185; Grupo J-Synch *n*: 189). El diagnóstico de gestación se realizó a los 32 días de la IATF.

### **EXPERIMENTO 3**

En el Experimento 3 el objetivo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de P4 en los DIV y distintos momentos de aplicación de la GnRH en vaquillonas de leche tratadas con el protocolo J-Synch. El experimento se realizó en el establecimiento Don Orlando ubicado en el Centro-Oeste de Santa Fe (Latitud 31°47'25.43"S; Longitud 62°3'27.64"O), donde se utilizaron vaquillonas Holando Argentino (*n*=80) de 17 meses de edad y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (escala del 1 al 5). En el Día 0 (Figura 2.2.), todas las vaquillonas recibieron 2 mg de BE (Benzoato de estradiol Synkroxy, Proagro, Argentina), mientras que la mitad fueron tratadas con DIV con 0,5 g de P4 (DIB 0,5 g P4; Zoetis, Argentina) y la otra mitad con un DIV con 1 g P4 (DIB 1 g P4; Zoetis, Argentina). En el Día 6, se retiraron los DIV y todas recibieron 150  $\mu$ g D+cloprostenol (PGF2 $\alpha$ ; Synkroxy, Proagro, Argentina). Las vaquillonas fueron nuevamente subdivididas para recibir GnRH a las 56 o 72 h y todas fueron IATF a las 72 h. Se evaluó la dinámica folicular, ovulación y tasas de preñez a los 32 días por medio de ultrasonografía. Durante el trabajo se obtuvieron 3 muestras de sangre por animal para analizar concentración plasmática de progesterona. La muestra 1 se obtuvo al momento del retiro de los dispositivos, la muestra 2 a las 72 horas del retiro de los dispositivos, coincidiendo con la IATF. La muestra 3 se obtuvo a los 11 días de cada ovulación (hora 264).

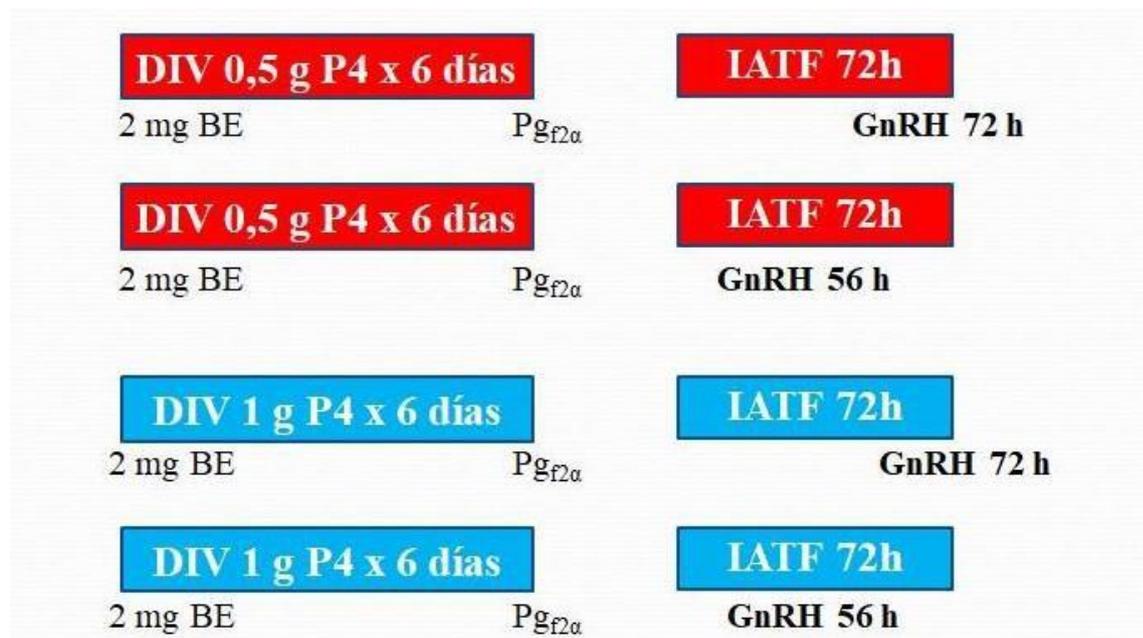


Figura 2.2. Diseño experimental 2 x 2 factorial, 4 grupos, n= 20 por grupo.

#### EXPERIMENTO 4

En este ensayo el objetivo fue evaluar la tasa de preñez en vaquillonas Holando Argentino (n=416) que recibieron un DIV de 0,5 g de P4 (Procrear Synkroxy, Proagro, Argentina) y 2 mg de BE en el Día 0 y fueron divididas en tres grupos. Las vaquillonas de los dos primeros grupos fueron tratadas con el protocolo J-Synch, recibieron GnRH a las 56 o 72 h y fueron IATF a las 72 h de la remoción del DIV. Las vaquillonas del grupo Convencional fueron tratadas con un DIV por 7 días, PGF<sub>2α</sub> junto con la remoción del DIV, 1 mg de BE en el Día 8 y fueron IATF a las 56 h del retiro del DIV.

Se utilizaron 416 vaquillonas totales (Grupo convencional n: 139; Grupo J-Synch GnRH56 h n: 137; Grupo J-Synch GnRH72 h n: 140). El diagnóstico de gestación se realizó a los 32 días de la IATF por medio de ultrasonografía.

#### EXPERIMENTO 5

En este ensayo el objetivo fue evaluar la tasa de preñez de vaquillonas Holando

Argentino (n=300) tratadas con el protocolo J-Synch y utilizando semen sexado y convencional.

Las 300 vaquillonas fueron sincronizadas simultáneamente y fueron divididas en tres grupos (Figura 2.3.):

Grupo J-Synch DIV 1 g: 100 vaquillonas recibieron un DIV de 1 g de P4 (Synkroxy, Proagro) y 2 mg de BE en el Día 0.

Grupo J-Synch DIV 0,5 g: 100 vaquillonas recibieron un DIV de 0,5 g de P4 (Synkroxy, Proagro) y 2 mg de BE en el Día 0.

Grupo J-Synch Sexado DIV 0,5 g: 100 vaquillonas recibieron un DIV de 0,5 g de P4 y 2 mg de BE en el Día 0.

Los tres grupos de animales recibieron  $\text{PGF2}\alpha$  en el momento de la remoción del DIV (Día 6). Las vaquillonas de los dos grupos inseminados con semen convencional fueron IATF a las 72 h y recibieron en ese momento GnRH. Las vaquillonas del Grupo J-Synch Sexado DIV 0,5 g fueron pintadas (Celotest, Biotay SA, Argentina) en la base de la cola el día del retiro del dispositivo. Se consideró como animal en celo a todo aquel que presentaba más del 40 % de pérdida de color, tomando como referencia el experimento realizado en vacas Braford por Stharinger *et al.* (2011). A todas las vaquillonas del grupo se trataron con GnRH a las 72 h y se inseminaron sólo las vaquillonas que mostraron celo (despintadas), mientras que en las restantes se continuó la detección de celo durante 48 horas. Participaron 4 inseminadores experimentados y se utilizaron 3 toros para el semen convencional y dos toros para el semen sexado. El diagnóstico de gestación se realizó a los 32 días de la IATF por medio de ultrasonografía.

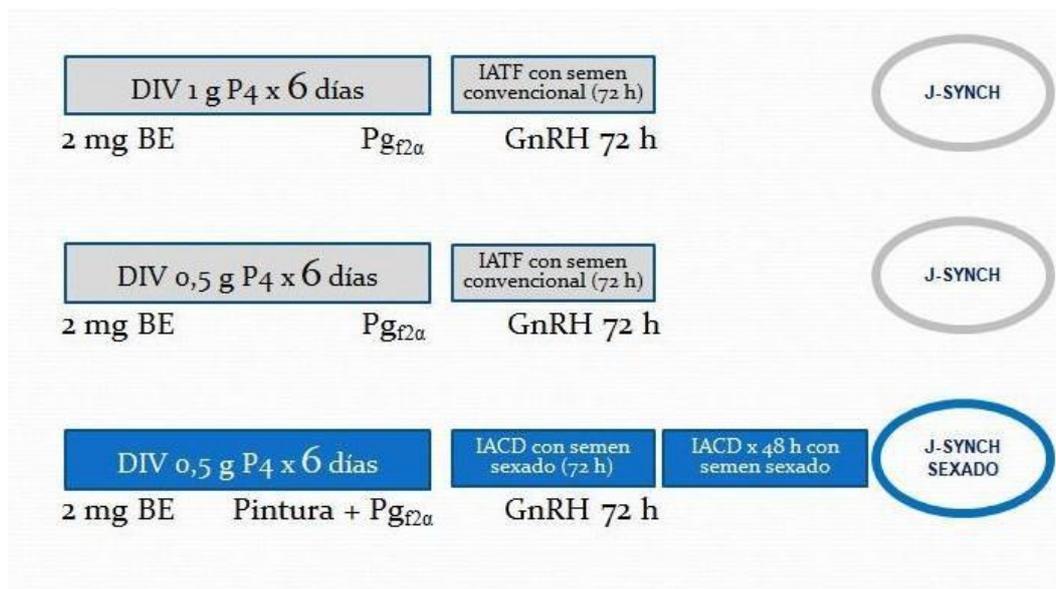


Figura 2.3. Diseño experimental para el Experimento 5.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### EXPERIMENTO 1

Los resultados están resumidos en la Tabla 3.1. La tasa ovulatoria no fue diferente entre los grupos ( $P>0,5$ ; Figura 3.1.). La hora media de ovulación fue antes para el grupo Convencional que para los grupos J-Synch y Co-Synch-5 días ( $P=0,001$ ). El tamaño del folículo preovulatorio fue menor para los grupos Convencional y J-Synch comparado con el grupo Co-Synch-5 días ( $P=0,014$ ).

Tabla 3.1. Tasa ovulatoria, hora media ( $\pm$ EE) de ovulación, tamaño del folículo preovulatorio (FO) al momento del retiro del DIV y antes de la ovulación, tasa de crecimiento folicular y porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.

Tratamientos	Convencional	J-Synch	Co-Synch-5 días
Experimento 1			
N	20	20	20
Tasa ovulatoria	19 (95%) <sup>a</sup>	17 (85%) <sup>a</sup>	17 (85%) <sup>a</sup>
Hora media Ovulación	82,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	103,8 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	96,8 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>
Diámetro FO al momento del retiro del DIV	9,3 $\pm$ 0,7 <sup>cd</sup>	8,9 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	11,1 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>
Diámetro FO (mm)	12,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	13,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	14,9 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
Tasa de crecimiento folicular (mm/día) *	1,05 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,01 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Preñadas (%)	9 (45%) <sup>a</sup>	13 (65%) <sup>a</sup>	11 (55%) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Las medias difieren significativamente ( $P<0.05$ ). <sup>cd</sup> Las medias difieren significativamente ( $P<0.1$ ; tendencia). \* Desde la remoción del DIV hasta la ovulación.

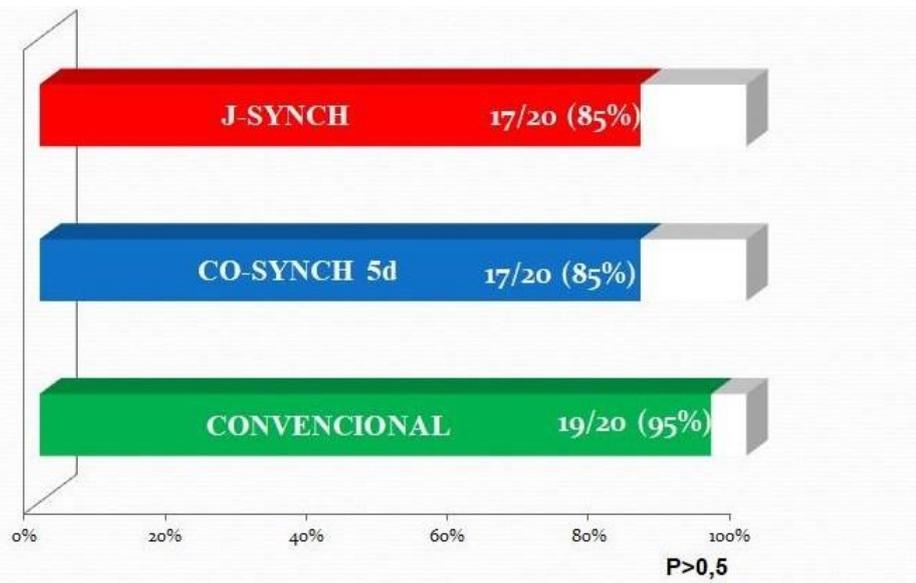


Figura 3.1. Tasa ovulatoria en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.

En la Figura 3.2. se observa el diámetro del folículo ovulatorio en diferentes momentos a partir del retiro del DIV. El diámetro folicular para el protocolo Co-Synch de 5 días fue mayor respecto a J-Synch y Convencional ( $p < 0,05$ ). La tasa de crecimiento folicular (mm/día) desde el retiro del DIV hasta las 60 h, no fue diferente entre los tratamientos (1,4, 1,4 y 1,6 mm/día para el protocolo Co-Synch de 5 días, Convencional y J-Synch respectivamente;  $p > 0,1$ ).

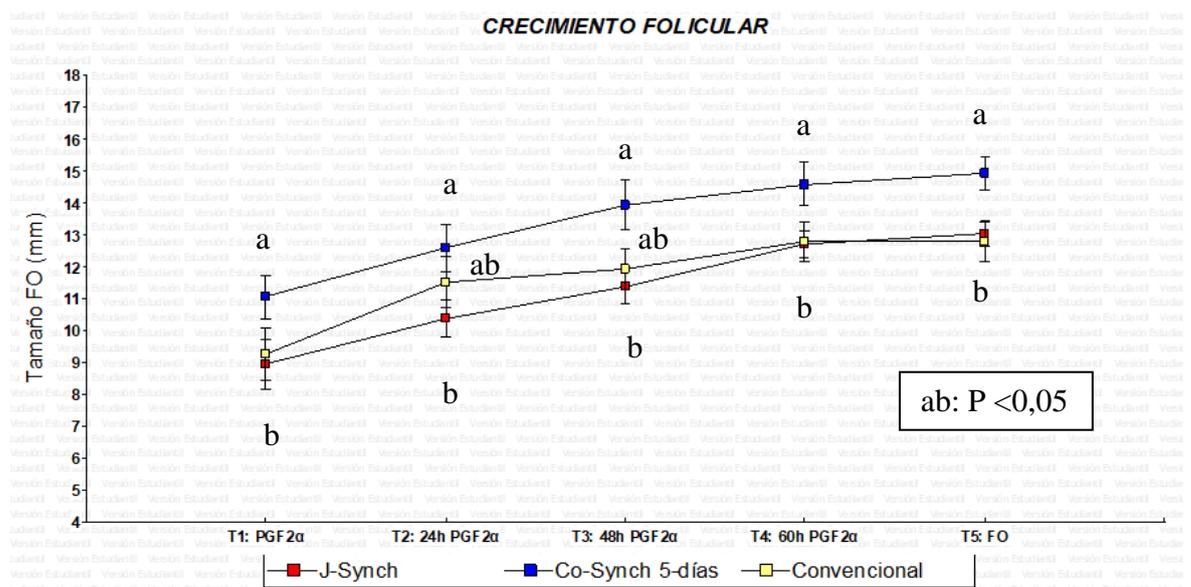


Figura 3.2. Tamaño folicular promedio (diámetro en mm) en los tres protocolos del experimento 1 luego del retiro del DIV. T1: al momento del retiro del DIV y la aplicación de PGF2 $\alpha$ . T2, T3 y T4: a las 24, 48 y 60 h de la PGF2 $\alpha$ . T5: tamaño del FO registrado antes de cada ovulación.

En la Figura 3.3. se observa la distribución de las ovulaciones según tratamiento. Los tres tratamientos son eficientes en iniciar una nueva onda de crecimiento folicular y posibilitar que la mayoría de los animales ovulen de manera sincronizada luego del retiro del DIV.

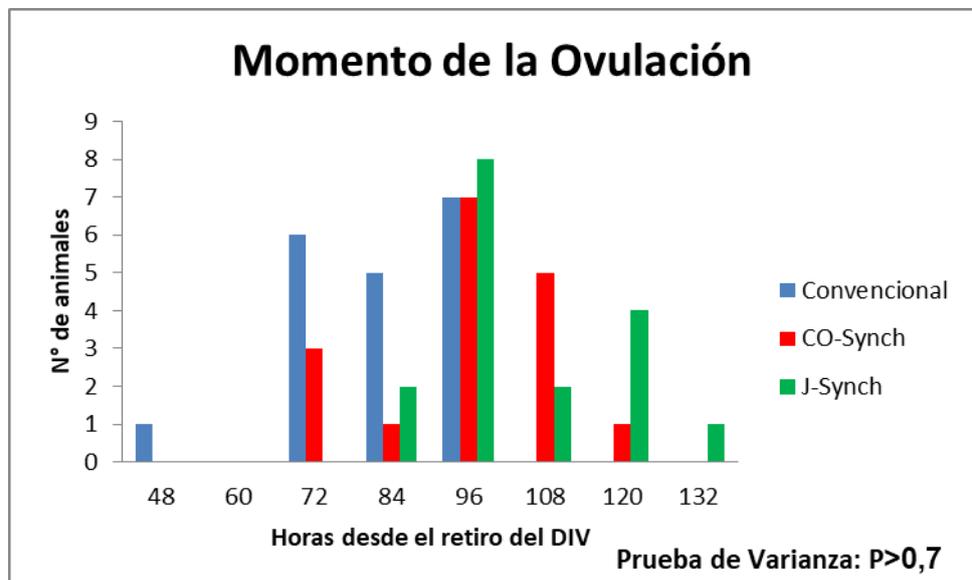


Figura 3.3. Distribución de las ovulaciones luego del retiro de los dispositivos en el experimento 1.

Cuando se evaluó la tasa de preñez no hubo diferencias entre los grupos (Convencional: 45%, Co-Synch de 5 días: 55%, grupo J-Synch: 65%), pero sí se observó una tendencia a favor del grupo J-Synch respecto al grupo Convencional en las vaquillonas que resultaron preñadas respecto a las ovuladas ( $P < 0.09$ ). El grupo Co-Synch de 5 días resultó intermedio (Figura 3.4).

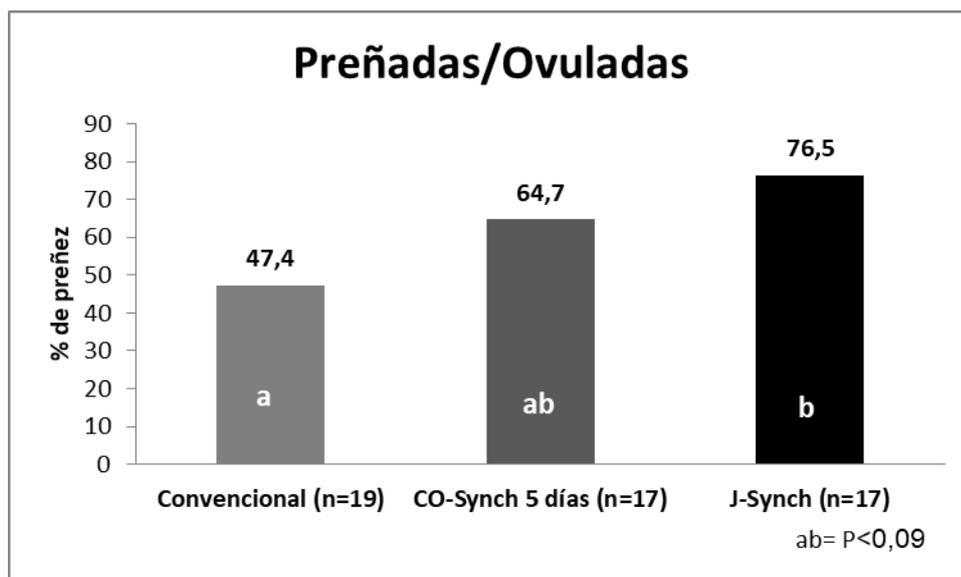


Figura 3.4. Porcentaje de Vaquillonas preñadas respecto a las ovuladas ( $P < 0.09$ ) en el experimento 1.

En las siguientes figuras se observan las ovulaciones que resultaron en preñez según la hora de la ovulación respecto al retiro del DIV y al momento de la IA en los diferentes tratamientos (Figuras 3.5., 3.6. y 3.7.). Todos los tratamientos tuvieron una aceptable fertilidad respecto a la distribución de las ovulaciones, incluso en aquellas que ocurrieron habiendo transcurrido más de 40 h luego de la IATF.

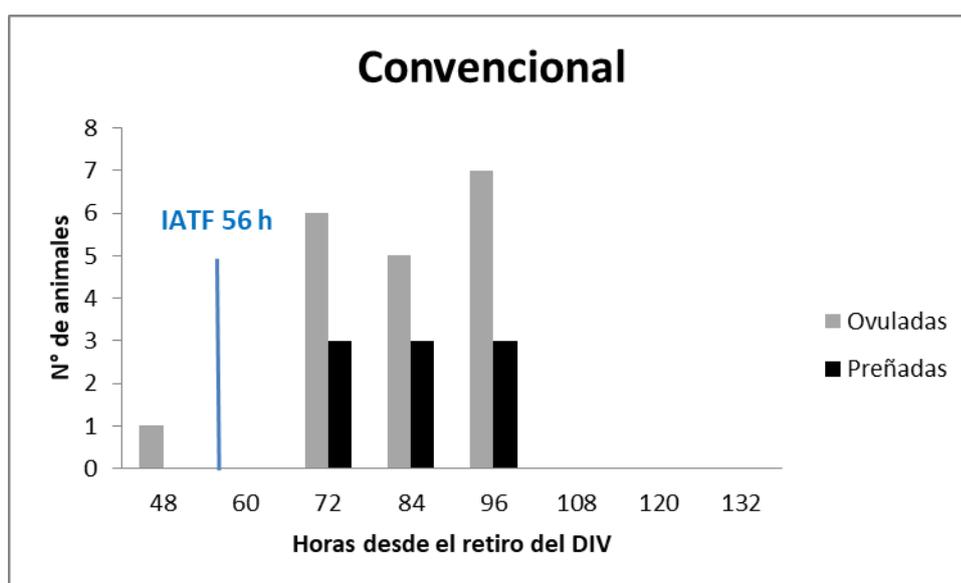


Figura 3.5. Distribución de las vaquillonas preñadas según momento de las ovulaciones en el protocolo Convencional en el experimento 1.

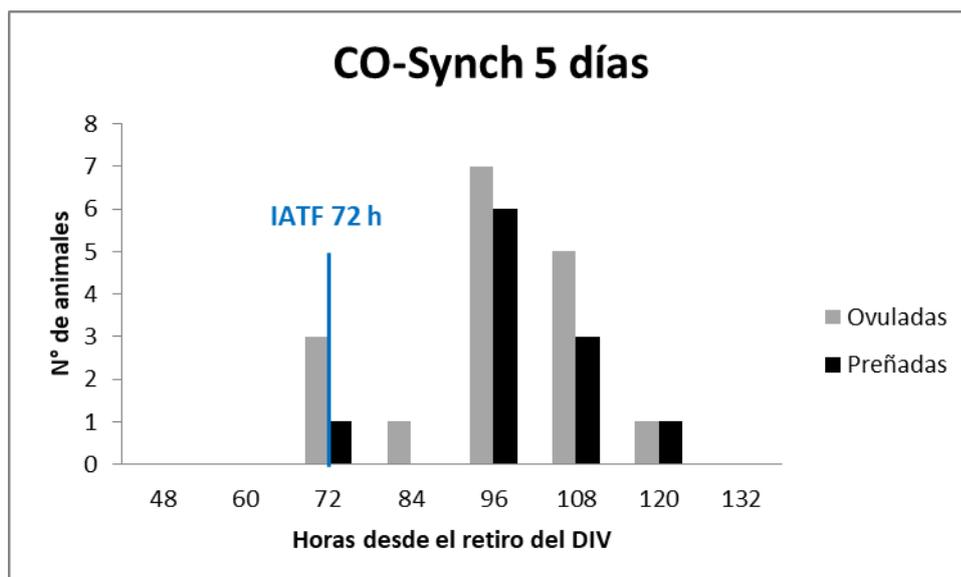


Figura 3.6. Distribución de las vaquillonas preñadas según momento de las ovulaciones en el protocolo Co-Synch 5 días en el experimento 1.

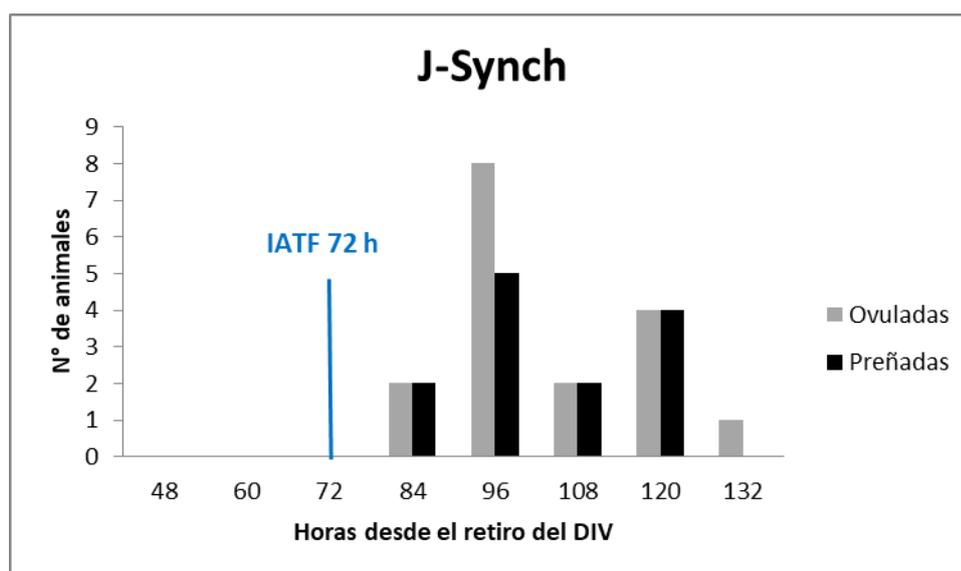


Figura 3.7. Distribución de las vaquillonas preñadas según momento de las ovulaciones en el protocolo J-Synch en el experimento 1.

En el análisis estadístico de la concentración de progesterona de las 5 muestras tomadas a los tiempos 0 (retiro de los DIV), 24 h, 48 h, 72 h y 264 h (11 días de las ovulaciones) se encontró un efecto Tratamiento ( $P < 0.01$ ), efecto Día ( $P < 0.01$ ) y una interacción Día x Tratamiento ( $P < 0.01$ ). Los valores de progesterona plasmática resultaron significativamente mayores en el tiempo 0 para el grupo Co-Synch de 5 días respecto a los otros dos grupos, lo que se justifica por efecto de CL accesorios que se

generaron durante la primera inyección de GnRH, debido a que el 65% de las vaquillonas del grupo Co-Synch de 5 días ovularon por acción de la inyección de GnRH al inicio del protocolo. Hubo diferencias significativas entre los grupos en la concentración de progesterona a los 11 días de las ovulaciones. La concentración promedio fue mayor para los grupos que permiten un proestro prolongado (4,54 y 4,49 ng/mL; Co-Synch de 5 días y J-Synch, respectivamente) respecto al grupo Convencional (proestro corto, 3,82 ng/ml). Los valores se encuentran indicados en la Figura 3.8.

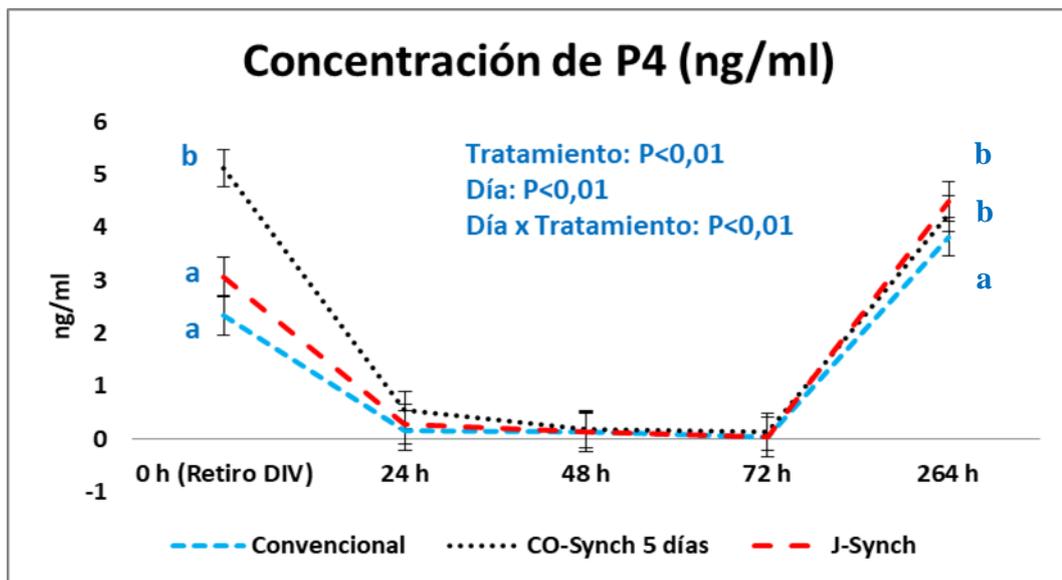


Figura 3.8. Concentración plasmática promedio de progesterona en vaquillonas según tratamiento del experimento 1 (a,b: valores con letras diferentes  $P < 0.01$ ).

## EXPERIMENTO 2

Las tasas de preñez fueron numéricamente menores en el grupo Convencional comparada con los grupos J-Synch y Co-Synch-5 días; no obstante las diferencias no fueron significativas ( $P=0,2$ ; Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Tasa de preñez en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.

<b>Tratamientos</b>	<b>Convencional</b>	<b>J-Synch</b>	<b>Co-Synch-5 Días</b>
Experimento 2			
n	188	189	185
Preñadas (%)	110 (58.5%)	122 (64.6%)	120 (64.9%)

Las medias no difieren (P=0.2).

### **EXPERIMENTO 3**

Los resultados de la evaluación de la dinámica folicular se encuentran indicados en la Tabla 3.3. La ovulación ocurrió antes (P<0,05) cuando la GnRH se aplicó a las 56 h que cuando se aplicó a las 72 h. Sin embargo, no hubo diferencias en la hora de ovulación entre las vaquillonas tratadas con los DIV de 0,5 g de P4 o 1 g de P4 (P=0,126). Hubo una interacción entre DIV y momento de la GnRH (P=0,018) en el diámetro del folículo preovulatorio, siendo menor para el grupo DIV 1 g y GnRH 56 h respecto al grupo DIV 1 g GnRH 72 h (P<0,05), mientras que los otros grupos, DIV 0,5 g GnRH 56 h y DIV 0,5 g GnRH 72 h fueron intermedios. Finalmente, tasa de preñez fue mayor para los animales tratados con el DIV 0,5 g (19/40; 72,5%) respecto a los animales que recibieron DIV 1 g (16/40 40,0%; P=0,006). Mientras que no hubo diferencias entre las tratadas con GnRH a las 56 (55,0%) o 72 h (57,8%; P=0.9).

Tabla 3.3. Hora media ( $\pm$ EE) de ovulación, tamaño del folículo preovulatorio, tasa de crecimiento folicular y % preñez en vaquillonas Holando Argentino tratadas con el protocolo J-Synch utilizando dispositivos con 0.5 o 1g de P4 y la GnRH administrada a las 56 o 72 h.

Tratamientos	<b>J-Synch GnRH 56h</b>		<b>J-Synch GnRH 72 h</b>	
Hora IATF	<b>72 h</b>		<b>72 h</b>	
Hora GnRH	<b>56 h</b>		<b>72 h</b>	
Dispositivo	DIV 0,5g	DIV 1g	DIV 0,5g	DIV 1g
N	20	20	20	20
Tasa ovulatoria	19 (95%) <sup>a</sup>	18 (90%) <sup>a</sup>	19 (95%) <sup>a</sup>	19 (95%) <sup>a</sup>
Hora media Ovulación	88,4 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	95,3 $\pm$ 3,3 <sup>ab</sup>	97,3 $\pm$ 3,2 <sup>ab</sup>	100,4 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>
Diámetro FO al retiro del DIV (mm)	7,7 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	6,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>
Diámetro FO (mm)	13,1 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	11,8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	12,6 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	13,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
Tasa de crecimiento folicular (mm/día)*	1,81 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1,96 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1,78 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Tasa de crecimiento folicular (mm/día)**	1,47 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1,38 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1,39 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1,43 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Preñadas (%)	14 (70%) <sup>a</sup>	8 (40%) <sup>b</sup>	15 (75%) <sup>a</sup>	8 (40%) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). \* Desde la remoción del DIV hasta las 60 h del retiro. \*\* Desde la remoción del DIV hasta la ovulación.

En la Figura 3.9 se observa la tasa de ovulación según tratamiento. El protocolo J-Synch tiene una alta eficiencia para sincronizar una nueva onda de crecimiento folicular y la ovulación del folículo dominante en la mayoría de los animales tratados.

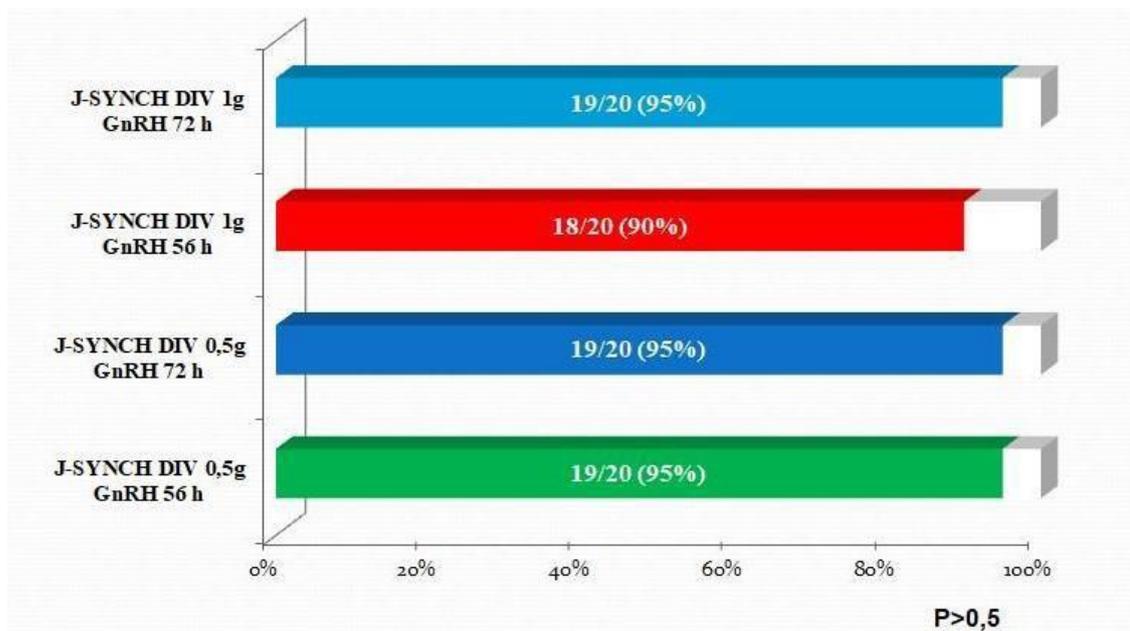


Figura 3.9. Tasa ovulatoria del protocolo J-Synch con sus variantes. No hubo diferencias entre los grupos ( $P > 0,5$ ).

En el análisis estadístico de la concentración de P4 de las 3 muestras tomadas a los tiempos 0 (retiro de los DIV), 72 h (momento de la IATF) y 264 h (11 días de las ovulaciones) se encontró que no existen diferencias estadísticas en los valores medios de P4 para los tiempos 0 y 72 h, pero muestra una tendencia por DIV utilizado en la hora 264 a favor del DIV 0.5 g respecto del DIV 1 g, con valores medios de P4 de 9,27 y 7,21 ng/ml respectivamente ( $P = 0,0896$ ; Figura 3.10.).

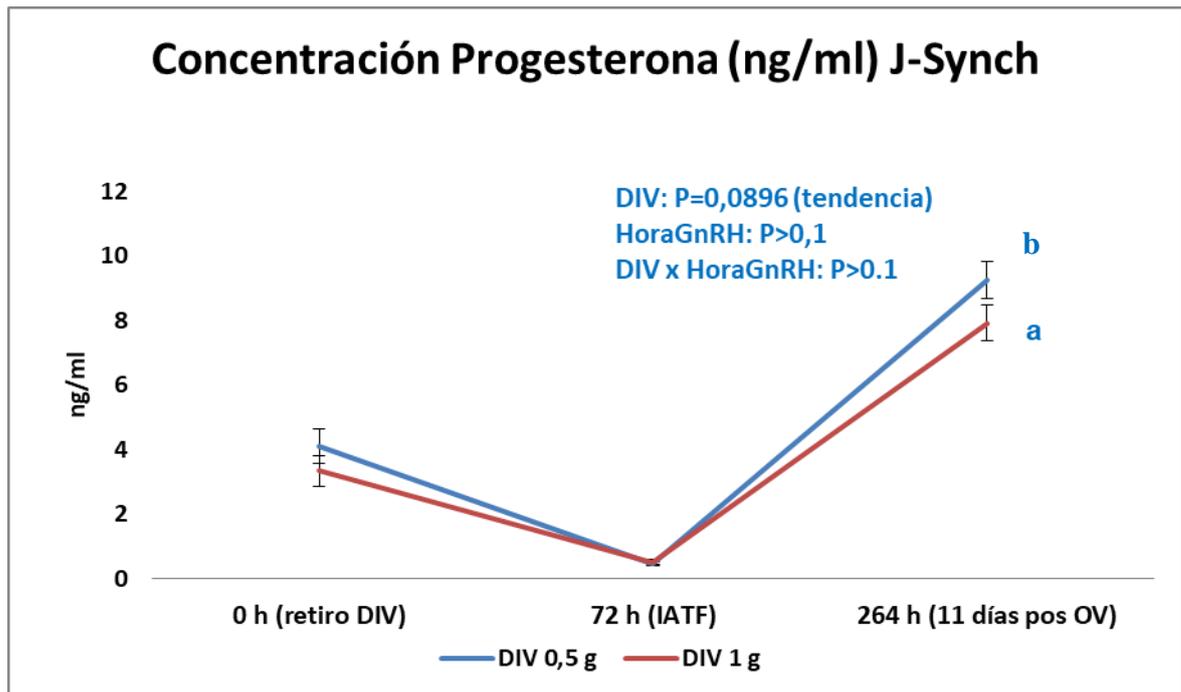


Figura 3.10. Concentración plasmática de P4 (ng/ml) según DIV utilizado en el experimento 3. Valores con letras diferentes tienden a diferir ( $P=0,0896$ ).

Además de los efectos de tratamiento se encontró una interacción significativa según DIV por hora de administración de la GnRH para el tiempo 264 h (11 días de las ovulaciones) entre los grupos DIV 0,5 g GnRH 72 h respecto al grupo DIV 1 g y GnRH 56 h con valores de P4 de 9,63 y 7,08 ng/ml respectivamente ( $P < 0,05$ ). Los otros grupos, DIV 0,5 g GnRH 56 h y DIV 1 g GnRH 72 h, tuvieron valores intermedios (8,91 y 8,74 ng/ml respectivamente; Figura 3.11.).

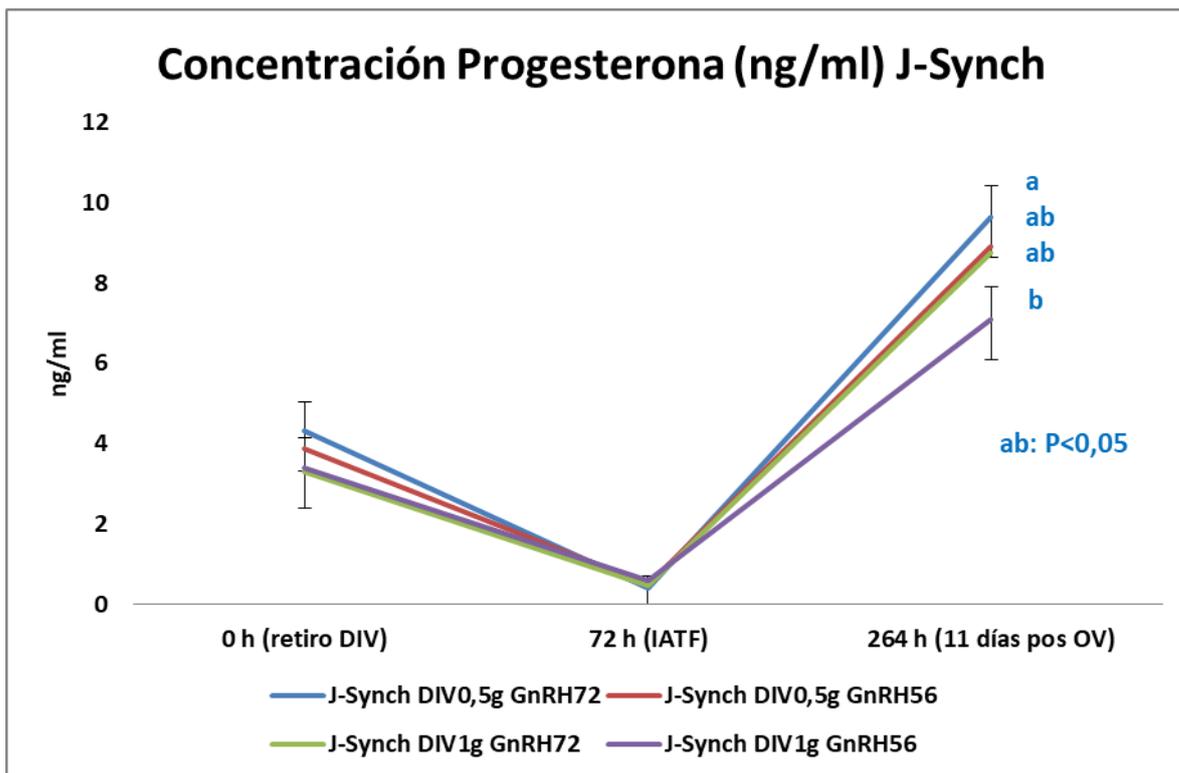


Figura 3.11. Concentración plasmática de P4 (ng/ml) en los diferentes grupos del protocolo J-Synch correspondientes al experimento 3.

## EXPERIMENTO 4

Los resultados están resumidos en la Tabla 3.4. No hubo diferencias significativas en las tasas de preñez entre las vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch con GnRH a las 56 h, las tratadas con el protocolo J-Synch y GnRH a las 72 h y las del grupo control. A pesar que los dispositivos con menor contenido de P4 mejoraron las tasas de preñez al protocolo J-Synch en el Experimento 3, el momento de la administración de GnRH no la afectó. Por último, las tasas de preñez con el protocolo J-Synch no fueron diferentes que la obtenida con el protocolo Convencional de 7 días.

Tabla 3.4. Tasa de preñez en vaquillonas Holstein sincronizadas con tres protocolos de IATF.

<b>Tratamientos</b>	<b>J-Synch GnRH 56h</b>	<b>J-Synch GnRH 72 h</b>	<b>Convencional</b>
Hora IATF	<b>72 h</b>	<b>72 h</b>	<b>56 h</b>
Hora GnRH	<b>56 h</b>	<b>72 h</b>	-
Dispositivo	DIV 0,5 g	DIV 0,5 g	DIV 0,5 g
N	137	140	139
Preñadas (%)	82 (59,9%) <sup>a</sup>	89 (63,6%) <sup>a</sup>	86 (61,9%) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Porcentajes no difieren significativamente ( $P>0.2$ ).

## **EXPERIMENTO 5**

La tasas de preñez fueron del 59%, 56% y 53,1% para los grupos J-Synch DIV 1 g, J-Synch DIV 0,5 g (ambos inseminados con semen convencional) y J-Synch Sexado DIV 0,5 g (inseminado con semen sexado) respectivamente (Tabla 3.5.). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos ( $P=0,7$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes toros e inseminadores. La detección de celos mediante la observación de pintura permitió lograr tasas de preñez utilizando semen sexado semejantes al uso de semen convencional por IATF en el protocolo J-Synch.

Tabla 3.5. Tasa de preñez en vaquillonas Holstein inseminadas con el protocolo J-Synch.

<b>Tratamientos</b>	<b>J-Synch DIV 1 g</b>	<b>J-Synch DIV 0,5 g</b>	<b>J-Synch Sexado DIV 0,5 g</b>
Experimento 5			
n	100	100	96 <sup>1</sup>
Preñadas (%)	59 (59 %) <sup>a</sup>	56 (56%) <sup>a</sup>	51 (53,1%) <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Cuatro (4%) vaquillonas no fueron inseminadas debido a que no mostraron celo (pintura intacta).

En el grupo Sexado DIV 0,5 g, 72 vaquillonas fueron inseminadas a las 72 h (despintadas 72/100; 72%), mientras que 16 (16%) y 8 (8%) vaquillonas fueron inseminadas a las 96 h y 120 h respectivamente. El 4% de las vaquillonas de este grupo no tuvieron signos de celo (permanecieron pintadas) y no fueron inseminadas (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Distribución de celos y Tasa de preñez en las vaquillonas del Grupo J-Synch Sexado DIV 0,5 g. A las 72 h, todos los animales recibieron la dosis de GnRH.

<b>Momento de inseminación desde el retiro del DIV</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>
Grupo J-Synch Sexado 0,5 g. <sup>1</sup>			
n	72	16	8
Preñadas (%)	37 (51,4 %)	11 (68,7 %)	3 (37,5 %)

<sup>1</sup> Cuatro (4%) vaquillonas no fueron inseminadas debido a que no mostraron celo (pintura intacta).

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

Con el advenimiento de la ultrasonografía y la posibilidad de efectuar dinámica folicular a varios animales simultáneamente, permite la recopilación de enorme cantidad de datos para poder estudiar y analizar. La mejor comprensión de los patrones del crecimiento de los folículos ováricos bovinos y las tecnologías que coordinan el crecimiento y ovulación de los folículos permiten incrementar el uso de las técnicas de IATF en bovinos de carne y leche (Bó *et al.*, 2013). La aplicación de programas de IATF para preñar las vaquillonas de reemplazo de un sistema de producción lechera es factible desde el punto de vista operativo y económico. La detección del celo de las vaquillonas se dificulta debida al tiempo que demanda y al personal especializado necesario para lograr los objetivos reproductivos.

Desde lo operativo, la implementación de programas de IATF en vaquillonas lecheras presentan las siguientes ventajas: las tareas son programadas durante el año, se evita el trabajo diario de la detección de celo, permite trabajar y preñar grupos de animales lo que favorece el manejo nutricional y sanitario, inmunizaciones, ingresos a parto y programar las tareas de calostrado de las futuras crías por nacer y también, favorece la venta de vaquillonas preñadas, qué, por estar todas en el mismo momento de la gestación, facilita el negocio ante un comprador interesado.

Desde lo económico se debe tener en cuenta que desde el momento que una hembra de reemplazo logra concebir cambia sustancialmente su valor económico mientras que se cumple el objetivo primordial de la cría de vaquillonas. Los gastos incurridos para un programa de IATF en vaquillonas, sumado al costo del semen y gastos asociados, difícilmente superen el 3% del total de gastos de un sistema de cría de vaquillonas de leche (Ré *et al.*, 2015, Gestión agropecuaria 2014-15, Establecimiento

Don Orlando), pero su impacto en los ingresos es muy importante por el sólo hecho de permitir que las hembras se preñen de una manera programada y coordinada.

En la medida que se logren mejorar los resultados de preñez de los protocolos para IATF tendrán una aceptación creciente por parte de los ganaderos para el manejo reproductivo de sus vaquillonas.

La duración del proestro en los protocolos de IATF ha sido investigada en los últimos años. Bridges *et al.* (2008) dedujeron que una mayor tasa de preñez a la IATF podría lograrse extendiendo la duración del proestro generando el protocolo Co-Synch + P4 de 5 días. En los experimentos de esta tesis se ha demostrado que el protocolo J-Synch permite un proestro 21 horas más prolongado que el tratamiento Convencional en vaquillonas Holando Argentino. Esto concuerda con los datos de de la Mata *et al.* (2018) que encontró una diferencia de 28 horas en el periodo de proestro en vaquillonas de carne tratadas con el protocolo J-Synch y el Convencional, respectivamente.

Los proestros largos (de 2 a 4 días) se relacionan con mejores tasas de concepción a la IATF, con mayores producciones de estradiol, provenientes del folículo dominante, y de progesterona luteal en el ciclo subsiguiente, en comparación con los proestros de corta duración, como fue demostrado en los protocolos Co-Synch de 5 días (Bridges *et al.*, 2010), como más recientemente con el protocolo J-Synch (de la Mata *et al.*, 2018).

Si bien el tamaño folicular no afecta la fertilidad cuando la ovulación ocurre espontáneamente (Perry *et al.*, 2005), en los protocolos de IATF de proestro corto aumentan las posibilidades de generar ovulación prematura de un folículo dominante cuando son inducidas por la administración de GnRH exógena, reduciendo el tamaño del folículo ovulatorio y disminuyendo la función luteal y fertilidad en vacas de carne (Perry *et al.*, 2005; Mussard *et al.*, 2007). A diámetros foliculares similares, los tratamientos de proestros cortos tuvieron menores tasas preñez que los tratamientos de proestros largos (Bridges *et al.*, 2010; de la Mata *et al.*, 2018).

En los protocolos que mantienen un proestro prolongado como el Co-Synch 5 días o el protocolo J-Synch, donde el intervalo desde la PGF2 $\alpha$  hasta la IA y aplicación de la GnRH es de 72 h ocurren algunas ovulaciones tempranas antes de la IA pero las cuales logran aceptables tasas de preñez (Bridges *et al.*, 2008; Rabaglino *et al.*, 2010a; Rabaglino *et al.*, 2010b; Nuñez Olivera *et al.*, 2016). Acorde a esto, en los trabajos de dinámica folicular en el protocolo J-Synch se observó una tasa de preñez del 42,8% para aquellas ovulaciones que ocurrieron antes de la administración de la GnRH y de la IA. Por su parte en el trabajo de Nuñez Olivera *et al.* (2016) 14 de las 19 vaquillonas que ya habían ovulado cuando se realizó la IATF y GnRH a las 72 horas también resultaron preñadas.

Un estudio estimó en vaquillonas Holstein que el proestro de 3 días tiene una probabilidad de concepción del 80,1% a los 28 días de la IA. Dicha probabilidad era menor cuando el proestro era más corto o más largo de 3 días (Colazo y Ambrose, 2011). En este estudio, la longitud del proestro, pero no el diámetro del folículo ovulatorio se identificó como un predictor significativo de la probabilidad de concepción a la IA. Disminuyendo la longitud del proestro antes de la inducción de la ovulación resultó en baja tasa de preñez a la IA y una incidencia elevada de fases luteales cortas (Bridges *et al.*, 2010). Por otro lado, un aumento de la duración de la dominancia folicular durante el tratamiento con progesterona puede resultar en ovulaciones de ovocitos comprometidos, que si bien pueden ser fertilizados en algunos casos, a menudo tienen poca capacidad para establecer la preñez (Sanchez *et al.*, 1993; Revah y Butler, 1996; Ahmad *et al.*, 1995). Por el contrario, bajas tasas de fertilización debido a una inadecuada longevidad espermática puede ser la razón de fallas de preñez en vaquillonas con un proestro prolongado (Saacke *et al.*, 2000). No obstante, en el Experimento 1 de esta tesis, las vaquillonas que ovularon a las 120 h, o sea 48 horas después de la IATF resultaron preñadas, indicando que un medio ambiente uterino favorable puede resultar en una supervivencia espermática mucho mayor que la estimada.

Con respecto al desarrollo luteal evaluado desde el día 3 al día 12 de las ovulaciones, de la Mata *et al.* (2018) han demostrado que tendió a ser mayor para el

protocolo J-Synch respecto al protocolo convencional. Los resultados de concentración de P4 en el día 11 después de la ovulación de las vaquillonas Holstein de esta tesis tuvieron valores promedio más elevados y significativos en el protocolo J-Synch y Co-Synch 5 días respecto al Convencional. Esto coincide con trabajos del autor mencionado anteriormente, que han demostrado que las concentraciones séricas de P4 durante los primeros 13 días de la fase luteal alcanzadas en vaquillonas de carne tratadas con J-Synch fueron mayores que en las del grupo Convencional.

El establecimiento de la preñez depende de la función lútea, la señalización del embrión y del ambiente uterino y estos factores se ven afectados, al menos en parte, por las condiciones hormonales preovulatorias (Perry *et al.*, 2017). En ganado de carne la tasa de fertilización en general se alcanza entre el 90% y 100% (Diskin *et al.*, 2016), mientras que la tasa de preñez a los 30 días después de la IATF es generalmente de alrededor del 50% (Bó *et al.*, 2016). Esta brecha es mayor aún en el ganado lechero en lactancia (Santos *et al.*, 2010; Bisinotto y Santos, 2012), con la mayor proporción de pérdidas embrionarias que ocurren en los primeros 16 días después de la fertilización (Diskin *et al.*, 2016). Existe evidencia reciente que indica que la duración del proestro es decisiva para el resultado de fertilidad, porque el estradiol preovulatorio "programa" el útero en su preparación para recibir el *conceptus*, modificando la morfología celular, secreciones y receptores de esteroides reguladores (Bridges *et al.*, 2013). La regulación compleja de la expresión del receptor de estrógeno y de P4 debido al estradiol preovulatorio y P4 secretada por el CL en el período de diestro temprano, puede equilibrar la expresión de genes diana en el endometrio para regular la receptividad uterina para el embrión en desarrollo (Binelli *et al.*, 2014). Por esta razón, la longitud del proestro y la concentración preovulatoria de estradiol pueden ser determinantes para el establecimiento y mantenimiento de la preñez en rumiantes. Durante el ciclo estral de la vaca, el endometrio se somete a cambios dinámicos que son necesarios para la recepción sincronizada del embrión 4-6 días después de la ovulación. Estos cambios incluyen a receptores de hormonas sexuales (Meikle *et al.*, 2001) y otros, como factores de crecimiento, como el factor de crecimiento similar a la insulina (Sosa *et al.* 2010). Estos procesos dinámicos se han relacionado con las concentraciones de P4 circulantes y las secreciones histotróficas, que son necesarios para la supervivencia del embrión,

elongación y reconocimiento materno de la preñez (Spencer *et al.* 2007). Además, las concentraciones preovulatorias de estrógenos afectan la función luteal y la producción de P4 posterior (Perry *et al.*, 2017).

Además de la prolongación del proestro, los nuevos protocolos para IATF como el Co-Synch de 5 días se basaron en la disminución de 7 a 5 días en la permanencia del dispositivo con P4 (como se utilizaba en el Co-Synch tradicional de 7 días), evitando de esta manera los efectos adversos de los folículos persistentes sobre la fertilidad de las vacas y vaquillonas que no ovulan a la primera GnRH (Day, 2015). A la inversa, los protocolos basados en estradiol son altamente efectivos para inducir atresia folicular y la aparición de una nueva onda folicular en más del 90% de las vacas y vaquillonas (Moreno *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2012) y son económicamente convenientes en comparación con protocolos basados en GnRH. En un experimento reciente (de la Mata *et al.*, 2018) se comparó el protocolo J-Synch con el convencional usando 48 vaquillonas cíclicas Hereford x Angus. Todas las vaquillonas se encontraban en la misma fase lútea al comienzo del experimento, debido a que fueron presincronizadas con dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas por 14 días, luego, 11 días después de la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ , se inició el experimento (se utilizaron dispositivos con 0,5 g de P4 en ambos grupos). Con respecto a las tasas de preñez, el protocolo J-Synch resultó en una mayor tasa de preñez a la IATF en vaquillonas de carne respecto al tratamiento convencional (Menchaca *et al.*, 2015a; Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2018). Estos datos son coincidentes con los obtenidos en los experimentos de esta tesis en vaquillonas de leche. Si bien, no se ha demostrado diferencias estadísticas de mayor preñez en las vaquillonas Holstein en el protocolo J-Synch respecto al convencional en el Experimento 2, se destaca que en todas las réplicas realizadas comparando ambos protocolos, siempre se obtuvo mayor % de preñez en el protocolo J-Synch, por ende puede que falte ampliar el número de animales para confirmar lo detectado en las hembras de carne.

Por ende, extendiendo el período de proestro resulta en una mayor período de crecimiento del folículo ovulatorio dominante, lo que mejora la actividad esteroideogénica del folículo y las concentraciones de estrógenos (Bridges *et al.* 2008, 2010, 2012, 2014; Mesquita *et al.* 2014). Esto debería tener un efecto positivo en el

establecimiento de la preñez porque un mayor nivel de estrógenos está relacionado con un embrión de más calidad y viabilidad (Larimore *et al.*, 2015; Madsen *et al.*, 2015).

Además, mayores concentraciones de P4 que se encuentran después de la extensión del proestro, sugieren un ambiente uterino más favorable que puede acelerar el crecimiento y la elongación del embrión, por lo tanto, la mayor tasa de preñez obtenida con el protocolo J-Synch (Menchaca *et al.*, 2015a; Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2018) fue probablemente asociado con un mejor ambiente uterino, mayor desarrollo del embrión y menores pérdidas embrionarias. La mayor concentración de P4 durante la fase luteal temprana mejora la fertilidad, mientras que concentraciones bajas de P4 se asocian con menores tasas de preñez y mayores pérdidas embrionarias en el bovino (Diskin *et al.*, 2016; Lonergan *et al.*, 2016). En general, las concentraciones séricas de P4 están relacionadas con el tamaño del CL (Vasconcelos *et al.*, 2001), principalmente durante la fase lútea temprana pero no después del día 8 del ciclo estral (Mann, 2009). La mayor concentración de P4 fue confirmada en esta tesis para los protocolos que prolongan el proestro (J-Synch y Co-Synch de 5 días) respecto al tratamiento convencional (proestro corto).

Es importante resaltar que como se ha desarrollado, la duración del proestro tiene implicancias en el diámetro del folículo ovulatorio, crecimiento folicular, metabolismo y concentración de hormonas esteroideas, ambiente uterino, desarrollo embrionario y tasas de preñez en los protocolos de IATF. En este sentido, el nivel de P4 de los dispositivos o el momento de aplicación de un inductor de la ovulación no debe ser descuidado. Utilizar un dispositivo de 0,5 o 1 g de P4 puede tener influencias sensibles en los resultados de un protocolo de IATF, y no se debe descartar seguir profundizando el conocimiento de los niveles de P4 que se libera de los dispositivos según su concentración inicial, el peso promedio de los animales que se piensa tratar, como así también, se deben considerar el nivel nutricional, categoría, raza y lactación. Estos factores y otros, pueden modificar, por ejemplo, la hora media de ovulación, tasa de crecimiento y tamaño del folículo ovulatorio, concentraciones de hormonas esteroideas (estrógenos en la fase preovulatoria y P4 en la fase luteal subsiguiente) y por ende, la tasa de concepción de los tratamientos de IATF. Todo lo mencionado puede observarse en

el Experimento 3 cuando se evalúa el protocolo J-Synch utilizando los dispositivos de 0,5 o 1 g de P4 y dos momentos de aplicación de la GnRH como inductor de la ovulación (a las 56 o 72 h del retiro de los DIV). En los resultados se observa que en los tratamientos extremos: J-Synch con DIV de 1 g y la GnRH a las 56 h vs J-Synch con DIV de 0,5 g y la GnRH a las 72 h aparece una interacción con diferencias significativas, la concentración de P4 fue menor para el primer grupo ( $7,08 \pm 0,8$  vs  $9,63 \pm 0,8$  ng/ml, respectivamente). Esto se debe a la influencia de la mayor concentración de P4 del DIV (1g) junto a la aplicación más temprana del inductor de la ovulación (GnRH a las 56 h), induciendo a ovular folículos de menor tamaño e inmaduros ( $11,8 \pm 0,4$  mm) y como consecuencia una menor producción de P4 en la fase luteal subsiguiente. Además, la tasa de preñez fue mayor para los DIV de 0,5 g que para los de 1g (29/40: 72,5% vs 16/40: 40,0%, respectivamente,  $P>0,05$ ).

La utilización de métodos indirectos como parches o pintura para la detección de celos puede ser de utilidad en la aplicación de una IATF. Si bien, la IATF se caracteriza por sincronizar la ovulación de las hembras tratadas, el uso de métodos indirectos de detección de celos puede colaborar mucho con los resultados. Inclusive puede hacer viable el uso de otras biotecnologías, como por ejemplo la utilización de semen sexado. Colazo *et al.* (2018) demostraron en un estudio reciente en vaquillonas de carne que el uso de parches resultó útil como método indirecto de detección de celo cuando fueron tratadas con el protocolo Co-Synch de 5 días. El estudio caracterizó a las vaquillonas mediante un control reproductivo como cíclicas (n = 1331) y acíclicas (n= 275). Las vaquillonas cíclicas fueron inseminadas con semen sexado o convencional mientras que las vaquillonas acíclicas fueron inseminadas sólo con semen convencional. El día 5, en el momento del retiro del DIV, todas las vaquillonas recibieron parches para la detección indirecta del celo (EstroTECT™, USA). La respuesta promedio de celo fue del 63,8%. La tasa de preñez fue mayor ( $P<0,01$ ) en vaquillonas cíclicas en comparación con las acíclicas (53,3 vs. 36,0%) y tendió a ser mayor ( $P=0,07$ ) para el semen convencional que para el sexado (52,3 vs. 47,6%), a pesar de que todas las vaquillonas acíclicas fueron inseminadas con semen convencional. Las hembras que presentaron celo (parche ausente o con más del 50% de cambio de color) antes de la IATF tuvieron una mayor tasa de preñez (60,6 vs. 32,3%;  $P<0,01$ ). Por otro lado, en vaquillonas cíclicas que

no exhibieron celo, la preñez fue menor ( $P < 0.01$ ) en aquellas inseminadas con semen sexado que con semen convencional (27,8 vs. 45,9%), mientras que en las vaquillonas que mostraron celo, la preñez solo tendió a ser más baja con semen sexado respecto al convencional ( $P=0.08$ ; 56,7 vs. 65,5%).

Por ende, utilizar semen sexado sólo en aquellas vaquillonas que presentan celo antes de la IATF y usar semen convencional en el resto de las hembras, puede considerarse como una medida para disminuir riesgos y potenciar resultados. Además, cuando se analiza la proporción de las futuras crías al nacer cuando se combina IA con semen sexado y convencional (probabilidad del sexo elegido: 90% y 50% respectivamente) siguiendo el esquema del trabajo de Colazo *et al.* (2018), es probable obtener 65 a 70% aproximado de nacimientos de crías con el sexo objetivo, lo que seguramente resulta de un gran potencial para el rodeo.

En el protocolo J-Synch también se demostró la mayor fertilidad a la IATF cuando en vaquillonas de carne se utilizó pintura para la detección de celos y fueron inseminadas con semen convencional (de la Mata *et al.*, 2013) o sexado (Bó *et al.*, 2018). En el experimento de de la Mata (2013) el 60% de las vaquillonas manifestó celo previo a la IATF a las 72 h, resultando la tasa de preñez mayor ( $P < 0,05$ ) en las vaquillonas que manifestaron celo (76,3%) en comparación a las que no lo hicieron (42,3%).

El celo se define como el período en el que la hembra es sexualmente receptiva y se debe a un aumento de las concentraciones circulantes de estradiol en un momento en que las concentraciones de P4 son bajas (Allrich, 1994). Además, se ha sugerido que el crecimiento, alargamiento, supervivencia y fijación del *conceptus* se ven influenciados por la coordinación de eventos que conducen a una disminución de las concentraciones de P4 y un aumento en las concentraciones de estradiol antes del inicio del celo (Bridges *et al.*, 2013). Además, se ha informado que las concentraciones de estradiol preovulatorio tienen un impacto positivo en el desarrollo posterior de *conceptus*, y se ha informado que las vacas que exhiben celo tienen una mayor longitud del embrión en el día 19 de gestación en comparación con aquellas que no muestran

celo (Davoodi *et al.*, 2016).

Se ha demostrado anteriormente que la aparición de celos en los programas de IATF está asociada positivamente con la tasa de preñez a la IA en animales *Bos taurus* (Richardson *et al.*, 2016) y en ganado de carne *Bos taurus* x *Bos indicus* (Bó *et al.*, 2017), y con el diámetro del folículo dominante en la IATF, el diámetro del CL posterior, las concentraciones de P4 en la fase lútea y la preñez en el ganado de carne *Bos indicus* (Sá Filho *et al.*, 2011).

Más específicamente, la madurez del folículo puede afectar la fertilidad a través de la preparación del ovocito para el desarrollo del embrión, la preparación de células foliculares para la luteinización y/o la preparación del ambiente uterino para el establecimiento de la preñez.

Se ha demostrado que la expresión del celo en las receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* tratadas con el protocolo Ovsynch resultó en un mayor diámetro del folículo ovulatorio, mayor área del CL y concentraciones subsecuentes de P4 y mayor tasa de preñez que en aquellas que no mostraron celo (Baruselli *et al.*, 2003). Las razones para la mayor tasa de preñez en las receptoras que muestran celo es que estuvieron expuestas a concentraciones de estradiol más altas que aquellas que fueron inducidas a ovular con GnRH antes de mostrar el celo y las concentraciones más altas de P4 en el momento de la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF).

En un estudio reciente que involucró la TE entre vacas donantes y receptoras inducidas para ovular un folículo dominante grande o pequeño con GnRH reveló resultados interesantes (Atkins *et al.*, 2013). Este estudio demostró que el diámetro folicular no era tan importante, ya que las receptoras con folículos grandes tenían tasas de preñez más bajas, lo que indica que el estradiol producido por un nuevo folículo dominante en crecimiento beneficiará más la preñez que un folículo grande envejecido que ya redujo la producción de estradiol en el momento de la ovulación inducida por GnRH (Bridges *et al.*, 2014) En otro estudio, las vacas donantes y receptoras se dividieron retrospectivamente en función de las concentraciones plasmáticas de

estradiol en la ovulación inducida (Jinks *et al.*, 2013). En este estudio, las concentraciones circulantes de estradiol de las vacas receptoras, no de las donantes, se relacionaron con tasas de preñez más altas, lo que indica que el beneficio principal del aumento de las concentraciones de estradiol preovulatorio está mediado por alteraciones en el entorno uterino de las vacas receptoras.

El posible inconveniente práctico de realizar la TE solo en las receptoras que expresan celo reduciría la proporción de receptoras transferidas/tratadas, lo que se ha demostrado como uno de los principales beneficios de usar programas de TETF en receptoras en Sudamérica (Bó *et al.*, 2002, 2012b; Baruselli *et al.*, 2010, 2011). Sin embargo en un estudio reciente (Cedeño *et al.*, 2018) reportó también que las receptoras que mostraron celo tuvieron más altas tasas de preñez que aquellas que no mostraron celo, y lo más importante fue que las receptoras que no mostraron celo tuvieron una mayor tasa de pérdidas embrionarias/fetales entre los 30 y 60 días, mayores pérdidas fetales entre los 60 días y el parto y consecuentemente una menor tasa de partos. Además, con respecto a los tratamientos de sincronización las tasas de preñez no fueron diferentes entre el protocolo J-Synch y el convencional, no confirmando los estudios previos en los que las tasas de preñez fueron 8,5% mayor con el protocolo J-Synch (Menchaca *et al.*, 2015a).

Otro experimento fue diseñado para evaluar el efecto de la duración del proestro en la fertilidad de vaquillonas de carne (cruzas Angus y Angus, n = 911; Núñez-Olivera *et al.*, 2016), utilizando el protocolo J-Synch con 300 UI de eCG. Los animales fueron asignados en tres grupos para recibir la GnRH y la IATF a las 48, 60 o 72 h. El diámetro del folículo más grande (medido por ultrasonografía) y la expresión del celo usando pintura en la base de la cola se registraron en un subconjunto de vaquillonas (n = 525) en el momento de la IATF. El folículo de mayor tamaño registrado fue más pequeño en promedio (P<0.05) cuando se realizó GnRH / IATF a las 48 h en comparación con las 60 o 72 h. Además, más vaquillonas tendieron a mostrar celo a las 72 h (P <0.1) que a las 48 o 60 h. Aunque la tasa de preñez general tendió a ser mayor (P <0.1) en vaquillonas inseminadas a las 72 h que a las 48 o 60 h, la tasa de preñez fue significativamente mayor (P <0.05) entre vaquillonas cíclicas (es decir, con CL en el Día 0) en aquellas IATF a las 72 h que en aquellas IATF a las 48 o 60 h. En las

vaquillonas no cíclicas, la tasa de preñez no difirió entre los grupos (58,9%, 247/419). Entre las vaquillonas que mostraron celo en el momento de la IATF, la tasa preñez fue mayor ( $P < 0.05$ ) en aquellas IATF a las 72 h (70.1%, 96/137) que en aquellas IATF a las 60 h (56.7%, 68/120;  $P < 0.05$ ), mientras que a las 48 h fue intermedio (63.9%, 78/122).

Se propuso que las vaquillonas que manifiestan celo antes podrían ser inseminadas antes sin afectar la tasa de preñez, pero fue necesario poder determinar el tiempo óptimo para la IATF en aquellas que no muestran celo. Para responder a esta pregunta, 1.283 vaquillonas cruzas Angus y Hereford fueron tratadas con el protocolo J-Synch y todas las vaquillonas fueron pintadas en la base de la cola durante el retiro del DIV. Las vaquillonas recibieron GnRH y la IATF a las 60 o 72 h, independientemente de la eliminación de la pintura (Bó *et al.*, 2018). La tasa de preñez fue mayor en aquellas que mostraron celo antes de la IATF que en aquellas que no lo hicieron independientemente del tiempo de inseminación (53,6%, 542/1.012 vs 45,0%, 122/271, respectivamente,  $P < 0.05$ ). La tasa de preñez en vaquillonas que estaban en celo a las 60 h fue similar si la GnRH y la IATF se realizaron a las 60 o 72 h. Sin embargo, en aquellas que no mostraron celo, la tasa de preñez fue mayor cuando la GnRH y la IATF se realizaron a las 72 h (52%, 45/143) que a las 60 h (37%, 47/128). La consecuencia práctica de este resultado es que cuando los rebaños grandes están sincronizados (es decir, 400 a 500 cabezas), el DIV se puede retirar en la tarde del día 6 y la IATF comienza a las 60 h (día 9 AM) en todas las vaquillonas con pintura alterada; aquellas con la pintura intacta podrían separarse para recibir GnRH y la IATF en la tarde del día 9 (es decir, alrededor o después de las 72 h).

Bó *et al.* (2018) evaluaron la necesidad de administrar GnRH en aquellas vaquillonas que ya habían mostrado celo antes de la IATF. Se realizó un experimento con 1879 vaquillonas Angus que fueron tratadas de manera similar al estudio anterior. Todas las vaquillas que mostraron celo a las 60 h (85%, 1594/1879) fueron IATF en ese momento, pero la GnRH se administró a solo la mitad. Las vaquillonas que no mostraron celo a las 60 h recibieron GnRH y la IATF a las 72 h. La tasa de preñez en las vaquillonas que habían manifestado celo a las 60 h no difirió si recibieron o no

GnRH (56,2% 451/802 vs 58,6% 464/792, respectivamente), pero la tasa de preñez fue mayor en aquellas que no mostraron celo a las 60 h y recibieron GnRH y la IATF a las 72 h (40,4%, 115/285;  $P < 0.05$ ). Por lo tanto, con el uso de pintura en la base de la cola, el costo del tratamiento podría reducirse al administrar GnRH a solo el 25-30% de las vaquillonas que no muestran celo.

En el Experimento 5 no hubo diferencias en la tasa de preñez en vaquillonas de leche cuando fueron tratadas con J-Synch e inseminadas con semen sexado (con detección de celo) o semen convencional (sin detección de celo e IATF a las 72 h). En el grupo Sexado, 72% de las vaquillonas fueron inseminadas a las 72 h, mientras que 16% y 8% de las vaquillonas fueron inseminadas a las 96 h y 120 h respectivamente. El 4% de las vaquillonas de este grupo no tuvieron signos de celo (permanecieron pintadas) y no fueron inseminadas. Este resultado puede explicarse debido a que los animales que manifiestan celo antes de ser IATF resultan en mayores tasas de preñez debido a la mayor concentración sérica de estradiol preovulatorio, mayor diámetro folicular, mayor tasa ovulatoria y por tanto desarrollaron un CL con mayor capacidad secretoria de progesterona durante la fase luteal (Perry *et al.*, 2005; 2007; Sá Filho *et al.*, 2011). Esto además se relaciona con una mejor calidad y estadio embrionario y con un número mayor de espermatozoides accesorios en la fecundación (Larimore, *et al.*, 2015). El momento de inseminación en las vaquillonas pudo haber jugado un rol importante cuando los animales fueron IA a celo detectado. La ovulación en las vacas normalmente ocurre a las 24 y 32 h del inicio del celo (Trimberger, 1948; Walker *et al.*, 1996). Luego de la ovulación el ovocito tiene un período corto para ser fecundado. La viabilidad media de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra se estima entre 24 y 30 h (Trimberger, 1948). El periodo óptimo de inseminación con semen sexado está entre las 16 y 24 del inicio del celo. En los animales inseminados a celo detectado con semen sexado pudo potenciar los resultados logrando un momento óptimo de inseminación.

El uso del semen sexado ha despertado un gran interés en la inseminación de vaquillonas lecheras en los últimos 20 años; sin embargo, el uso generalizado del semen sexado fue algo limitado debido a que la fertilidad se vio comprometida, especialmente

con la IATF (DeJarnette *et al.*, 2011). Sin embargo, se mejoró el procedimiento de clasificación y se lanzó un nuevo producto llamado SexedULTRA, con la opción de aumentar el número de espermatozoides de  $2,1 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  espermatozoides por pajueta (Vishwanath, 2015).

Se diseñaron una serie de experimentos recientes para determinar la tasa de preñez usando modificaciones de los protocolos existentes basados en estradiol y P4 para el semen sexado. Se realizaron dos experimentos con vacas Nelore lactando que recibieron el protocolo convencional para IATF de la siguiente manera: DIV de P4 y 2 mg de BE el día 0, retiro del DIV, PGF2 $\alpha$ , 300 UI de eCG y 1 mg de CPE el día 8 y la IATF a las 60 h después del retiro del DIV (Baruselli *et al.*, 2017). En el primer experimento, 796 vacas fueron IA con semen sexado (seleccionado por hembra) y semen convencional (no sexado) de tres toros Nelore diferentes. Los grupos experimentales fueron: 1) semen convencional con  $20 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis; 2) Semen Legacy (método previo de sexado), semen sexado con  $2,1 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis; 3) SexedULTRA con  $2,1 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis y 4) SexedULTRA 4.0, semen sexado con  $4,0 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis. No se detectaron diferencias entre los toros ( $P = 0.15$ ). Aunque la tasa de preñez fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo de semen convencional (56%, 112/199), las vacas en el grupo SexedULTRA 4.0 tuvieron mayor tasa de preñez (43%, 86/200) que aquellas en el grupo Legacy 2.1 (28%, 58/206). En las vacas inseminadas con sexedULTRA 2.1, la tasa de preñez fue intermedia (38%, 72/191) y no diferente de los otros grupos inseminados con semen sexado.

En un segundo experimento, 613 vacas fueron tratadas como en el primer experimento e inseminadas con semen de tres toros Angus. Los grupos experimentales fueron 1) semen convencional (no sexado,  $20 \times 10^6$  de espermatozoides); 2) SexedULTRA 4.0 y 3) SexedULTRA Pure 4.0 (se extrajeron los espermatozoides muertos). Un subgrupo de 431 vacas se pintó en la base de la cola para la determinación del celo en el momento de la IATF. La tasa de preñez entre los toros no fue diferente ( $P = 0.12$ ). En general la tasa de preñez no fue diferente entre los grupos (semen convencional: 51,2%, 107/209; SexedULTRA 4.0: 42,0%, 84/200 y SexedULTRA Pure 43,1%, 88/204;  $P = 0.10$ ; Baruselli *et al.*, 2017) Además, en el subgrupo de animales

en el que se registró el celo hubo una interacción significativa entre el tipo de semen y la expresión del celo ( $P < 0.01$ ). En las vacas que mostraron celo, la tasa de preñez no fue diferente entre las vacas inseminadas con semen sexado o no sexado. Por el contrario, en vacas que no mostraron celo la tasa de preñez fue mayor ( $P < 0.05$ ) para el grupo IA con semen convencional respecto al grupo inseminado con SexedULTRA Pure, mientras que la tasa de preñez del grupo inseminado con SexedULTRA 4.0 fue intermedio y no diferente de los otros dos grupos.

Se llevó a cabo otro estudio para evaluar la tasa de preñez en vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch e IA con semen SexedULTRA (Bó *et al.*, 2018). Las vaquillonas de carne mestiza Angus y Angus ( $n=850$ ) se trataron con el protocolo J-Synch con 300 IU de eCG en el retiro del DIV (Día 6) y se pintaron en la base de la cola para determinar la presencia de celos. Las vaquillonas con la pintura alterada a las 60 o 72 h después de la extracción del DIV se subdividieron aleatoriamente en dos subgrupos para ser inseminadas a las 72 h con semen sexado (hembra) de SextraULTRA 4.0 o con semen convencional (no sexado) de los mismos cuatro toros Angus. Las vaquillonas que no mostraron celo a las 72 h recibieron GnRH en ese momento y fueron inseminadas a las 84 h con los mismos dos tipos de semen. 72.7% (618/850) de las vaquillonas mostraron celo a las 60 y 72 h, la tasa de preñez general fue del 54,0% (459/850) independientemente de la expresión de celo. Hubo un efecto significativo ( $P < 0.01$ ) del tipo de semen, el tiempo de IA y de toro en la tasa de preñez, pero no interacciones. La tasa de preñez fue del 64,1% (223/348) para las vaquillonas en celo a las 60 h e inseminadas a las 72 h, 51,8% (140/270) para aquellas en celo e inseminadas a las 72 h, y de 40,9% (95/232) para aquellas que no estaban en celo a las 72 h y fueron inseminadas a las 84 h después del retiro del DIV. En cuanto a los toros, la tasa de preñez varió de 40,5% a 67,8% con semen convencional y de 26,5% a 59,3% con semen SexedULTRA. En resumen, los protocolos diseñados para IATF en vacas y vaquillonas se pueden adaptar para IA con semen sexado.

Aunque, la tasa de preñez es menor que aquella obtenida con semen convencional, retrasar el tiempo de IA o limitar la IA a aquellos animales que muestran celo resultaría en tasas de preñez entre el 40 y 50% o incluso más (Bó *et al.*, 2018).

En resumen, el protocolo J-Synch ha mostrado tener buenos resultados en las tasas de preñez en la IATF, además de su practicidad de aplicación. Un protocolo como el J-Synch, que sólo requiere tres encierres de los animales, sin dudas que se convierte de gran interés por profesionales y ganaderos para su aplicación en rodeos comerciales de carne y leche. A pesar que las diferencias no son significativas en nuestros trabajos con respecto al tratamiento convencional, las tasas de preñez con el protocolo J-Synch han sido mayores que el convencional en todas las réplicas realizadas. Trabajos recientes realizados en razas de carne con el protocolo J-Synch, la tasa de preñez fue mayor respecto al protocolo tradicional (Bó *et al.*, 2016, de la Mata *et al.*, 2018). Es importante poder determinar con nuevos estudios, si estos resultados son repetibles en ganado de leche.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

Los resultados de esta esta tesis permiten concluir, que si bien la hipótesis no se ha confirmado, puede mencionarse que en todas las réplicas de tratamientos de IATF que formaron parte de esta tesis, los protocolos que permiten un proestro prolongado (Co-Synch de 5 días y J-Synch) mostraron resultados superiores en la tasa de preñez respecto al tratamiento Convencional.

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

La duración del proestro (intervalo de la remoción del DIV hasta la ovulación) son mayores en las vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch y Co-Synch de 5 días que las que recibieron el tratamiento Convencional (en 21 y 14 h, respectivamente).

El tamaño del folículo preovulatorio es mayor para el grupo Co-Synch de 5 días respecto a los grupos J-Synch y Convencional.

Las tasas de preñez obtenidas al utilizar los protocolos que prolongan el proestro no difieren de las obtenidas con el protocolo Convencional. Sin embargo, se destaca que en todas las réplicas realizadas, el protocolo J-Synch obtuvo valores absolutos superiores en tasas de preñez que el protocolo Convencional. Además, se observó una tendencia a favor del grupo J-Synch respecto al grupo Convencional en las vaquillonas que resultaron preñadas respecto a las ovuladas ( $P < 0.09$ ). El grupo Co-Synch de 5 días resultó intermedio.

La concentración de progesterona es mayor en las vaquillonas que recibieron los

protocolos que permiten un proestro prolongado (Co-Synch de 5 días y J-Synch) respecto al protocolo Convencional (proestro corto) en la fase luteal subsiguiente.

Para el protocolo J-Synch la hora de ovulación ocurre en promedio 7 h antes cuando la GnRH se aplicó a las 56 h respecto a las 72 h. El diámetro del folículo ovulatorio es menor para el grupo DIV 1 g y GnRH 56 h y tiene menor concentración de P4 a los 11 días de ocurrida las ovulaciones.

La tasa de preñez es mayor para los animales tratados con el protocolo J-Synch y que recibieron el DIV 0,5 g respecto a los animales que recibieron el DIV 1 g. A su vez, la concentración de P4 en la fase luteal subsiguiente, es mayor para los animales tratados con el DIV de 0,5 g.

El tratamiento J-Synch es eficiente para sincronizar la ovulación de vaquillonas de leche. Además, el protocolo J-Synch, logró tasas de preñez aceptables en vaquillonas IA con semen sexado, combinando la detección de celos por observación de pintura luego del retiro del DIV.

La detección de celos en el protocolo J-Synch es una alternativa para lograr tasas de preñez con semen sexado semejantes a las obtenidas mediante la IATF (sin detección de celos) con semen convencional.

### BIBLIOGRAFÍA

- Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* 61:57-66.
- Ahmad N., Schrick F.N., Butcher R.L., Inskeep E.K. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52:1129 –35.
- Alberio, R.H. 2003. Nuevas biotecnologías reproductivas. Aspectos biológicos y económicos. V Simposio de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba, Argentina. 293-322.
- Allrich R.D. 1994. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2738-2744.
- Astiz S. and Fargas O. 2013. Pregnancy per AI differences between primiparous and multiparous high-yield dairy cows after using Double Ovsynch or G6G synchronization protocols. *Theriogenology* 79:1065-1070.
- Atkins J.A., Busch D.C., Bader J.F., Keisler D.H., Patterson D.J., Lucy M.C., Smith M.F. 2008. Gonadotropin-releasing hormone-induced ovulation and luteinizing hormone release in beef heifers: effect of day of the cycle. *J. Anim. Sci.* 86:83-93.
- Atkins J.A., Smith M.F., Wells K.J., Geary T.W. 2010. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter and ovulation rate to GnRH in postpartum beef cows Part I: Cycling cows. *J. Anim. Sci.* 88:2300-2310.
- Atkins J.A., Smith M.F., MacNeil M.D., Jinks E.M., Abreu F.M., Alexander L.J., Geary T.W. 2013. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J. Anim. Sci.* 91: 722- 733.
- Baruselli P.S., Marques M.O., Carvalho N.A.T., Berber R.C.A., Valentim R., Carvalho Filho A.F., Costa Neto W.P. 2003. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo Ovsynch para inovulação em tempo fixo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40:96-106.
- Baruselli P.S., Ferreira R.M., Sá Filho M.F., Nasser L.F.T., Rodrigues C., Bó G.A. 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:67-74.

- Baruselli P.S., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Gimenes L.U., Sá Filho M.F., Martins C.M., Rodrigues C.A., Bó G.A. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76:1583-1593.
- Baruselli P.S., Vieira L.M., Batista E.O.S., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Gimenes L.U., Torres-Junior J.R.S., Martins C.M., Sá Filho M.F., Bó G.A. 2015. Produção in vivo e in vitro de embriões bovino. Atualização sobre estratégias de produção de embriões. *SBTE* 52-60.
- Baruselli P.S., Campos Filho E.P., Crepaldi G.A., Panazzollo S.G., Zanatta G.M., Colli M.H.A., Mingoti R.D., Cruz G.C., Castro M.W. 2017. New strategies to improve pregnancy rate at TAI using sex-sorted semen. *Anim. Reprod.* 14:711. (Abstract).
- Bavera, G. A. 2005. Inseminación artificial. Publicado en internet, disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Bello N.M., Steibel J.P., Pursley J.R. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3413-3424.
- Binelli, M., Pugliesi, G., Hoeck, V. V., Sponchiado, M., Ramos, R. S., Oliveira, M. L., França, M. R., D'Alexandri, F. L., Mesquita, F. S., and Membrive, C. M. B. 2014. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim. Reprod.* 11:246–253.
- Bisinotto, R. S., and Santos, J. E. P. 2012. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:258–266.
- Blanco Sereno M., Bartolome J. 2013. Tasas de concepción en vaquillonas utilizando un protocolo de 5 días con o sin GnRH en su inicio y diferentes dispositivos de progesterona y prostaglandinas. *Taurus* 15(57):26-33.
- Blondin P. 2015. Estado de produção de embriões no mundo. *SBTE* 33-35.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Caccia M., Tribulo H., Mapletoft R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41:1555-1569.
- Bó G.A., Adams G.P., Caccia M., Martínez M., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39:193-204.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1995b. Exogenous control of follicular development in cattle. *Theriogenology* 43:31-40.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 2000. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen ear implants. *Anim. Reprod. Sci.* 59:141-157.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Martinez M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular

- development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78:307-326.
- Bó G.A., Bergfelt D.R., Brogliatti G.M., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1996a. Systemic versus local effects of exogenous estradiol on follicular development in heifers. *Theriogenology* 45:333. (Abstract).
- Bó G.A., Caccia M., Martínez M., Mapletoft R.J. 1996b. Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. Proc. 13<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tríbulo R., Tríbulo H., Mapletoft, R.J. 2002. The control of follicular wave development for selfappointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57:53-72.
- Bó G.A., Cutaia L., Chesta P., Balla E., Picinato D., Peres L., Maraña D., Avilés M., Menchaca A., Veneranda G., Baruselli P.S. 2005. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. Resúmenes de VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. 24 al 26 de Junio: 97-128.
- Bó G.A., Peres L.C., Cutaia L.E., Picinato D., Baruselli P.S. and Mapletoft R.J. 2012. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:272–277.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Mapletoft R.J. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.* 10:137-42.
- Bó G.A., Huguenine E. y Menchaca A. 2014a. Control farmacológico del ciclo estral para IATF en vacas de cría: estado del arte. *Taurus* 76-94.
- Bó G.A., de la Mata J.J., Ré M.G., Huguenine E. y Menchaca A. 2014b. Inseminación Artificial a Tiempo Fijo utilizando tratamientos que acortan el periodo de inserción del dispositivo con progesterona y alargan el proestro. *Taurus* 95- 100.
- Bó G.A., de la Mata J.J., Baruselli P.S., Menchaca A. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86:388–396.
- Bó G.A., Cedeño A., Tribulo A., Andrada S., Tribulo R., Mapletoft R.J. 2017. Influence of estrus expression and treatment with GnRH on pregnancy rates in beef cattle synchronized with progesterone devices and estradiol and inseminated at a fixed time. *Reprod. Fertil. Dev.* 29:111. (Abstract).
- Bó G.A. and Cedeño A. 2018. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. *Animal Reproduction* 15:224-230.

- Bó G.A., Huguenine E., de la Mata J.J., Núñez-Olivera R., Baruselli P.S., Menchaca A. 2018. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction* 15(Suppl. 1):952-962.
- Bridges G.A., Helser L.A., Grum D.E., Mussard M.L., Gasser C.L., Day M.L. 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843-851.
- Bridges G.A., Mussard M.L., Burke C.R., and Day M.L. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117:208-215.
- Bridges G.A., Mussard M.L., Pate J.L., Ott T.L., Hansen T.R., Day M.L. 2012a. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim. Reprod. Sci.* 133:16-26.
- Bridges G.A., Ahola J.K., Brauner C., Cruppe L.H., Currin J.C., Day M.L., Gunn P.J., Jaeger J.R., Lake S.L., Lamb G.C., Marquezini G.H.L., Peel R.K., Radunz A.E., Stevenson J.S., Whittier W.D. 2012b. Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F2 $\alpha$  in the five-day Co-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 90:4814-4822.
- Bridges G.A., Day M.L., Geary T.W., Cruppe L.H. 2013. Triennial Reproduction Symposium: Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J. Anim. Sci.* 91:3002-3013.
- Bridges G.A., Mussard M.L., Helser L.A., Day M.L. 2014. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day Co-Synch+ CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology* 81:632-638.
- Brogliatti G. 2003. Inseminación artificial a tiempo fijo. Publicado en internet, disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Brogliatti G.M. 2006. Manejo eficiente de la inseminación a tiempo fijo. Publicado en internet, disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Bryan M.A., Bo G.A., Heuer C., Emslie F.R. 2010. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronised AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:1-6.
- Bryan M.A., Bó G.A., Mapletoft R.J., Emslie 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.
- CABIA. 2014. Cámara Argentina de biotecnología de la reproducción e inseminación artificial. Publicado en internet, disponible en [http://181.119.20.20/cabia/Estadisticas\\_Cabia\\_2014\\_corregido.pdf](http://181.119.20.20/cabia/Estadisticas_Cabia_2014_corregido.pdf)
- Caccia M. and Bo G.A. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B

- implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 49:341. (Abstract).
- Cedeño A., Tríbulo P., Tríbulo A., Barajas J.L., Ortega J.A., Andrada J.S., Lozano D., Monguillot I., Brandan A., Tribulo R., Tribulo H., Bó G.A. 2018. Effect of synchronization treatment and estrus expression on conception rates and pregnancy losses in recipients receiving in vitro produced embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 30:181. (Abstract).
- Cerri R.L., Rutigliano H.M., Chebel R.C., Santos J.E. 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 137:813-823.
- Cesaroni G., Butler H.M., Durand M.J. 2007. Evaluación del uso de dos ésteres de estradiol sobre la tasa de fertilidad a la IATF en vacas secas, tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona. Resúmenes de VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. 29, 30 de Junio y 1 de Julio: 242 (Abstract).
- Colazo M.G., Martínez M.F., Whittaker P.R., Kastelic J.P. and Mapletoft R.J. 2002. Estradiol cypionate (ECP) in CIDR-B- based programs for fixed-time IA in beef heifers. *Theriogenology* 57:371. (Abstract).
- Colazo M.G., Martínez M.F., 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-timed AI in CIDR treated beef heifers given GnRH or estradiol Cypionate and diets supplemented with flax seed or sunflower seed. *Theriogenology* 61:1115-24.
- Colazo M.G., Dias F.C., Lightfoot K., Dochi O., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 2007. Pregnancy rate following timed-AI in beef heifers treated with Cue-mate and pLH or GnRH. *Reprod. Fert. Dev.* 19:122.
- Colazo M.G., Gordon M.B., Rajamahendran R., Mapletoft R.J., Ambrose D.J. 2009. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with gonadotropin releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 72:262-270.
- Colazo M.G., Ambrose D.J. 2011. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers. *Theriogenology* 76:578-588.
- Colazo M.G., Dourey A., Rajamahendran R., Ambrose D.J. 2013a. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. *Theriogenology* 79:833-841.

- Colazo M.G., Ponce-Barajas P., Ambrose D.J. 2013b. Pregnancy per AI in lactating dairy cows subjected to two different intervals from presynchronization to initiation of Ovsynch protocol. *J. Dairy. Sci.* 96:7640-7648.
- Colazo M.G. 2014. Protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en *Bos Taurus*. Conferencia: Nuevas Biotécnicas reproductivas utilizadas en la producción del ganado bovino, At Santo Domingo, Ecuador.
- Colazo M.G., Mapletoft R.J. 2017. Pregnancy per AI in Holstein heifers inseminated with sex-selected or conventional semen after estrus detection or timed-AI. *Can. Vet. J.* 58:365-370.
- Colazo M.G., Whittaker P., Macmillan K., Bignell D., Boender G., de Carvalho Guimaraes R., Mapletoft R.J. 2018. Evaluation of a modified GnRH-based timed-AI protocol associated with estrus detection in beef heifers inseminated with sex-selected conventional semen. *Theriogenology* 118:90-95.
- Cutaia L. 2006. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF): una herramienta para el mejoramiento genético. Publicado en internet, disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Cutaia L., Veneranda G., Tribulo R., Baruselli P.S. y Bó G.A. 2003. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. Resúmenes de V Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba, Argentina. 27 al 29 de Junio: 119-132.
- Cutaia L., Balla E., Bó G.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. Resúmenes de VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. 27 al 29 de Junio. 394 (Abstract).
- Cutaia L. y Bó G.A. 2006. Uso de la tecnología de IATF en rodeos lecheros. Publicado en internet, disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Davis A.J., Rorie R.W., Powell J.G., Lester T.D., Lindsey B.R. 2014. Serial use of EstroTECT™ estrous detection patches as a reproductive management tool. *Animal Science Department Report in Arkansas* 18-20.
- Davoodi S., Cooke R.F., Fernandes A.C., Cappellozza B.I., Vasconcelos J.L., Cerri R.L. 2016. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology* 85:645-655.
- Day M.L. 2015. State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim. Reprod.* 79:1-4.
- De Castro T., Valdez L., Rodriguez M., Benquet N., Rubianes E., 2004. Decline in Assayable Progesterone in Bovine Serum under Different Storage Conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 36:381-384.

- DeJarnette J.M., Leach M.A., Nebel R.L., Marshall C.E., McCleary C.R., Moreno J.F. 2011. Effects of sexsorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. *J. Dairy. Sci.* 94:3477-3483.
- de la Mata J.J., Bó G.A. 2012. Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos con benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Taurus* 55:17-23.
- de la Mata J.J. C.A. de la Mata and G.A. Bó. 2013. Evaluación del grado de despintado en la base de la cola sobre la tasa de preñez en vaquillonas Angus sincronizadas con un protocolo de IATF. 10° Simposio Internacional de Reproducción Animal, Pabellón Argentino, Córdoba, Argentina. Resúmenes pp. 308. (Abstract).
- de la Mata J.J., Núñez-Olivera R., Cuadro F., Bosolasco D., de Brun V., Meikle A., Bó G.A. and Menchaca A. 2018. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* En prensa.
- de La Sota R.L., Risco C.A., Moreira F., Burke J.M., Thatcher W.W. 1998. Evaluation of timed insemination during summer-heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 49:761-770.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (s.f.). *InfoStat* versión 2015. Obtenido de Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.: <http://www.infostat.com.ar>.
- Diskin M.G., Walters S.M., Parr M.H. and Kenny D.A. 2016. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reprod. Fertil. Dev.* 28:83–93.
- El-Zarkouny S.Z., Cartmill J.A., Hensley B.A., Stevenson J.S. 2004. Presynchronization of estrous cycles before Ovsynch and progesterone in dairy cows: Ovulation, pregnancy rates, and embryo survival. *J. Dairy Sci.* 87:1024-1037.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Roma, 2015. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Roma, 2016. El clima está cambiando. La alimentación y la agricultura también.
- Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65:178:191.
- Folman Y., Kaim M., Herz Z., Rosenberg M. 1990. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. Effects of progesterone and parity on conception. *J. Dairy Sci.* 73:2817.
- Galvão K.N., Santos J.E.P., Juchem S.O., Cerri R.L.A., Coscioni A.C., Villaseñor M. 2004. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol

using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 82:3508-3517.

- Galvão K.N., Sá Filho M.F., Santos J.E.P. 2007. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:4212-4218.
- Garner D.L., Seidel G.E. Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69:886-895.
- Geary T.W., Downing E.R., Bruemmer J.E., Whittier J.C. 2000. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. *Prof. Anim. Sci.* 16:1-5.
- Geary T.W., Whittier J.C., Hallford D.M., MacNeil M.D. 2001. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-Synch protocols. *J. Anim. Sci.* 79:1-4.
- Geary T.W., Smith M.F., MacNeil M.D., Day M.L., Bridges G.A., Perry G.A., Abreu F.M., Atkins J.A., Pohler K.G., Jinks E.M., Madsen C.A. 2013. Triennial Reproduction Symposium: Influence of follicular characteristics at ovulation on early embryonic survival. *J. Anim. Sci.* 91:3014-3021.
- Giacusa N., Cutaia L., Bó G.A. 2005. Efecto de la utilización de cipionato de estradiol como inductor de ovulación aplicado al momento del retiro de un dispositivo con P4 o 24 h más tarde sobre los porcentajes de preñez en vacas con cría. Resúmenes de VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. 27 al 29 de Junio. 404 (Abstract).
- Gnemmi G. y Maraboli C. 2014. La ultrasonografía en los programas de sincronización. *Taurus* 56-69.
- Jinks E.M., Smith M.F., Atkins J.A., Pohler K.G., Perry G.A., MacNeil M.D., Roberts A.J., Waterman R.C., Alexander L.J., Geary T.W. 2013. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91:1176-1185.
- Kasimanickam R., Day M.L., Rudolph J.S., Hall J.B., Whittier W.D. 2009. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology* 71:762-767.
- Kasimanickam R., Asay M., Firth P., Whittier W.D. 2012. Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef heifers synchronized with five-day Co-Synch + controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology* 77:1624-1631.
- Kasimanickam R., Firth P., Schuenemann G.M., Whitlock B.K., Gay J.M., Moore D.A., Hall J.B., Whittier W.D. 2014. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2a in a 5-day progesterone-based Co-Synch protocol on heifer pregnancy.

- Kastelic J.P., Bergfelt D.R., Ginther O.J., 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33:1269–1278.
- Lamb G.C., Dahlen C.R., Larson J.E., Marquezini G., Stevenson J.S. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 88:181-192.
- Lamb G.C., Stevenson J.S., Kesler D.J., Garverick H.A., Brown D.R., Salfen B.E. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79:2253-2259.
- Larimore E.L., Amundson O.L., Bird S.L., Funnell B.J., Kruse S.G., Bridges G.A. and Perry G.A. 2015. Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 93:2806–2812.
- Lima F.S., Ayres H., Favoreto M.G., Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Baruselli P.S., Risco C.A., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2011. Effects of gonadotropin releasing hormone at initiation of the 5-day timed artificial insemination (AI) program and timing of induction of ovulation relative to AI on ovarian dynamics and fertility of dairy heifers. *J. Dairy. Sci.* 94:4997-5004.
- Lima F.S., Ayres H., Favoreto M.G., Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Baruselli P.S., Risco C.A., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2013. Hormonal manipulations in the 5- day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 96:7054-65.
- Lonergan P., Forde N. and Spencer, T. 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 66–74.
- López-Helguera I., Whittaker P., Behrouzi A., Mapletoft R.J., Colazo M.G. 2018. Effect of initial GnRH and time of insemination in reproductive performance in cyclic and acyclic beef heifers subjected to a 5-d Co-Synch plus progesterone protocol. *Theriogenology* 106:39-45.
- Macmillan K., Loree K., Mapletoft R.J., Colazo M.G. 2017. Short communication: optimization of a timed artificial insemination program for reproductive management of heifers in Canadian dairy herds. *J. Dairy Sci.* 100:4134-4138.
- Macmillan K.L., Thatcher W.W. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45:883-889.
- Madero S., De Dominis O., Cantalops F., Uslenghi G., Callejas S. 2007. Efecto de dos dosis de cipionato de estradiol administradas al finalizar un tratamiento con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF. Resúmenes de VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. 29, 30 de Junio y 1 de Julio: 226. (Abstract).

- Madsen C.A., Perry G.A., Mogck C.L., Daly R.F., MacNeil M.D. and Geary, T.W. 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 158:96–103.
- Mann, G.E. 2009. Corpus luteum size and plasma progesterone concentrations in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 115:296–299.
- Marcantonio, S.A. 2007. Inseminación a tiempo fijo. Publicado en internet, disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Mapletoft R.J., Colazo M.G., Martínez M.F., Kastelic J.P. 2003. Ésteres de estrógenos para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. Resúmenes de V Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba, Argentina. 27 al 29 de Junio: 55-67.
- Martínez M.F., Adams G.P., Bergfelt D., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 57:23-33.
- Martínez M.F., Kastelic J.P., Adams G.P., Janzen E., McCartney D., Mapletoft R.J. 2000. Estrus synchronization and fertility in beef cattle given a CIDR and estradiol or GnRH. *Can. Vet. J.* 41:786-790.
- Martínez M.F., Kastelic J.P., Adams G.P., Cook R.B., Olson W.O., Mapletoft R.J. 2002. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology.* 57:1049-1059.
- Martinez M.F., Kastelic J.P., Bo G.A., Caccia M., Mapletoft R.J. 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotropin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 86:37-52.
- Meikle A., Sahlin L., Ferraris A., Masironi B., Blanc J.E., Rodriguez-Irazoqui M., Rodriguez-Piñón M., Kindahl H. and Forsber M. 2001. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor a and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 68:45–56.
- Menchaca A., Dutra S., Carrau J.M., Sapriza F., Salazar J., de la Mata J.J., Bo G.A. 2015a. Melhoría da taxa de prenhez com o protocolo de 6 dias J-Synch em vacas receptoras de embriões produzidos in vitro. SBTE 291. (Abstract).
- Menchaca A., Cuadro F., Núñez R., Bó G.A. 2015b. Pregnancy rates in beef heifers synchronized with shortened estradiol-based treatment that provides for a prolonged proestrus. *Reprod. Fertil. Dev.* 27:96. (Abstract).
- Mesquita F.S., Pugliese G., Scolari S.C., França M.R., Ramos R.S., Oliveira M., Papa M.C., Meirelles M.M., Silva L.A., Nogueira G.P., Membrive C.M.B. and Binelli M. 2014. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology* 81:861–869.

- Moreira F., de la Sota R.L., Diaz T., Thatcher W.W. 2000. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 78:1568-1576.
- Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F., Thatcher W.W. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1646-1659.
- Moreira F., Flores R., Boucher J., Chenault J. 2004. Effects of CIDR inserts on first service pregnancy rates of lactating dairy cows submitted to a presynch program and on re-resynchronization of second service in Mexico. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1):256. (Abstract).
- Moreno D., Cutaia L., Villata M.L., Ortisi F., Bo G.A. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 55:408. (Abstract).
- Mussard M.L., Burke C.R., Gasser C.L., Behlke E.J., Colliflower K.A., Grum D.E. and Day M.L. 2003a. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulate dominant follicles of early or late maturity. *Biol. Reprod.* 68(Suppl. 1):332. (Abstract).
- Mussard M.L., Burke C.R., Day M.L. 2003b. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. *Proc. Annu. Conf. Soc. Theriogenol.* 79:185-197.
- Mussard M.L., Burke C.R., Behlke E.J., Gasser C.L., Day M.L. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* 85:937-43.
- Naciones Unidas. Nueva York, 2014. La situación demográfica en el mundo, 2014. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales. División de Población.
- Núñez-Olivera R., de Castro T., García-Pintos C., Bó G.A., Piaggio J., Menchaca A. 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol-based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 146:111-116.
- Perry G.A., Smith M.F., Lucy M.C., Green J.A., Parks T.E., MacNeil M.D., Roberts J.A., Geary T.W. 2005. Relationship between follicular size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:5268-73.
- Perry G.A., Smith M.F., Roberts A.J., MacNeil M.D., Geary T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85:684-689.
- Perry G.A. 2017. Efecto de la madurez folicular sobre el establecimiento de la preñez. In: *Proceedings XII Simposio Internacional de Reproduccion Animal, 2017, Córdoba,*

Argentina. Córdoba: IRAC. 171-190.

- Peterson C., Alkar A., Smith S., Kerr S., Hall J.B., Moore D., Kasimanickam R. 2011. Effects of one versus two doses of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha on IA pregnancy rates in a 5-day progesterone-based, Co-Synch protocol in crossbred beef heifers. *Theriogenology* 75:1536-1542.
- Pfeifer L.M., Siqueira L.G.B., Mapletoft R.J., Kastelic J.P., Adams G.P., Colazo M.G., Singh J. 2009. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology* 72:1054-1064.
- Pursley J.R., Mee M.O., Wiltbank M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub>α and GnRH. *Theriogenology* 44:915-923.
- Pursley J.R., Wiltbank M.C., Stevenson J.S., Ottobre J.S., Garverick H.A., Anderson L.L. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation of synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80:295-300.
- Pursley J.R., Silcox R.W., Wiltbank M.C. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2139-2144.
- Pursley J.R., Fricke P.M., Garverick H.A., Kesler D.J., Ottobre J.S., Stevenson J.S., Wiltbank M.C. 2001 NC-113 Regional Research Project. Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. Midwest Branch ADSA 2001 Meeting, Des Moines, IA; 63 (Abstract).
- Pursley J.R., Martin J.N. 2011. Control farmacológico de la función del folículo y del cuerpo lúteo para mejorar la fertilidad en las vacas lecheras en lactación. XVI Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina. Avila; 11-13 de Mayo de 2011. 180-185.
- Rabaglino M.B., Risco C., Santos J.E., Thatcher M.J. 2009. Estrategias de manejo para optimizar la eficiencia reproductiva en vaquillonas lecheras de reemplazo. VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina, Córdoba, Argentina.
- Rabaglino M.B., Risco C.A., Thatcher M.J., Lima F., Santos J.E.P., Thatcher W.W. 2010a. Use of a five-day progesterone-based timed AI protocol to determine if flunixin meglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. *Theriogenology* 73:1311-8.
- Rabaglino M.B., Risco C., Thatcher M.J., Kim I.H., Santos J.E., Thatcher W.W. 2010b. Application of one injection of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in the five-day Co-Synch+CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93:1050-58.
- Ré M.G., Ré J.G., Sala J.L., Carnevale I. 2015. Análisis de Gestión Agropecuaria Establecimiento Don Orlando, período 2014-15. Software de Gestión CREA.

- Revah I. and Butler W.R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 106:39–47.
- Ribeiro E.S., Cerri R.L.A., Bisinotto R.S., Lima F.S., Silvestre F.T., Favoreto M.G., Greco L.F., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2011. Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. *J. Dairy Sci.* 94:4984-4996.
- Richardson B.N., Hill S.L., Stevenson J.S., Djira G.D., Perry G.A. 2016. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci.* 166:133-140.
- Rivera H., Lopez H., Fricke P.M. 2005. Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed AI and for synchronizing return to estrus in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 88:957-968.
- Saacke R.G., Dalton J.C., Nadir S., Nebel R.L., Bame J.H. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:663–77.
- Sá Filho M.F., Torres-Júnior J.R.S., Penteado L., Gimenes L.U., Ferreira R.M., Ayres A., Castro e Paula L.A., Sales J.N.S., Baruselli P.S. 2010. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 118:182-187.
- 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* 76:455-465.
- Sanchez T., Wehrman M.E., Bergfeld E.G., Peters K.E., Kojima F.N. Cupp A.S., Mariscal V., Kittok R.J., Rasby R.J., Kinder J.E. 1993. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. *Biol. Reprod.* 49:1102–7.
- Santos J.E.P., Narciso C.D., Rivera F., Thatcher W.W., Chebel RC. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:2976-2988.
- Shojaei Saadi H.A., Vigneault C., Sargolzaei M., Gagné D., Fournier E., de Montera B., Chesnais J., Blondin P., Robert C. 2014. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics* 15:889.
- Seidel Jr. G.E. 2014. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8:160-164.
- Sirois J., Fortune J.E. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of

- exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127(2):916-925.
- Small J.A., Colazo M.G., Kastelic J.P., Erickson N.E., Mapletoft R.J. 2010. Effects of presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, fixed-time artificial insemination in beef heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 90:23-34.
- Sosa C., Carriquiry M., Chalar C., Crespi D., Sanguinetti C., Cavestany D., and Meikle A. 2010. Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone–insulin-like growth factor system throughout the estrous. *Anim. Reprod. Sci.* 122:208–214.
- Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Wiltbank M.C. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 70:208-215.
- Souza A.H., Cunha A.P., Silva E.P.B., Gumen A., Ayres H., Guenther J.N., Wiltbank M.C. 2009. Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows: efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. *Theriogenology* 72:271-279.
- Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W., Burghardt R.C. and Palmarini, M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.* 19:65–78.
- Sterry R.A., Silva E., Kolb D., Fricke P.M. 2009. Strategic treatment of anovular dairy cows with GnRH. *Theriogenology* 71:534-542.
- Stevenson J.S., Pursley J.R., Garverick H.A., Fricke P.M., Kesler D.J., Ottobre J.S., Wiltbank M.C. 2006. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J. Dairy Sci.* 89:2567-2578.
- Stevenson J.S. 2011. Alternative programs to presynchronize estrous cycles in dairy cattle before timed artificial insemination program. *J. Dairy Sci.* 94:205-217.
- Stahringer R.C., Vispo P.E., Prieto P.N., Fogliatti G. 2011. Evaluación del pintado en a base de la cola en protocolos de IATF en vacas Bradford pluríparas. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, pp. 335. Córdoba, Argentina.
- Thatcher W.W., Macmillan K.L., Hansen P.J., Drost M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31:149-164.
- Thatcher W.W., Drost M., Savio J.D., Macmillan K.L., Schmitt E.J., Entwistle K.W., De la Sota R.L., Morris G.R. 1993. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 33:27-49.
- Thibiera M. and Wagner H.G. 2000. World statistics for artificial insemination in cattle. Proc. 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Stockholm,

Sweden; 2:76. (Abstract).

- Thomas J.M., Locke J.W.C., Vishwanath R., Hall J.B., Ellersieck M.R., Smith M.F. 2017. Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology* 98:88-93.
- Thundathil J., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 1997. Effect of estradiol cypionate administration on ovarian follicular wave dynamics in cattle. *Can. J. Vet.* 61:314-316.
- Trimberger G.W. 1948. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. *Nebraska Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 153:1-26.
- Twagiramungu H., Guilbault L.A., Proulx J.G., Dufour J.J. 1994. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. *J. Anim. Sci.* 72:1796-1805.
- Twagiramungu H., Guilbault L.A., Dufour J.J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 73:3141-3151.
- Valdez K.E., Cuneo S.P., Gorden P.J., Turzillo A.M. 2005. The role of thecal production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *J. Anim. Sci.* 85:597-603.
- Vasconcelos J.L.M., Silcox R.W., Pursley J.R., Wiltbank M.C. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52:1067–1078.
- Vasconcelos J.L.M., Sartori R., Oliveira H.N., Guenther J.G. and Wiltbank M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56:307–314.
- Vishwanath R. 2015. Sexed sperm vs conventional sperm – a comparative discussion. *Proceedings 7<sup>th</sup> Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Symposium, Davis, CA.* 250-256.
- Walker W.F., Nebel R.L. and McGilliard M.L. 1996. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 79:1555-1561.
- Whittier W.D., Currin J.F., Schramm H., Holland S., Kasimanickam R.K. 2013. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day Co-Synch + CIDR or 7-day Co-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology* 80:963-969.
- Wiltbank M.C. y Haughian J.M. 2003. GnRH: de la fisiología a la “Sinc”-ología. V Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. 71-84.

Wiltbank M.C., Souza A.H., Carvalho P.D., Bender R.W., Nascimento A.B. 2012. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:238-243.