



IRAC  
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL CÓRDOBA



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

---

**EFEECTO DE LA PERMANENCIA DEL DISPOSITIVO  
CON PROGESTERONA Y DOSIS ADICIONAL DE  
PROSTAGLANDINA SOBRE LA DINÁMICA  
FOLICULAR Y TASA DE PREÑEZ EN VACAS  
LECHERAS SINCRONIZADAS CON EL  
PROTOCOLO CO-SYNCH**

**Emilio Paúl Ochoa Mejía**

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, 2019**



IRAC  
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL CÓRDOBA



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

---

**EFECTO DE LA PERMANENCIA DEL DISPOSITIVO CON  
PROGESTERONA Y DOSIS ADICIONAL DE PROSTAGLANDINA  
SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR Y TASA DE PREÑEZ EN  
VACAS LECHERAS SINCRONIZADAS CON EL PROTOCOLO  
CO-SYNCH**

**Emilio Paúl Ochoa Mejía**

**Comisión Asesora de la Tesis**

**Director:** Med. Vet. M.Sc., Dr. Rafael Antonio Ochoa .....

**Co-Director:** Med. Vet. M.Sc., Ph.D. Gabriel A. Bó .....

**Tribunal examinador de la Tesis**

Med. Vet. M.Sc., Dr. Santiago Callejas .....

Med. Vet. Dr. Andrés Tribulo .....

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

**Presentación Formal Académica**

**Córdoba, 24 de Junio de 2019**

Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la vida, fortaleza y perseverancia para seguir adelante cada día.

A mi Director de tesis el Dr. Rafael A. Ochoa y a mi Co-Director de tesis el Dr. Gabriel A. Bó por todo el apoyo, interés y compromiso brindado para el desarrollo de este estudio. A ellos quienes con su experiencia me supieron guiar y motivar en todo el proceso de investigación.

Al tribunal examinador de tesis Dr. Santiago Callejas, Dr. Andrés Tribulo y Dr. Juan Carlos Tschopp por sus correcciones y sugerencias realizadas.

También agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba, al Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC), a todos sus docentes y colaboradores que me abrieron la puerta de la institución, me brindaron y compartieron sus conocimientos para mi formación profesional y personal.

A todas las autoridades y compañeros del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI – Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, quienes me brindaron las facilidades en sus instalaciones y tiempo para el desarrollo de esta maestría.

A los propietarios de los predios ganaderos que me dieron la apertura para realizar los ensayos en sus animales e instalaciones, a su personal de campo por su colaboración en todo momento.

Y a todas las personas que de alguna u otra manera aportaron para el desarrollo de esta investigación. A todos muchas gracias.

Emilio Paúl Ochoa Mejía

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de manera especial a mis padres Graciela y Emilio que me formaron como persona, por todo su infinito amor, esfuerzo y apoyo incondicional. Gracias a ellos soy quien soy y me esfuerzo cada día para ser mejor persona.

A todos mis familiares y amigos que han sido un apoyo fundamental y han puesto su confianza en mí.

Emilio Paúl Ochoa Mejía

## RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo de la permanencia del dispositivo con progesterona y la adición de la segunda dosis de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) sobre la dinámica folicular y tasa de preñez en vacas lecheras sincronizadas con el protocolo CO-Synch + progesterona (P4) por 4 y 5 días. El mismo se desarrolló en establecimientos lecheros del Cantón Biblián, de la provincia del Cañar, en la serranía ecuatoriana. Para ello se realizaron tres experimentos en hembras bovinas de la raza Holstein Friesian en lactación. En el Experimento 1, pese a que se registró un 14,6% más de tasa de preñez a la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) en las vacas que recibieron dos dosis de PGF (56,9%) que en las que recibieron una dosis de PGF (42,3%), no hubo significancia estadística, por lo que para el desarrollo de los siguientes experimentos se optó por utilizar en los tratamientos la doble dosis de PGF en intervalo de 12 horas. En el Experimento 2, el diámetro del folículo ovulatorio y la tasa de ovulación no difirieron entre las vacas que fueron tratadas con el programa CO-Synch + P4 por 4 (4-D) o 5 días (5-D). La concentración sérica de P4 fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las vacas del tratamiento 4-D únicamente al día de la remoción del dispositivo de progesterona, mientras que el intervalo de ovulación a partir del retiro del dispositivo de progesterona no difirió entre tratamientos. Por otro lado, el área del CL luego de la ovulación, fue mayor ( $P < 0,01$ ) en las vacas que recibieron el tratamiento 5-D. El tratamiento 5-D resultó en tasas de preñez numéricamente mayores que el tratamiento 4-D (62,5% vs 53,1% respectivamente); sin embargo, no se registraron significancias estadísticas. Finalmente, en el Experimento 3 el porcentaje de animales que presentaron estro, así como la hora de presentación de estro no registró significancia estadística. La tasa de preñez tampoco difirió entre los tratamientos 4-D y 5-D (51,4% vs 58,7%). Sin embargo, se comprobó que el estro influye positivamente ( $P < 0,01$ ) sobre la fertilidad en los animales tratados con los tratamientos de 4 y 5 días. En conclusión, el protocolo CO-Synch + P4 por 4 días con el uso de doble dosis de prostaglandina en intervalo de 12 horas, genera similares tasas de preñez que el tratamiento de 5 días, por lo que puede ser una alternativa para uso en vacas lecheras en lactación por las prestaciones y facilidades de su horario de aplicación.

**Palabras clave:** CO-Synch, progesterona, IATF, vacas lecheras.

## ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the effect of the period of insertion of a the progesterone device and the addition of a second dose of prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF) on follicular dynamics and pregnancy rates in dairy cows synchronized with the CO-Synch + progesterone (P4) protocol for 4 or 5 days. The experiments were performed in dairy farms of Cantón Biblián, in the province of Cañar, in the Ecuadorian highlands. Three experiments were carried out in lactating Holstein cows. In Experiment 1, although the pregnancy rate to Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) was 14.6% higher in cows that received two doses of PGF (56.9%) than in those that received only one dose of PGF (42.3%), there was no statistical significance. Therefore, a double dose of PGF was used in Experiments 2 and 3. In Experiment 2, the diameter of the ovulatory follicle and the ovulation rate did not differ between cows that were treated with the CO-Synch + P4 program for 4 (4-D) or 5 days (5-D). The serum concentration of P4 was higher ( $P < 0.05$ ) in the cows in the 4-D treatment only on the day of the removal of the progesterone device, while the ovulation interval after removal of the progesterone device did not differ between treatments. On the other hand, the CL area after ovulation was higher ( $P < 0.01$ ) in the cows that received the 5-D treatment. The 5-D treatment resulted in numerically higher pregnancy rates than the 4-D treatment (62.5% vs 53.1% respectively); however no statistical significance was recorded. Finally, in Experiment 3, the percentage of animals that showed estrus, as well as the time of presentation of estrus, did not differ between treatments. The pregnancy rate also did not differ between the 4-D and 5-D treatments (51.4% vs 58.7%). However, estrus positively influenced ( $P < 0.01$ ) the fertility to FTAI in the animals treated with the 4 and 5 day treatments. In conclusion, the CO-Synch + P4 protocols for 4 days, with the use of double dose of PGF, results in similar pregnancy rates than the treatment of 5 days, so it can be an alternative treatment for use in lactating dairy cows, for the benefits and facility of its application schedule.

**Key words:** CO-Synch, progesterone, IATF, dairy cows.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>CAPÍTULO 1.</b>	
INTRODUCCIÓN .....	1
Control farmacológico del ciclo estral bovino .....	2
Dinámica folicular .....	3
Control exógeno de la emergencia de nuevas ondas foliculares.....	5
Uso de la GnRH para controlar la emergencia folicular .....	6
Tratamientos con progesterona exógena .....	7
Sincronización de la ovulación con protocolos Ovysynch y CO-Synch.....	8
Duración del proestro en el programa CO-Synch + progesterona.....	9
Protocolo CO-Synch + progesterona de 5 días .....	10
HIPÓTESIS .....	13
OBJETIVO GENERAL .....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>CAPÍTULO 2.</b>	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Animales e instalaciones .....	14
Experimento 1.....	16
Experimento 2.....	17
Experimento 3.....	18
Ultrasonografía .....	19
Obtención de muestras sanguíneas.....	20
Radioinmunoensayos para progesterona .....	21
Expresión del estro .....	21

Inseminación.....	22
Diagnóstico de gestación.....	22
Análisis estadístico.....	23
 <b>CAPÍTULO 3.</b>	
RESULTADOS .....	24
Experimento 1.....	24
Experimento 2.....	25
Experimento 3.....	32
 <b>CAPÍTULO 4.</b>	
DISCUSIÓN .....	36
 <b>CAPÍTULO 5.</b>	
CONCLUSIONES .....	43
 <b>CAPÍTULO 6.</b>	
BIBLIOGRAFÍA.....	44



## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Interpretación de porcentaje de remoción de la pintura.....	22
Tabla 3.1. Tasas de preñez a la IATF para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 1.....	24
Tabla 3.2. Tasas de preñez a la IATF para vacas lecheras, según repetición de los tratamientos en el Experimento 1.....	25
Tabla 3.3. Estado reproductivo de las vacas al inicio del Experimento 2.....	25
Tabla 3.4. Respuesta ovárica (media±SEM) en vacas lecheras sometidas a diferentes tratamientos en el Experimento 2.....	27
Tabla 3.5. Área de CL y concentraciones séricas de P4 al Día 15 post IATF (media±SEM) en vacas Holstein Friesian sometidas al Experimento 2.....	31
Tabla 3.6. Tasa de preñez a la IATF para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 2.....	31
Tabla 3.7. Tasa de detección del estro para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.....	32
Tabla 3.8. Tasa de preñez según expresión de estro para las vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.....	34
Tabla 3.9. Tasa de preñez según horas de presentación de estro para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.....	34
Tabla 3.10. Tasa de preñez según réplica para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Vacas Holstein Friesian en establecimiento “El Refugio” en el cantón Biblián de la provincia del Cañar, pertenecientes a la réplica 3 del Experimento 2.....	15
Figura 2.2. Examen ultrasonográfico a una hembra bovina del establecimiento “El Progreso”, al inicio la réplica 4 del Experimento 3.....	15
Figura 2.3. Ilustración del tratamiento de IATF CO-Synch + P4 de 5 días con una o dos dosis de PGF para vacas lecheras en el Experimento 1.....	16
Figura 2.4. Tratamientos para vacas lecheras del Experimento 2.....	17
Figura 2.5. Diseño del Experimento 3 en el que se combinó detección de estro e IATF en vacas lecheras sincronizadas con tratamiento CO-Synch + P4 de 4 y 5 días con dosis adicional de PGF.....	18
Figura 2.6. Ecógrafo KAIXIN RKU10, utilizado en la investigación.....	20
Figura 2.7. Ecografía gestacional.....	22
Figura 3.1. Intervalo del tiempo de ovulación en horas desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación con los diferentes tratamientos para las vacas del Experimento 2.....	28
Figura 3.2. Distribución de las ovulaciones luego de la sincronización con los diferentes tratamientos para las vacas del Experimento 2.....	29
Figura 3.3. Concentración sérica de P4 según días de tratamiento en vacas lecheras del Experimento 2.....	30
Figura 3.4. Respuesta sobre el porcentaje de celo registrado a las 48, 60, 72, 84 horas posterior al retiro del implante de progesterona en vacas lecheras tratadas del Experimento 3.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg .....	Microgramo
°C .....	Grados centígrados
ARNm .....	ARN mensajero
CC .....	Condición corporal
CIDR .....	Liberación interna controlada de medicamentos
CL .....	Cuerpo lúteo
cm .....	Centímetro
DISP .....	Dispositivo intravaginal impregnado con progesterona
E2 .....	Estradiol
FD .....	Folículo dominante
FSH .....	Hormona folículo estimulante
g .....	Gramos
GnRH .....	Hormona liberadora de gonadotropinas
h .....	horas
IA .....	Inseminación artificial
IATF .....	Inseminación artificial a tiempo fijo
LH .....	Hormona luteinizante
mg .....	Miligramo
MHz .....	Megahertz
ml .....	Mililitro
mm .....	Milímetro
mm <sup>2</sup> .....	Milímetro cuadrado
msnm .....	Metros sobre el nivel del mar
ng .....	Nano gramo
P .....	Probabilidad
pg .....	pico gramos
PGF .....	Prostaglandina F2α
P4 .....	Progesterona
P/IA .....	Porcentaje de preñez a la inseminación artificial

rpm .....	Revoluciones por minuto
SEM .....	Error estándar de la media
US .....	Ultrasonografía

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad de las vacas lecheras durante el período de lactancia y la deficiencia en la detección oportuna del estro se ha convertido en un problema crítico que limita la rentabilidad y sustentabilidad de las ganaderías de leche (Dick, 1990). La disminución en los porcentajes de fertilidad asociados a los avances genéticos, el manejo y la nutrición (Thatcher *et al.*, 1996), han incentivado el desarrollo de tratamientos hormonales que permitan mejorar el desempeño reproductivo mediante el control farmacológico del ciclo estral bovino (Pursley *et al.*, 1995).

Investigaciones realizadas sobre los principios endócrinos y fisiológicos de la hembra bovina han mejorado la base del conocimiento de los patrones de las ondas foliculares para el desarrollo de protocolos farmacológicos que permiten una estrecha sincronía entre el celo y la ovulación (Bisinotto y Santos, 2011). El uso de protocolos hormonales que sincronizan la ovulación combinados con la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) son biotecnologías reproductivas que, adecuadamente aplicadas, permiten maximizar el potencial reproductivo, incorporar genética y superar limitaciones incrementando las oportunidades en la fertilidad de las vacas (Vasconcelos *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2014).

Para sincronizar la ovulación e IATF se dispone de innumerables combinaciones farmacológicas; sin embargo, en los últimos años han sobresalido los programas Ovsynch y sus modificaciones al ser una alternativa para países en donde el uso de fármacos esteroides está restringido (Day y Bridges, 2015). Investigaciones sobre el protocolo CO-Synch han demostrado que la aparición de una onda folicular se sincroniza solo cuando el tratamiento con GnRH causa la ovulación (Martínez *et al.*, 1999). Si la primera GnRH no sincroniza la emergencia de las ondas foliculares, la ovulación después de la segunda GnRH puede estar mal sincronizada, resultando en bajas tasas de preñez (Martínez *et al.*, 2002). La prevención de las ovulaciones tempranas mediante la adición de un dispositivo

con progesterona (P4) al protocolo basado en GnRH de 7 días, ha mejorado las tasas de preñez después de la IATF en vacas de carne y lecheras en lactación (Lamb *et al.*, 2001; El-Zarkouny *et al.*, 2004; Melendez *et al.*, 2006).

En el año 2008, Bridges *et al.*, propusieron acortar el tiempo de permanencia del dispositivo con P4 de 7 a 5 días y prolongar la duración del proestro, obteniendo un incremento del 11% sobre la tasa de preñez en vacas de carne en lactación. Colazo y Ambrose (2011), encontraron una predicción probabilística del 80% de preñez cuando el proestro era de 72 horas, siendo menor la fertilidad cuando la IATF era en menor tiempo. Desde entonces se han evaluado las variaciones del protocolo CO-Synch + P4 de 5 días, basados en la combinación de GnRH y dispositivo de P4 al Día 0, removiendo el implante y administrando prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) en dosis única o doble al Día 5 (Bridges *et al.*, 2012), finalizado con la aplicación de una segunda dosis de GnRH e IATF a las 72 horas del retiro el dispositivo. Estas variaciones han permitido obtener elevadas tasas de preñez en vacas de leche en lactación (Bisinotto *et al.*, 2010; Fricke *et al.*, 2016). Sin embargo, los requerimientos y momentos ideales de la aplicación de la PGF, así como el tiempo de permanencia del dispositivo de P4 continúa en investigación, por la variabilidad en la luteólisis y en las tasas de gestación para vacas de leche en lactación (Stevenson *et al.*, 2014; Day y Bridges, 2015).

### **Control farmacológico del ciclo estral bovino**

Las consecuencias económicas de la baja eficiencia reproductiva y la escasa precisión en la detección del estro son las razones que han motivado el desarrollo de tratamientos farmacológicos prácticos para la sincronización del celo. Los objetivos sustanciales de cualquier programa de sincronización estral son provocar respuestas predecibles, ovulación en un intervalo de tiempo específico, y obtener tasas de preñez aceptables al primer servicio (Diskin *et al.*, 2002). Para lograr el control del ciclo estral en el bovino, es necesario sincronizar la aparición de nuevas ondas foliculares, asegurar una fase luteal, terminar la fase luteal y sincronizar la ovulación.

## **Dinámica folicular**

La dinámica folicular es el proceso continuo de crecimiento y regresión de un grupo de folículos antrales, donde uno de ellos se desarrolla hasta formar un folículo preovulatorio (Lucy, 1992). Este proceso se repite simultáneamente en ondas (Rajakoski, 1960), durante casi todos los estadios de vida de la hembra bovina, incluyendo el ciclo estral (Driancourt, 2001), la gestación (Ginther *et al.*, 1996) y en ciertas condiciones de anestro (Savio *et al.*, 1990).

A medida que el folículo se desarrolla atraviesa los estados de reclutamiento, selección, dominancia y ovulación (Goodman y Hodgen, 1983). La fase de reclutamiento está dada por el desarrollo de una cohorte de folículos que comienza a madurar bajo un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permitan avanzar hacia la ovulación (Findlay *et al.*, 1992). La fase de selección, es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación (Ko *et al.*, 1991). La fase de dominancia, es el proceso por el cual el folículo seleccionado ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás y es responsable de la mayor secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar su desarrollo en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos (Stock y Fortune, 1993). Los folículos dominantes pueden ser ovulatorios o no ovulatorios, y estos últimos presentan una fase de atresia, la cual consiste en la disminución gradual de su tamaño (Sunderland *et al.*, 1994).

Las ondas de crecimiento folicular en el bovino adulto comienzan cuando hay un aumento en los niveles de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), lo cual promueve el crecimiento simultáneo en los dos ovarios de un grupo de folículos antrales, identificables a partir de 3 – 4 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 1989). Consecutivamente por 2 a 3 días los folículos continúan creciendo, destacándose uno sobre ellos que se convierte en folículo dominante, mientras que los folículos subordinados sufren atresia (Adams *et al.*, 1992). Si la dominancia ocurre en la fase luteal, durante la primera onda, el folículo dominante se atresia por el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la Hormona

Luetinizante (LH); por el contrario, si la dominancia ocurre al tiempo de la luteólisis en los ciclos 2 o 3 ondas, con concentraciones bajas de progesterona, el folículo ovulará.

El folículo seleccionado ejerce dominancia mediante la inhibición de la diferenciación y crecimiento de los folículos subordinados (Ginther *et al.*, 1997). Así, el folículo dominante produce estrógenos e inhibina, hormonas que suprimen la secreción de FSH, lo cual bloquea el crecimiento de los folículos subordinados, ya que ellos dependen totalmente del estímulo de la FSH. En contraste, el folículo dominante continúa creciendo y permanece dominante por un período de 5 a 7 días, a pesar de haber concentraciones bajas de FSH. Esto es debido a que cuando alcanza un diámetro de aproximadamente 8 mm, se expresa de forma única el ARNm para los receptores de LH en las células de la granulosa, que probablemente son la clave para permitir su crecimiento continuo (Ginther *et al.*, 1998).

El folículo dominante con un diámetro superior a 10 mm, es activo en la producción de estrógeno y en gran parte dependiente de LH. La retroalimentación positiva del estrógeno libera una gran cantidad de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH), lo que resulta en un aumento de la LH y la ovulación del folículo dominante (Ginther, 2000). El diámetro del folículo ovulatorio puede oscilar entre 11 y 17 mm en vacas de carne (DesCôteaux *et al.*, 2010) y tener hasta 25 mm en vacas de leche (Wiltbank *et al.*, 2011).

Independientemente del patrón de desarrollo folicular del ciclo, la primera onda de desarrollo folicular se detecta en el día 0, a la ovulación. La segunda onda comenzará el día 9 o 10 para los ciclos de 2 ondas y el día 8 y 9 para en los ciclos de 3 ondas (Ginther *et al.*, 1989). En los ciclos de 3 ondas la tercera emerge en el día 15 o 16. Las características del folículo dominante de la primera onda entre el patrón de 2 ondas y el patrón de 3 ondas son similares, pero la segunda onda emerge 1 a 2 días más temprano en los animales de 3 ondas que en los de 2 ondas (Bó *et al.*, 1993). Además, existe una gran variabilidad individual en cuanto al día de emergencia de la segunda onda que puede comenzar entre los días 6 a 12 (Adams y Pearson, 1995).



Si bien se han descrito que en el 95% de los ciclos estrales hay dos o tres ondas de crecimiento folicular, hay diferencias entre los estudios en cuanto a la preponderancia de los animales con 2 o 3 ondas. Algunos autores han registrado el predominio de ciclos estrales con 2 ondas (Ginther *et al.*, 1989), otros indican una superioridad de ciclos de 3 ondas (Siriois y Fortune, 1988), mientras que otros han registrado una distribución homogénea (Adams y Pearson, 1995). Además, se ha encontrado que algunos animales *Bos indicus* pueden tener ciclos hasta con 4 ondas (Rhodes *et al.*, 1995).

La duración del ciclo estral en la hembra bovina, dependerá principalmente de su patrón de ondas foliculares para ser de 18 a 20 días en los ciclos de 2 ondas, de 21 a 23 días en ciclos con 3 ondas e incluso de 24 a 25 días en los ciclos con 4 ondas (Bó *et al.*, 2008). En estos tres casos el folículo dominante en el momento que ocurre la luteólisis se tornará ovulatorio.

### **Control exógeno de la emergencia de nuevas ondas foliculares**

La inducción de la aparición de nuevas ondas foliculares mediante tratamientos hormonales exógenos requiere de la terminación de la onda folicular existente y la inducción predecible de un aumento transitorio de FSH para desencadenar la aparición de una nueva onda con el crecimiento normal del folículo dominante después de la selección (Driancourt, 2001).

La dependencia primaria de la progresión de la onda folicular en el soporte de gonadotropina ha dado como resultado el uso de esteroides para suprimir FSH - LH y así terminar la onda existente (Bó *et al.*, 1993). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la FSH y la LH están reguladas independientemente (Ginther *et al.*, 1996). En el caso de la FSH, el folículo dominante es el regulador clave de los aumentos o disminuciones que ocurren durante la onda (Ginther *et al.*, 1997). Un enfoque no esteroideo alternativo es la administración de GnRH para inducir aumentos endógenos de LH que causan la ovulación de un folículo dominante existente, induciendo así la emergencia de una nueva onda folicular (Twagiramungu *et al.*, 1995).

## **Uso de la GnRH para controlar la emergencia folicular**

La ovulación del folículo dominante con el uso de la GnRH es un enfoque práctico para la síntesis de una nueva onda folicular. La administración de GnRH produce un aumento inmediato de LH, cuya magnitud es dependiente de la concentración de progesterona y de la presencia o ausencia de un folículo dominante (Thatcher *et al.*, 1996). La GnRH administrada después de la selección del folículo dominante produce su ovulación, con la aparición de una nueva onda de 1,5 - 2,0 días después (Twagiramungu *et al.*, 1995). Sin embargo, cuando se administra GnRH antes de la fase de selección, no afecta la progresión de la onda folicular existente. De esta manera, en vacas tratadas después de la selección del folículo dominante, la ovulación inducida fue seguida por un aumento transitorio en la FSH (pero no en la LH), que se asoció con la aparición de nueva onda folicular (Ryan *et al.*, 1998).

La GnRH sincroniza la aparición de la nueva onda sólo cuando se administra en presencia de un folículo funcional dominante, mientras que si se administra antes de la dominancia parece no afectar el progreso subsiguiente de esa onda (Martínez *et al.*, 1999), presumiblemente debido a la falta de receptores LH en las células de la granulosa del folículo dominante. La separación de los efectos de la GnRH sobre la progresión de la onda folicular es una limitación que debe tenerse en cuenta al utilizarla como tratamiento para sincronizar la emergencia de las nuevas ondas al inicio de los regímenes de sincronización con progesterona o prostaglandina (Vasconcelos *et al.*, 1999).

Una alternativa es asegurar que un folículo dominante viable esté presente en el momento del tratamiento con GnRH. En este sentido, las vacas responderán de forma más consistente cuando se administra GnRH entre los días 5 y 12 del ciclo estral (Moreira *et al.*, 2001), a este protocolo se lo denomina Pre-Synch – Ovsynch.

## Tratamientos con progesterona exógena

Los sistemas de sincronización del estro que incluyen progesterona intravaginal tienen dos ventajas principales. La primera es mantener la concentración de P4 en un nivel mayor que el umbral ( $> 1 \text{ ng / ml}$ ), al suprimir el pico preovulatorio de la LH mientras que el dispositivo está en la vagina, e inducir el comportamiento de celo después de su remoción. Macmillan y Peterson (1993), evaluaron el tratamiento con P4 durante 14 o 21 días, obteniendo una alta respuesta al estro dentro de los 3 días posteriores a la eliminación de la P4; sin embargo, las tasas de concepción después del tratamiento prolongado con P4 fueron 10 – 15% inferiores a las de las vacas tratadas con P4 de corta duración (Roche *et al.*, 1981). La razón de esta baja concepción es que los dispositivos de liberación de P4 intravaginal producen concentraciones de P4 que son más bajas que las de la fase luteal, mientras que la frecuencia de los pulsos de LH y las concentraciones periféricas de estradiol son elevadas. En consecuencia, el folículo dominante sigue recibiendo soporte de LH y no ovula hasta que no se remueva la fuente de P4 (Mihm *et al.*, 1994). Se cree que los cambios ultra estructurales en el ovocito dentro del folículo dominante persistente reducen la fertilidad de las vacas tratadas (Austin *et al.*, 1999).

Menchaca y Chiflet (2015), reportaron que en promedio el 80% de las vacas con cría al iniciar un protocolo de IATF se encuentra en anestro. Siendo esta situación aún más crítica en vacas de segundo entore o primíparas, lo cual será traducido en una menor tasa de preñez, condicionando el desempeño reproductivo en el resto de vida de la vaca (Menchaca *et al.*, 2017). La suplementación con progesterona en una vaca en anestro disminuye inicialmente la LH, pero luego aumenta la pulsatilidad de la LH (Nation *et al.*, 2001). El aumento de la pulsatilidad de la LH incrementa el desarrollo del folículo dominante. La P4 también sensibiliza al sistema nervioso central para la expresión estral y el aumento de la LH. La eliminación de la P4 es seguida por estro, ovulación y una fase luteal de longitud normal en un gran porcentaje de vacas tratadas (Gümen *et al.*, 2003). Por lo tanto, la segunda ventaja de la P4 en los protocolos de sincronización del estro es promover la recuperación del ciclo estral en las vacas con anestro.

## **Sincronización de la ovulación con protocolos Ovsynch y CO-Synch**

El protocolo Ovsynch fue desarrollado para vacas lecheras, e implica una inyección de GnRH en una etapa aleatoria del ciclo estral, seguida de una inyección de prostaglandina 7 días más tarde, y la administración de una segunda inyección de GnRH a las 48 horas de la PGF (Pursley *et al.*, 1995). La primera GnRH tiene la función de sincronizar la onda folicular preovulatoria. Así, la inducción de un aumento de LH seguido por un aumento prolongado de la FSH conduce a una nueva onda folicular (Bodensteiner *et al.*, 1996) y un folículo dominante en el momento del segundo tratamiento con GnRH, que se utiliza para sincronizar el tiempo de ovulación permitiendo una IATF efectiva a las 16 o 20 horas después de la segunda GnRH (Pursley *et al.*, 1998).

Un metaanálisis ha demostrado que la IATF con Ovsynch es similar a la IA con detección de celo, obteniendo así una tasa de preñez del 32% (Rabiee *et al.*, 2005). Generalmente cuando Ovsynch se implementa en una operación de ganado comercial, las vacas están en una etapa aleatoria del ciclo estral, siendo demostrado que la respuesta a Ovsynch difiere de la etapa del ciclo estral en la cual la vaca recibió el primer tratamiento con GnRH (Vasconcelos *et al.*, 1999). Por ejemplo, el tratamiento con GnRH del día 1 a 4 del ciclo estral rara vez dio como resultado ovulación, mientras que el tratamiento con GnRH del día 5 a 9 causó ovulación en casi todas las vacas. Otro estudio también observó que las vacas lecheras que iniciaron Ovsynch en el día 5 a 9 tuvieron mayor fertilidad que las vacas que iniciaron Ovsynch en otros días del ciclo (Keith *et al.*, 2005). Estos resultados y otros resultados similares en vaquillas (Moreira *et al.*, 2000), proporcionaron la base fisiológica para el desarrollo de métodos de presincronización que intentaron maximizar el número de vacas en una etapa más óptima del ciclo estral al inicio de Ovsynch (Moreira *et al.*, 2001; Wiltbank *et al.*, 2017).

El protocolo CO-Synch se fundamenta en los principios del programa Ovsynch, con la diferencia que la segunda inyección de GnRH se administra simultáneamente con la IA (Geary *et al.*, 1998), lo cual proporciona una ventaja en los regímenes de sincronización para vacas de carne porque requiere menos manipulación y encierro de los animales para

los tratamientos e IATF. Sin embargo, se ha demostrado que el programa CO-Synch no aumenta la tasa de preñez en vacas de carne o novillas (Diskin *et al.*, 2002).

### **Duración del proestro en el programa CO-Synch + progesterona**

El programa convencional normalmente utilizado en EEUU y Canadá consiste en el uso de P4 y GnRH, debido a que el uso de estradiol está restringido (Day y Bridges, 2015). En estos países los protocolos que se desarrollaron para vacas lecheras (Pursley *et al.*, 1995) son ampliamente utilizados en los rodeos de carne (Geary *et al.*, 2001). El tratamiento más difundido consiste en la administración de GnRH al momento de colocar el dispositivo con progesterona para inducir la liberación de LH y la ovulación del folículo dominante. El dispositivo se retira 7 días más tarde junto con la administración de una dosis de PGF para inducir la regresión del cuerpo lúteo; posteriormente se administra una segunda dosis de GnRH en el momento de la IATF, aproximadamente 60 horas más tarde. El protocolo CO-Synch con P4 surge como una serie de mejoras realizadas sobre el programa Ovsynch, como la adición de P4 que resuelve algunas debilidades de los protocolos previos (Lamb *et al.*, 2001) y el hecho de administrar GnRH al momento de la inseminación simplifica los tratamientos previos.

La importancia de un proestro prolongado derivó de una serie de estudios que evaluaron la influencia de la madurez folicular sobre la fecundidad en el ganado vacuno (Day, 2015). Para confirmar esta idea, en un experimento en que las vacas fueron inducidas a ovular un folículo con un diámetro similar entre ellas, la tasa de preñez fue mayor en las que recibieron GnRH 2,25 días después de la administración de PGF comparado con las que recibieron GnRH 1,25 días después de la PGF (Bridges *et al.*, 2010). De manera similar en otro estudio sobre un modelo experimental en el que indujeron un proestro largo en comparación con un proestro corto, colocando un dispositivo con P4 por 7,5 u 8 días, y administrando GnRH a las 48 o 36 horas luego del retiro, respectivamente (Binelli *et al.*, 2017). Con este modelo han demostrado que las vacas con el proestro largo tienen un folículo más grande que induce un cuerpo lúteo de mayor tamaño, con mayor producción de P4 y mayor tasa de preñez.

## **Protocolo CO-Synch + P4 de 5 días**

El protocolo CO-Synch de 5 días fue desarrollado en la Universidad Estatal de Ohio en el año 2008, es un tratamiento a base de GnRH que recientemente ha ganado espacio entre profesionales y productores de Norteamérica y ha sido ampliamente recomendado para la IATF en vaquillonas y vacas de carne por obtener tasas de preñez más altas que las obtenidas con métodos tradicionales de CO-Synch de 7 días (Day, 2015). Bridges *et al.*, (2008), compararon un protocolo CO-Synch + P4 intravaginal de 7 días con IATF a las 60 horas y un protocolo CO-Synch + P4 intravaginal de 5 días con IATF a las 72 horas en vacas de carne post parto, obteniendo una tasa de preñez 11% más alta con el programa de 5 días.

La base fisiológica de este tratamiento fue reducir el tiempo de inserción del dispositivo de P4 para evitar los efectos adversos de los folículos persistentes sobre la fertilidad de las vacas que no ovularon a la primera GnRH, y la vez prolongar el periodo de proestro permitiendo altos niveles endógenos de estrógenos (Menchaca *et al.*, 2017). Utilizando este programa, el efecto benéfico del proestro prolongado se ha asociado con concentraciones más altas de estradiol circulante antes de la ovulación y mayores concentraciones de P4 en la fase luteal subsiguiente, especialmente en aquellas vacas que no ovulan después de la primera GnRH (Cruppe y Day, 2011). Por el contrario, en las vacas tratadas con el protocolo CO-Synch de 5 días, las concentraciones endócrinas y foliculares fueron similares entre vacas que ovularon o no ovularon a la primera GnRH (Bridges *et al.*, 2014a).

Algunos resultados muestran que debido a un intervalo más corto entre la primera GnRH y la inducción de la luteólisis en el protocolo CO-Synch de 5 días, una sola administración de PGF no sería eficaz para inducir la luteólisis en vacas de carne (Souto *et al.*, 2009). Kasimanickam *et al.*, (2009) reportaron que la tasa de preñez en las vacas que recibieron doble dosis de PGF tendió a ser mayor sobre las que recibieron una dosis de PGF. A partir de estos resultados en posteriores estudios se investigó la estrategia de aplicación de la PGF en el protocolo de 5 días. Una reducción en el intervalo entre las dos dosis de PGF de 12 a 2 horas produjo similares resultados en un estudio de Cruppe *et al.*,

(2010). En un estudio cuando el intervalo entre las dos dosis de PGF fue inferior a 6 horas, se reportó una reducción en la tasa de preñez (Peel *et al.*, 2012). En otro reporte de campo sobre vacas con cría que recibieron IATF luego del CO-Synch de 5 días (Bridges *et al.*, 2012), la tasa de preñez fue mayor en vacas que recibieron PGF con 8 horas de intervalo que aquellas que recibieron solo una dosis de PGF. Mientras que en otro grupo experimental donde las vacas recibieron dos dosis de PGF al mismo tiempo, la tasa de preñez fue intermedia. Sin embargo, Lima *et al.*, (2011) 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 P4 y dos inyecciones de PGF con 24 h de intervalo, en el momento de la remoción del dispositivo con P4. Las tasas de preñez fueron del 61,7% (439/711) en las que recibieron GnRH en el Día 0 y dos PGF en el Día 5, y 53,0% (376/710) y 55,0% (383/696) en la que no recibieron GnRH en el Día 0 con una o dos dosis de PGF en el Día 5.

El protocolo CO-Synch de 5 días ha sido replicado en diversos tipos de hembras bovinas, obteniendo tasas de preñez superiores al 50% para vacas de carne en lactación (Bridges *et al.*, 2008, 2012; Whittier *et al.*, 2013), e incluso superiores porcentajes de preñez en vaquillonas de razas cárnicas (Kasimanickam *et al.*, 2014; Bridges *et al.*, 2014b). Por otro lado, el uso de este programa en vaquillonas lecheras ha registrado porcentajes de preñez superiores al 45% (Rabaglino *et al.*, 2010a, 2010b; Santos *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2013), mientras que en vacas lecheras se han reportado tan solo tasas de preñez del 35% (Bisinotto *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Fricke *et al.*, 2016).

Un aspecto importante que tiene efecto sobre el éxito de los programas de IATF en las explotaciones lecheras, es pasar por alto la significación de la administración de las inyecciones hormonales en el día y la hora prescrita de acuerdo con el protocolo específico (Palomares *et al.*, 2014). Este aspecto se hace más crítico cuando los ganaderos y veterinarios tratan de evitar el manejo de ganado los fines de semana. Al respecto Palomares *et al.*, (2015) en una investigación sobre vaquillonas lecheras, pretendieron reducir la permanencia del dispositivo de P4 de 5 a 4 días en función de simplificar el manejo reproductivo en las granjas lecheras, obteniendo porcentajes de preñez aceptables y similares, facilitando de esta manera la administración de los tratamientos.

En función de los antecedentes desarrollados, surgió el interés por evaluar el protocolo CO-Synch con la permanencia del dispositivo de P4 por 4 y 5 días en vacas lecheras en lactación, dando origen a los experimentos realizados en la presente tesis.



## **HIPÓTESIS**

La aplicación de dos dosis de prostaglandina F<sub>2α</sub> en intervalo de 12 horas a partir del retiro del dispositivo con P4 incrementa la tasa de preñez en vacas lecheras en lactancia sincronizadas con el protocolo CO-Synch + P4 de 5 días.

La disminución del tiempo de la permanencia del dispositivo con P4 de 5 a 4 días, no afecta la tasa de preñez obtenida en vacas lecheras sincronizadas con el protocolo CO-Synch + P4.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del tiempo de permanencia del dispositivo con P4 y la adición de la segunda dosis de PGF sobre la dinámica folicular y tasa de preñez en vacas lecheras sincronizadas con protocolo CO-Synch + P4 de 4 y 5 días.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar la tasa de preñez en vacas lecheras sincronizadas con protocolo CO-Synch + P4 de 5 días al administrar una dosis única o dos dosis de prostaglandina con un intervalo de 12 horas (Experimento 1).

Evaluar el efecto del tiempo de permanencia del dispositivo con P4 sobre la dinámica folicular, área del cuerpo lúteo y concentración sérica de P4 en vacas lecheras sincronizadas con protocolo CO-Synch + P4 de 4 y 5 días. (Experimento 2).

Evaluar el porcentaje de expresión de celo y la tasa de preñez obtenida en vacas lecheras tratadas con protocolo CO-Synch + P4 de 4 y 5 días. (Experimento 3).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Animales e instalaciones

La presente investigación fue considerada de tipo experimental, longitudinal, cuantitativo y analítico comparativo. Se realizó de enero del 2017 a abril del 2018, en 10 establecimientos lecheros del Cantón Biblián, de la provincia del Cañar, en la serranía ecuatoriana. Estos campos poseen condiciones meteorológicas similares, con temperatura promedio de 12°C, clima mesotérmico húmedo, precipitación de 800 mm/año y una altitud que varía entre los 2800 – 3200 msnm.

Se utilizaron hembras bovinas primíparas y multíparas de la raza Holstein Friesian, las cuales fueron seleccionadas al inicio de los experimentos acorde a los criterios: condición corporal (2,5 a 3,0; escala 1 a 5); número de partos (1 a 3 partos); y días post parto (45 a 90 días). Además, fueron evaluadas mediante ultrasonografía transrectal para determinar presencia de CL o folículo  $\geq$  a 8 mm de diámetro en al menos uno de sus ovarios.

Durante los experimentos, los animales mantuvieron su rutina normal en los hatos. Las vacas permanecían en el potrero durante todo el día, eran ordeñadas de forma manual 2 veces al día (5 am y 5 pm), recibían una ración total mezclada a razón de 200 g/litro de producción, la cual contenía 12,6% de proteína; 5,3% de grasa; 5,9% de fibra; 12,9% humedad y 7,7% de cenizas. También tenían acceso ad libitum al agua. El manejo sanitario empleado para todas las vacas en estudio fue similar, lo cual incluye esquemas periódicos de vacunación, desparasitación, mineralización y vitaminas.



**Figura 2.1.** Vacas Holstein Friesian en establecimiento “El Refugio” en el cantón Biblián de la provincia del Cañar, pertenecientes a la réplica 3 del Experimento 2.

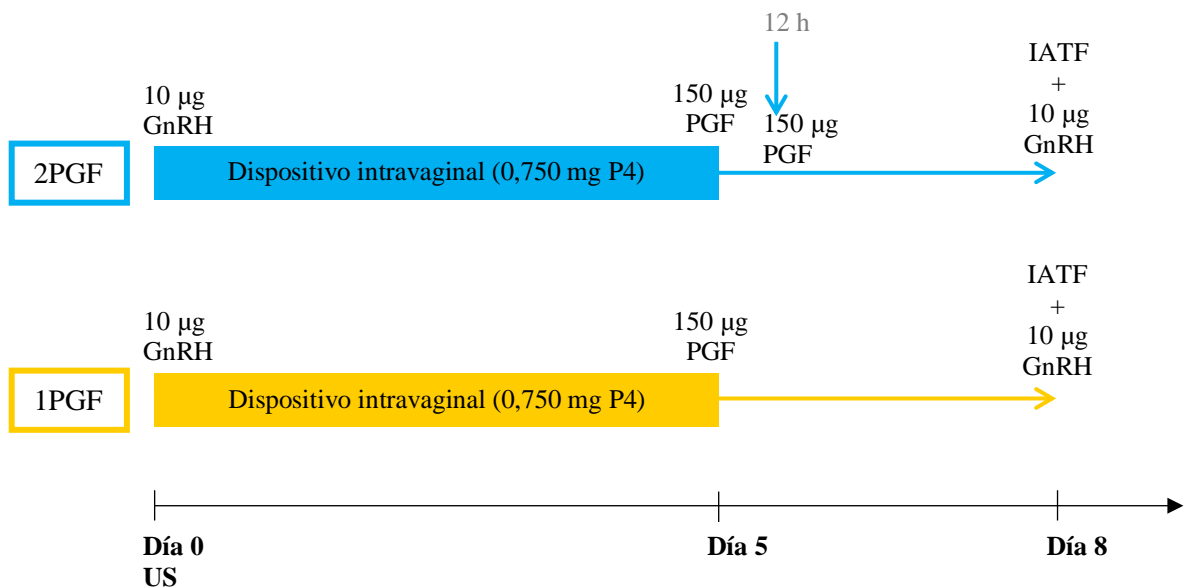


**Figura 2.2.** Examen ultrasonográfico a una hembra bovina del establecimiento “El Progreso”, al inicio la réplica 4 del Experimento 3.

## Experimento 1

En este experimento se realizaron 4 réplicas sobre 103 vacas Holstein Friesian con una condición corporal (CC) promedio de  $2,9 \pm 0,03$ ;  $2,5 \pm 0,1$  número de partos; y  $67,2 \pm 1,4$  días posparto. Las vacas fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos de tratamiento: 2PGF (n=51) y 1PGF (n=52), en función de garantizar la homogeneidad de los grupos de tratamiento.

En el grupo 2PGF, al Día 0 recibieron 10  $\mu$ g de Buserelina Acetato (GnRH, Buserelina®, Zoovet) y un dispositivo liberador de 0,750 g de P4 (Pro-ciclar®, Zoovet). En el Día 5 se retiraron los dispositivos y se les administró una primera dosis de 150  $\mu$ g de D+Cloprostenol (PGF, Ciclar®, Zoovet) y 12 horas más tarde recibieron una segunda dosis de 150  $\mu$ g de D+Cloprostenol (PGF, Ciclar®, Zoovet). En el Día 8, a las 72 horas de la remoción del dispositivo, las vacas fueron IATF y se les administró GnRH. Las vacas del grupo 1PGF, recibieron un dispositivo de P4 y se les administró GnRH en el Día 0. En el Día 5, al retiro de los implantes se les aplicó una dosis única de PGF y en el Día 8 fueron IATF y se les administró GnRH. El diseño experimental puede observarse en la Figura 2.3.

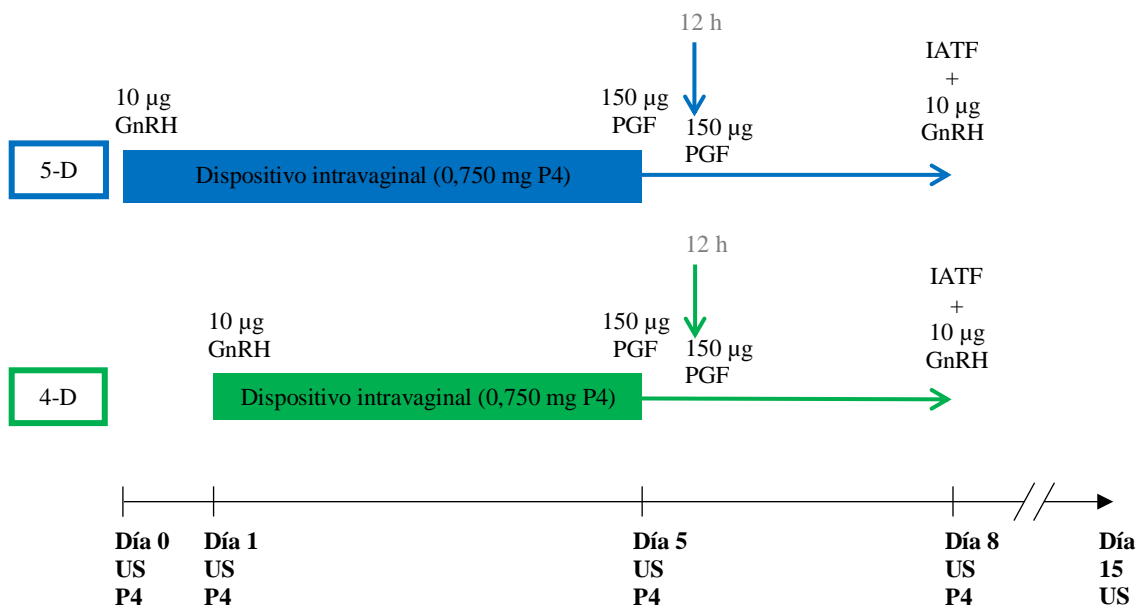


**Figura 2.3.** Ilustración del tratamiento de IATF CO-Synch + P4 de 5 días con una o dos dosis de PGF para vacas lecheras en el Experimento 1.

## Experimento 2

Se utilizaron 64 vacas Holstein Friesian con una CC promedio de  $2,8 \pm 0,04$ ;  $2,0 \pm 0,2$  número de partos y  $67,0 \pm 2,8$  días posparto. Con la finalidad de garantizar la homogeneidad de los grupos de tratamiento, las vacas fueron divididas en dos grupos de tratamiento: 4-D ( $n=32$ ) y 5-D ( $n=32$ ).

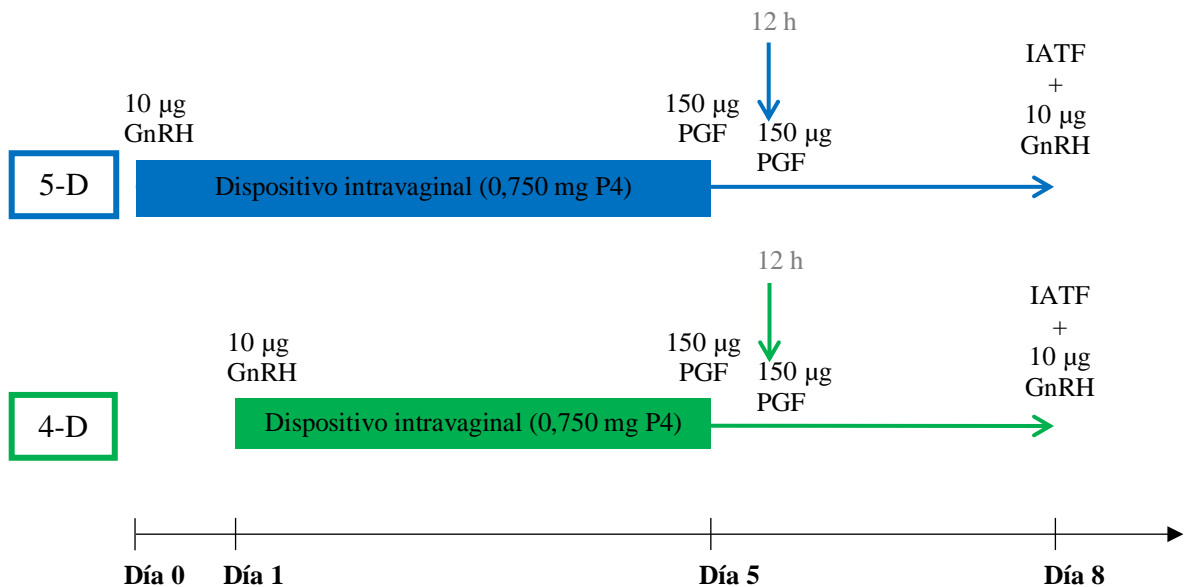
El tratamiento 4-D consistió en la administración en el Día 1 de GnRH y un dispositivo Pro-ciclar®. En el Día 5 se removieron los dispositivos y se les administró una primera dosis PGF y 12 horas más tarde una dosis adicional de PGF. En el Día 8 se les administró GnRH, en tanto que fueron IATF. El tratamiento 5-D, en el Día 0 las vacas recibieron GnRH y un dispositivo Pro-ciclar®. En el Día 5 al retiro del dispositivo, se les administró una dosis de PGF y 12 horas después una segunda dosis de PGF. En el Día 8 las vacas fueron IATF y simultáneamente recibieron GnRH. El diseño experimental puede observarse en la Figura 2.4.



**Figura 2.4.** Tratamientos para vacas lecheras del Experimento 2. *Referencias.* US: Ultrasonografía; P4: progesterona.

### Experimento 3

Para ello se utilizaron 220 vacas lecheras de la raza Holstein Friesian, las cuales fueron sincronizadas en 8 réplicas. Los animales al inicio del experimento tenían una CC promedio de  $2,8 \pm 0,02$ ;  $66,3 \pm 1,4$  días posparto y  $2,1 \pm 0,08$  número de partos. Se dividieron en dos grupos: 4-D ( $n=111$ ) y 5-D ( $n=109$ ). Los tratamientos fueron los mismos que en el Experimento 2, con la diferencia que en el Día 5, en la remoción del dispositivo de P4, se les pintó con el Marcador animal (RAIDEX®), una franja de aproximadamente 20 cm de largo y 5 cm de ancho en la base de la cola, desde la primera vértebra coccígea. El diseño experimental puede observarse en la Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Diseño del Experimento 3 en el que se combinó detección de estro e IATF en vacas lecheras sincronizadas con tratamiento CO-Synch + P4 de 4 y 5 días con dosis adicional de PGF.

## Ultrasonografía

Al inicio de cada tratamiento se realizó un estudio ultrasonográfico a todas las vacas de los tres experimentos, utilizando un equipo KAIXIN RKU10 (Xuzhou, Kaixin Electronic Instrument), provisto con sonda lineal de 6,5 MHz y en modo B. Para ello las vacas fueron inmovilizadas en un cepo donde se efectuó la ultrasonografía transrectal para registrar la ausencia de patologías reproductivas congénitas o adquiridas. Los animales que revelaron alguna alteración en el tracto reproductivo no se incluyeron en el estudio. Además, en el Experimento 2 las vacas de ambos grupos fueron examinadas al inicio del tratamiento, al retiro del dispositivo de P4, a la IATF y al Día 15 post IATF, a fin de registrar las medidas de las principales estructuras ováricas como: diámetro de folículo dominante (FD), diámetro de cuerpo lúteo (CL) y área de CL (Knopf *et al.*, 1989). También, se realizó el seguimiento ultrasonográfico para determinar la dinámica folicular cada 12 horas a partir de la IA hasta las 48 horas post IATF.

El diámetro del FD fue calculado según Kastelic *et al.*, (1990, 1991), en base al promedio de los diámetros horizontal y vertical en milímetros (mm). Para determinar el área del CL también se midieron los diámetros horizontal y vertical. En el caso de los CL que presentaban una cavidad, el área de la misma fue descontada del área total. Se consideró como FD preovulatorio al FD registrado en la última observación y que en su lugar apareció un CL al Día 15 post IATF (Ross *et al.*, 2004).

El momento de ovulación fue definido como el momento en que se registró la desaparición del FD preovulatorio (de la Mata *et al.*, 2018). Mientras que la tasa de ovulación (%) fue definida como la cantidad de vacas cuyo FD preovulatorio desapareció hasta las 48 posteriores a la IATF y en su lugar apareció un CL a la ultrasonografía del día 15 post IATF, en relación al total de animales de cada grupo.



**Figura 2.6.** Ecógrafo KAIXIN RKU10, utilizado en la investigación.

### **Obtención de muestras sanguíneas**

Las muestras de sangre de los animales que conformaron el Experimento 2 fueron colectadas al inicio del tratamiento, al retiro del dispositivo de P4, a la IATF y al Día 15 post IATF, mediante punción de la vena o arteria coccígea medial utilizando tubos para colecta de sangre estériles sin anticoagulante. Los tubos con la muestra sanguínea debieron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, e inmediatamente fueron colocados en un termo con pilas refrigerantes a temperatura de 2 a 8°C y se transportó al laboratorio para su procesamiento dentro de 6 horas de la obtención.

Los tubos con la muestra sanguínea fueron centrifugados a 3.500 rpm por un tiempo de 10 minutos para la obtención de suero. Los sueros obtenidos fueron alicuotados en viales de 2 ml para su almacenamiento a - 20°C hasta su procesamiento.



## **Radioinmunoensayos para progesterona**

Las concentraciones séricas de P4 se midieron aplicando el método inmunoenzimático colorimétrico competitivo con el uso de un kit comercial Progesterone Elisa (DiaMetra®, Italy), acorde al protocolo del fabricante. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de serología del Centro de Referencia Nacional de Zoonosis del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, ubicado en la ciudad de Cuenca. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado para determinar los coeficientes de variación intra e interensayo y sensibilidad (Márquez *et al.*, 1997; De Castro *et al.*, 2004). La sensibilidad del test de acuerdo a la concentración mínima detectable se estimó que fue de 0,05 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron menores o iguales al 4% y 9,3% respectivamente. Todos los sueros fueron analizados simultáneamente.

## **Expresión del estro**

El objetivo principal de los protocolos de sincronización de la ovulación es evitar la detección del calor y realizar la IATF. Sin embargo, en el Experimento 3, los signos de comportamiento del estro fueron evaluados en ambos grupos, después de la remoción del implante de P4, como una medida de la respuesta fisiológica asociada con el tratamiento hormonal (Pires *et al.*, 2016).

Se utilizó el método auxiliar revelador de monta, con el uso de pintura en la base de la cola desarrollado por Macmillan y Curnow (1977), y modificado por Dick (1990). Para ello, posterior al retiro del dispositivo de P4, con el uso de Marcador animal (RAIDEX®), se pintó una franja de aproximadamente 20 cm de largo y 5 cm de ancho en la base de la cola, desde la primera vértebra coccígea.

La pintura se aplicó luego de haber removido cualquier pelo suelto o suciedad por cepillado de la zona de aplicación. La lectura de la pintura se realizó cada 12 horas a partir de las 48 horas de remoción de los dispositivos de P4 (De la Sota, 2000) y la interpretación se realizó según el grado de remoción de pintura (Tabla 2.1; Medina, 2012).

**Tabla 2.1.** Interpretación de porcentaje de remoción de la pintura.

<b>Grado de remoción de la pintura</b>	<b>Estado</b>
Cuando la pintura no se removió	No está en estro
Hasta el 30% de la pintura removida	No está en estro
De 30 al 100% de la pintura removida	Está en estro

### **Inseminación**

Las inseminaciones en todos los experimentos fueron realizadas a las 72 horas de la remoción del dispositivo de P4, por un mismo técnico con experiencia. Se utilizaron dosis de semen comercial provenientes de toros de probada fertilidad, previamente evaluadas basándose en los valores mínimos referidos por Barth A. (1995).

### **Diagnóstico de gestación**

El diagnóstico de gestación en todos los experimentos se realizó al día 35 posterior a la IATF mediante ecografía transrectal. La preñez se confirmó con la identificación del embrión con latido cardiaco.



**Figura 2.7.** Ecografía gestacional. Obsérvese embrión de 35 días post IATF.

## **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS, versión 2015. Las variables cualitativas se estudiaron mediante estadística descriptiva y porcentajes, cuyos valores fueron analizados por pruebas de Chi cuadrado y análisis de homogeneidad de datos por pruebas no paramétricas. Mientras que los resultados de las variables cuantitativas son presentados como  $\text{media} \pm \text{SEM}$  y fueron estudiadas mediante análisis de varianza entre los grupos de estudio de cada experimento. Los valores de  $P < 0,05$  fueron considerados significativos para todos los análisis. Para garantizar la homogeneidad de los grupos de estudio, se analizó la interacción de los grupos con los hatos y repeticiones. Además, se evaluó la interacción de los toros con los experimentos y tratamientos del estudio.

**RESULTADOS**

**Experimento 1**

La tasa de preñez obtenida al día 35 post IATF fue numéricamente mayor en las vacas del grupo 2PGF que para las del grupo 1PGF (56,9% y 42,3%, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos ( $P>0,05$ ; Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Tasas de preñez a la IATF para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 1.

	Tratamientos	
	1PGF	2PGF
<b>Tasa de preñez</b>	42,3%	56,9%
	(22/52)	(29/51)

Los porcentajes no difieren ( $P>0,05$ ).

Al incluir las réplicas en el análisis no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio y subgrupos formados por la interacción de réplica y tratamientos ( $P>0,05$ ; Tabla 3.2). Así como no hubo diferencias significativas entre los toros utilizados para la IATF en ninguna réplica.

**Tabla 3.2.** Tasas de preñez a la IATF para vacas lecheras, según repetición de los tratamientos en el Experimento 1.

	Tratamientos	
	1PGF	2PGF
Réplica 1	42,9% (6/14)	57,1% (8/14)
Réplica 2	38,5% (5/13)	54,5% (6/11)
Réplica 3	46,2% (6/13)	53,8% (7/13)
Réplica 4	41,7% (5/12)	61,5% (8/13)

Los porcentajes no difieren ( $P>0,05$ ).

## Experimento 2

Al inicio de los tratamientos, se observó mediante ultrasonografía la presencia de al menos un CL y un Folículo  $\geq 8$  mm en el 48,4% de los animales. De la misma forma en el 43,8% de las vacas se presentó únicamente un CL visible, mientras que solo en el 7,8% de las vacas se observó Folículos  $\geq 8$  mm. Estos datos nos indican que el 92,2% de los animales estaban ciclando al inicio de los tratamientos, lo cual fue corroborado con el porcentaje de vacas que presentaron alta concentración de P4 ( $P4 > 1$  ng/ml). Al realizar las pruebas de significancia no se encontraron diferencias de estas variables entre los grupos de tratamientos ( $P>0,05$ ; Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Estado reproductivo de las vacas al inicio del Experimento 2\*.

Variable	Tratamientos		Total
	4-D	5-D	
Folículos $\geq 8$ mm y CL	50,0% (16/32)	46,9% (15/32)	48,4% (31/64)
CL	43,8% (14/32)	43,8% (14/32)	43,8% (28/64)
Folículos $\geq 8$ mm	6,3% (2/32)	9,4% (3/32)	7,8% (5/64)
P4 $> 1$ ng/ml	93,8% (30/32)	90,6% (29/32)	92,2% (59/64)

\*El inicio del Experimento 2 fue al Día 1 y Día 0, para las vacas del grupo 4-D y 5-D respectivamente. ( $P>0,05$ ).

El diámetro del folículo dominante al momento de retirar el dispositivo intravaginal de P4 fue de  $8,8\pm 0,4$  mm en el grupo 5-D y de  $8,3\pm 0,5$  mm en el grupo 4-D, lo cual no difirió estadísticamente ( $P>0,05$ ; Tabla 3.4). El porcentaje de vacas que presentaron al menos un CL al momento de administrar la primera dosis de PGF no varió entre grupos y este fue del 90,6% y 93,8% para el grupo 4-D y 5-D respectivamente ( $P>0,05$ ; Tabla 3.4). Se determinó que el 53,1% de los animales del grupo 5-D ovularon con la administración de la primera dosis de GnRH, sobre el 40,6% de los animales del grupo 4-D, sin registrar diferencias estadísticas. Además, en el grupo 5-D se registró una media de  $1,4\pm 0,1$  CL a la aplicación de la primera dosis de PGF, sobre  $1,2\pm 0,1$  de CL en el grupo 4-D, sin presentar significancia estadística.

A la IATF, se obtuvieron muestras sanguíneas, cuantificando las concentraciones de P4 y tabulando los datos por rangos de concentración. De esta forma en el 43,8% y 50,0% de las vacas del tratamiento 4-D y 5-D respectivamente, se registraron concentraciones de P4 entre 0,05 a 0,24 ng/ml; así como en el 28,1% y 34,4% de los animales del tratamiento 4-D y 5-D respectivamente se presentaron concentraciones de P4 de 0,25 a 0,4 ng/ml; mientras que en el 21,9% y 12,5% de las vacas del tratamiento 4-D y 5-D respectivamente, se obtuvieron concentraciones de P4 de 0,5 a 0,9 ng/ml; y solo en el 6,3% y 3,1% de los animales del grupo 4-D y 5-D respectivamente, se determinaron concentraciones de P4 mayores o iguales a 1 ng/ml; sin encontrar diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P>0,05$ ; Tabla 3.4).

Por otro lado, el diámetro del folículo dominante a la IATF y ovulación tampoco difirió estadísticamente entre el grupo 5-D comparado con el grupo 4-D ( $P>0,05$ ; Tabla 3.4). El porcentaje de animales ovulados no varió entre grupos y este fue del 90,6% (29/32) para el grupo 4-D mientras que del 93,8% (30/32) para el grupo 5-D ( $P>0,05$ ; Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Respuesta ovárica (media±SEM) en vacas lecheras sometidas a diferentes tratamientos en el Experimento 2.

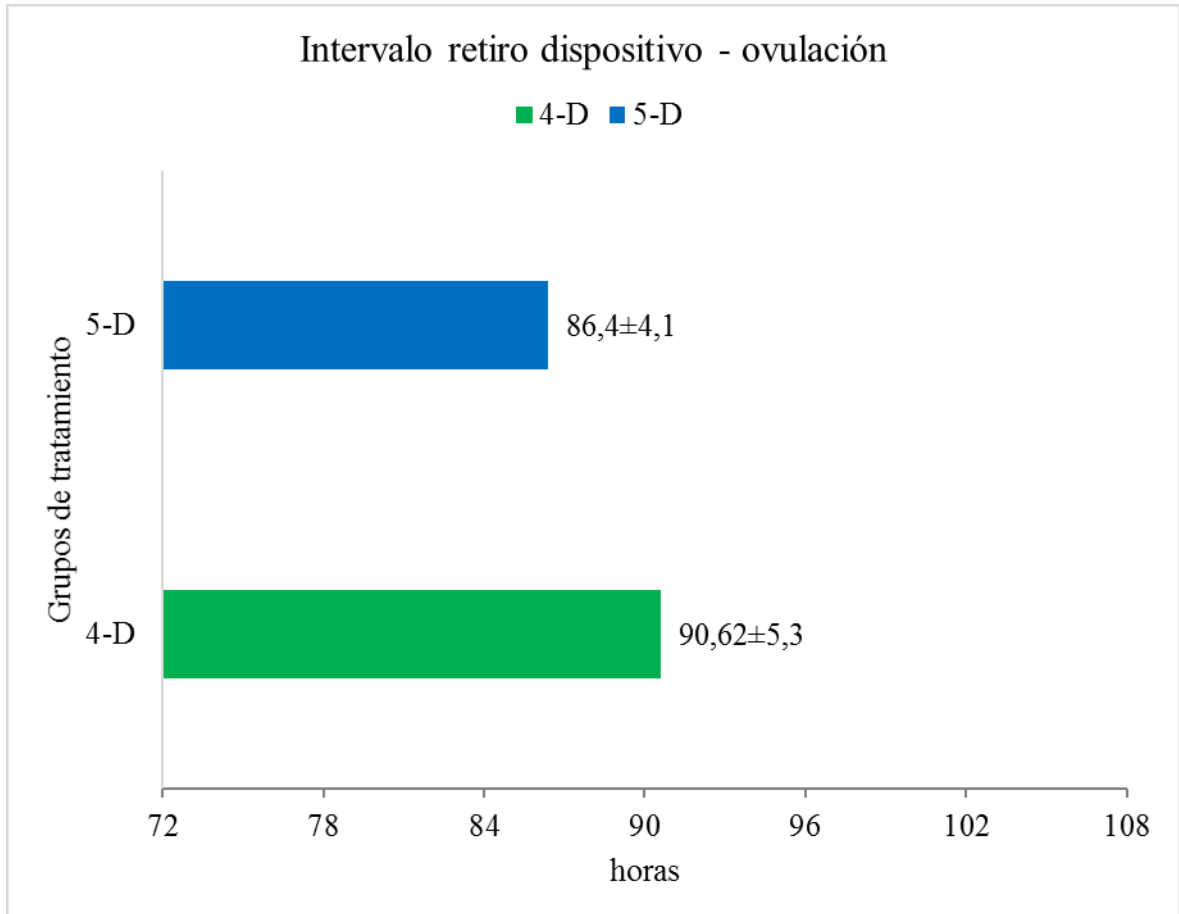
Variable	Tratamientos	
	4-D	5-D
Diámetro del FD al retiro del DISP (mm).	8,3±0,47	8,8±0,41
CL a la 1° PGF (%)	90,6% (29/32)	93,8% (30/32)
Ovulación a la 1° GnRH *	40,6% (13/32)	53,1% (17/32)
Número de CL a la 1° PGF	1,2±0,1	1,4±0,1
Diámetro del FD a la IATF (mm)	13,5±0,4	14,2±0,3
Concentración de P4 a la IATF		
0,05 a 0,24 ng/ml	43,8% (14/32)	50,0% (16/32)
0,25 a 0,4 ng/ml	28,1% (9/32)	34,4% (11/32)
0,5 a 0,9 ng/ml	21,9% (7/32)	12,5% (4/32)
≥ 1 ng/ml	6,3% (2/32)	3,1% (1/32)
Diámetro del FD a la ovulación (mm)	14,5±0,5	14,7±0,7
Tasa de ovulación (%) **	90,6% (29/32)	93,8% (30/32)

Las medias y porcentajes no difieren entre los grupos (P>0,05)

\*Porcentaje de vacas con nuevo CL al Día 5, que tenían folículo ≥ 8 mm al inicio del estudio.

\*\*Porcentaje de vacas cuyo FD preovulatorio desapareció hasta las 48 posteriores a la IATF y en su lugar apareció un CL al Día 15 post IATF.

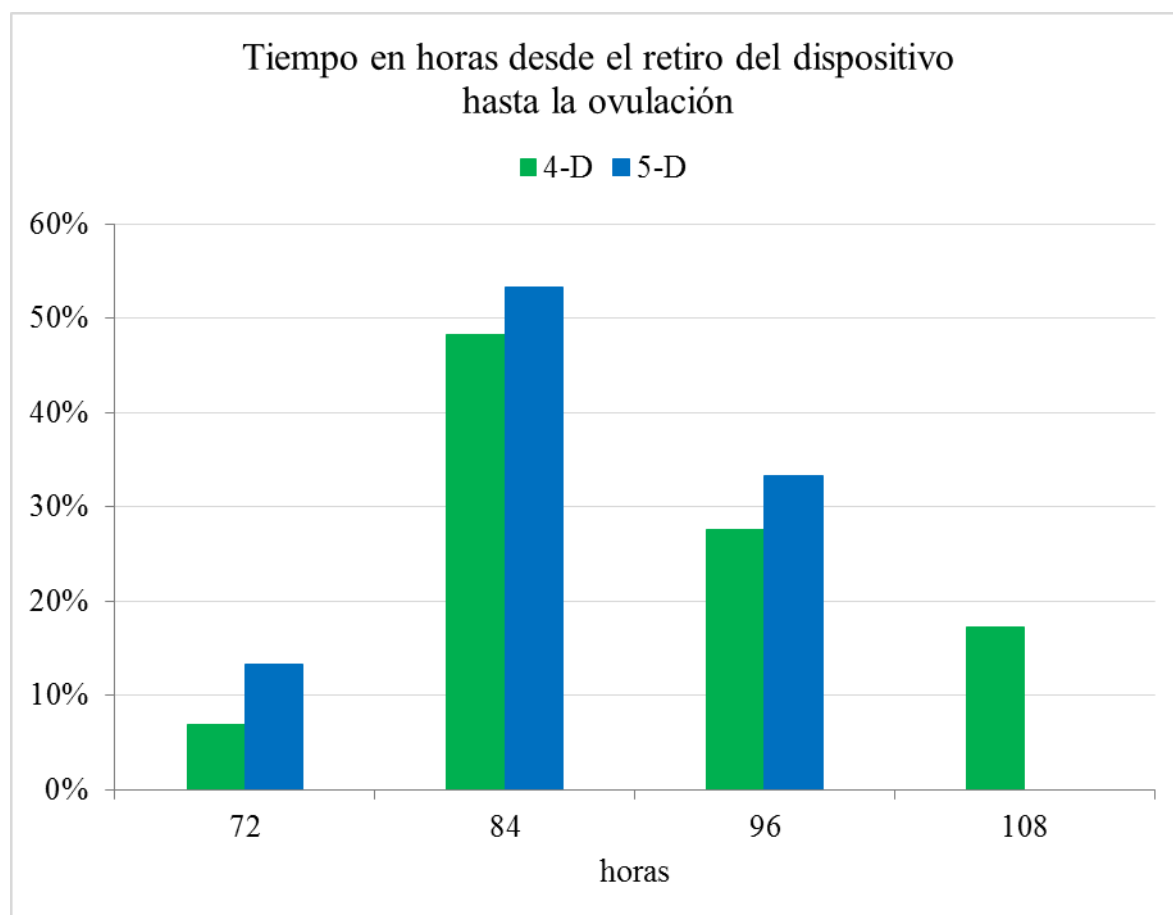
El intervalo medio de ovulación desde la remoción del dispositivo fue de  $86,4 \pm 4,1$  horas en el tratamiento 5-D y de  $90,62 \pm 5,3$  horas en el tratamiento 4-D, sin registrar diferencias entre los grupos ( $P > 0,05$ ; Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Intervalo del tiempo de ovulación en horas desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación con los diferentes tratamientos para las vacas del Experimento 2.



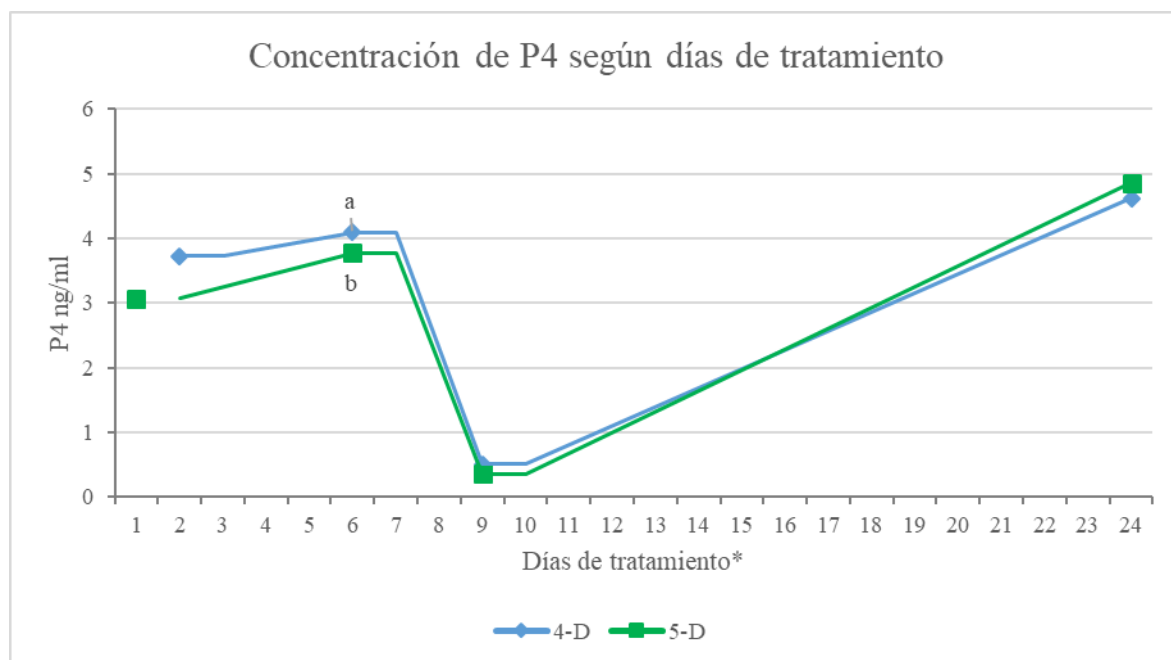
La dispersión de las ovulaciones no registró significancia estadística ( $P>0,05$ ; Figura 3.2). Solamente a las 84 horas post IATF se registró un porcentaje numéricamente mayor de ovulaciones para los grupos 5-D y 4-D, con el 53,3% y 48,3% respectivamente ( $P>0,05$ ; Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Distribución de las ovulaciones luego de la sincronización con los diferentes tratamientos para las vacas del Experimento 2. ( $P>0,05$ ).

El 90,6% de las vacas del grupo 4-D y el 93,8% del tratamiento 5-D respectivamente, que fueron monitoreadas durante el crecimiento del FD hasta la ovulación, presentaron CL subsiguiente ( $P>0,05$ ).

La concentración sérica de P4 fue evaluada desde el inicio de los tratamientos, Día 5, Día 8 y Día 15 post IATF. Solamente en el Día 5 se registran diferencias del grupo 4-D sobre el 5-D ( $P < 0,05$ ; Figura 3.3).



\* Día de inicio de tratamiento hace referencia a Día 0 y Día 1 para los grupos 5-D y 4-D respectivamente.

**Figura 3.3.** Concentración sérica de progesterona (P4) ng/ml según días de tratamiento en vacas lecheras del Experimento 2. Diferentes letras indican los días en los cuales hubo diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

El área del cuerpo lúteo al Día 15 de los tratamientos fue mayor en el grupo 5-D con respecto al grupo 4-D, siendo  $369,6 \pm 23,6 \text{ mm}^2$  y  $344,6 \pm 22,7 \text{ mm}^2$  respectivamente ( $P < 0,01$ ; Tabla 3.5). Mientras que las concentraciones de P4 al Día 15 post IATF no difirieron entre tratamientos ( $P > 0,05$ ; Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Área de CL y concentraciones séricas de progesterona al Día 15 post IATF (media $\pm$ SEM) en vacas Holstein Friesian sometidas al Experimento 2.

Variable	Tratamiento	
	4-D	5-D
Área del CL ( $\text{mm}^2$ )	$344,6 \pm 22,7^a$	$369,6 \pm 23,67^b$
Concentración de P4 (ng/ml)	$4,5 \pm 0,25$	$4,8 \pm 0,29$

Diferentes letras difieren significativamente ( $P < 0,01$ ).

La tasa de preñez obtenida al día 35 post IATF fue del 53,1% y 62,5% para el grupo 4-D y 5-D respectivamente, lo cual no presentó significancia estadística entre los grupos de tratamiento ( $P > 0,05$ ; Tabla 3.6), así como no se registraron diferencias estadísticas entre repeticiones o en la interacción de los mismos. Cabe señalar que tampoco hubo diferencias significativas entre los toros utilizados para la IATF en ninguna réplica.

**Tabla 3.6.** Tasa de preñez a la IATF para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 2.

	Tratamientos	
	4-D	5-D
Réplica 1	56,3% (9/16)	58,8% (10/17)
Réplica 2	50,0% (8/16)	66,7% (10/15)
<b>Total</b>	<b>53,1% (17/32)</b>	<b>62,5% (20/32)</b>

Los porcentajes no difieren ( $P > 0,05$ ).

### Experimento 3

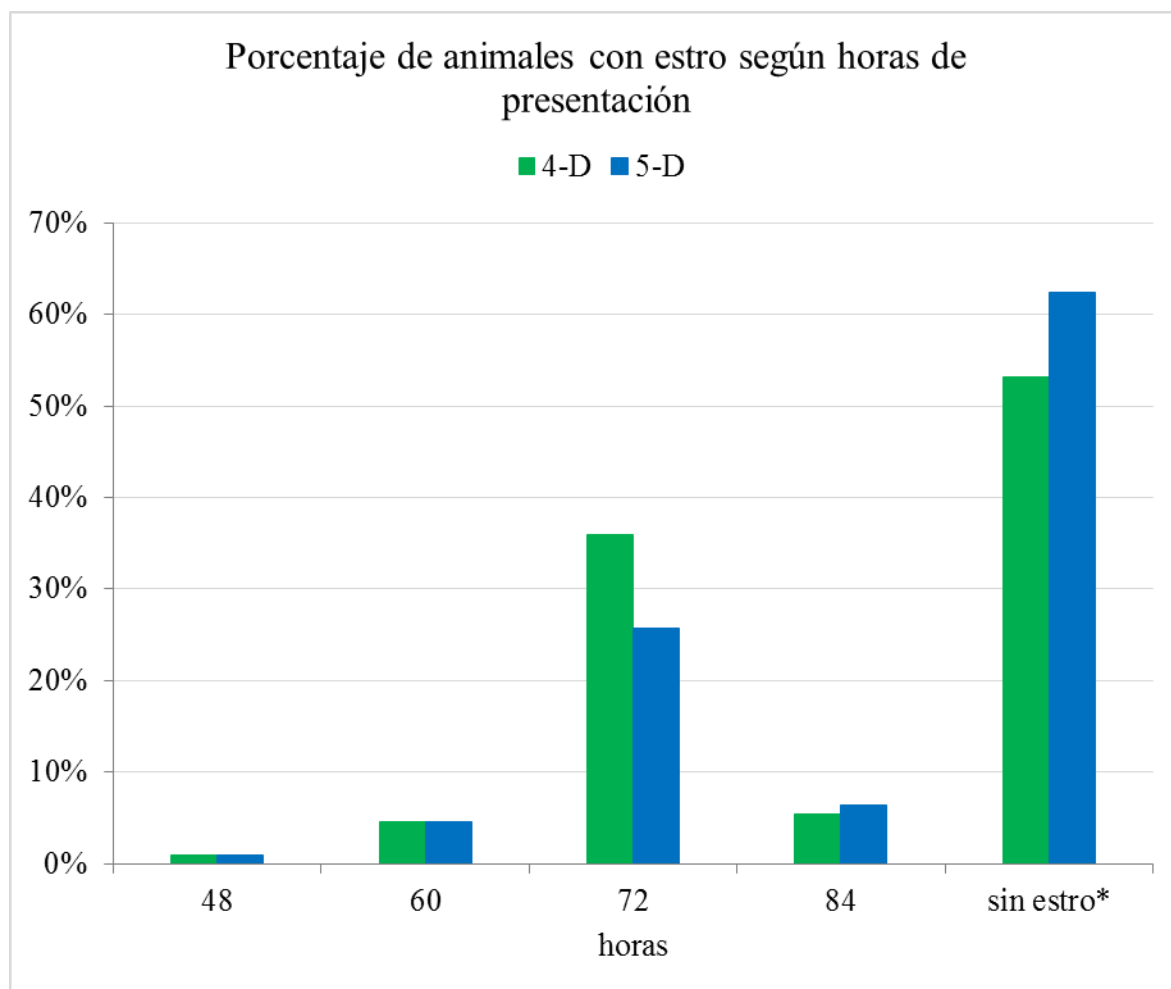
El porcentaje de animales que presentaron estro a través del método revelador de monta en el tratamiento 4-D fue del 46,9% y 37,6% para el grupo 5-D, sin registrar diferencias estadísticas ( $P>0,05$ ; Tabla 3.7). El promedio en horas de aparición de celo a partir del retiro del implante de P4 fue del 71,7 y 72,0 horas para el grupo 4-D y 5-D respectivamente, lo cual no difirió estadísticamente ( $P>0,05$ ).

**Tabla 3.7.** Tasa de detección del estro para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.

	Tratamientos	
	4-D	5-D
Con Estro	46,9% (52/111)	37,6% (41/109)
Sin estro *	53,2% (59/111)	62,4% (68/109)

\*Sin estro hace referencia a las vacas que no presentaron celo durante el periodo de observación. ( $P>0,05$ ).

El porcentaje de animales que manifestó estro fue analizado acorde al tiempo de presentación, contabilizados a partir de la remoción del dispositivo con P4. De esta manera no existieron diferencias entre los tratamientos con el paso de las horas ( $P>0,05$ ; Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Respuesta sobre el porcentaje de celo registrado a las 48, 60, 72, 84 horas posterior al retiro del implante de P4 en vacas lecheras tratadas del Experimento 3. \*Sin estro hace referencia a las vacas que no presentaron celo durante el período de observación.

La tasa de preñez obtenida al día 35 post IATF según la manifestación de estro observado fue del 86,5% para los animales del grupo 4-D y del 87,8% para los del 5-D. Mientras que el 20,3% y el 41,2% de las vacas que no presentaron síntomas visibles de celo quedaron gestantes. No se encontraron diferencias significativas entre grupos, pero la tasa de preñez de las vacas que mostraron estro fue mayor que las que no mostraron estro ( $P < 0,01$ ; Tabla 3.8)

**Tabla 3.8.** Tasa de preñez según la expresión de estro para las vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.

	Tratamientos		Total
	4-D	5-D	
<b>Con estro</b>	86,5% (45/52) <sup>a</sup>	87,8% (36/41) <sup>a</sup>	87,1% (81/93) <sup>a</sup>
<b>Sin estro</b>	20,3% (12/59) <sup>b</sup>	41,2% (28/68) <sup>b</sup>	31,5% (40/127) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>La tasas de preñez difieren entre las vacas con estro y las sin estro ( $P < 0,01$ ).

Según la hora de presentación de celo, la tasa de preñez alcanzada al día 35 post IATF en la vacas observadas con pintura borrada a las 72 horas fue del 92,5% para los animales del grupo 4-D y del 85,7% para el grupo 5-D, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $P > 0,05$ ; Tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Tasa de preñez según horas de presentación de estro para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3\*.

Horas	Tratamientos	
	4-D	5-D
<b>48</b>	0,0% (0/1)	100,0% (1/1)
<b>60</b>	80,0% (4/5)	100,0% (5/5)
<b>72</b>	92,5% (37/40)	85,7% (24/28)
<b>84</b>	66,7% (4/6)	85,7% (6/7)
<b>Sin estro**</b>	20,3% (12/59)	41,2% (28/68)

\*Todas las vacas fueron IATF a las 72 h de la remoción del dispositivo con P4.

\*\*Sin estro hace referencia a las vacas que no presentaron celo durante el período de observación. ( $P > 0,05$ ).

Al contabilizar todos los resultados de preñez por tratamiento de las 7 réplicas, si bien la tasa de preñez total fue del 58,7% para el grupo 5-D y 51,4% para las vacas del grupo 4-D, las diferencias no fueron significativas ( $P>0,05$ ; Tabla 3.10). De la misma forma no hubo diferencias significativas entre los toros utilizados para la IATF en ninguna réplica.

**Tabla 3.10.** Tasa de preñez según réplica de tratamiento para vacas lecheras tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento 3.

Réplicas	Tratamientos	
	4-D	5-D
Réplica 1	62,5% (10/16)	68,8% (11/16)
Réplica 2	33,3% (4/12)	66,7% (8/12)
Réplica 3	47,4% (9/19)	31,6% (6/19)
Réplica 4	50,0% (7/14)	57,1% (8/14)
Réplica 5	52,4% (11/21)	71,4% (15/21)
Réplica 6	75,0% (9/12)	41,7% (5/12)
Réplica 7	41,2% (7/17)	73,3% (11/15)
<b>Total</b>	<b>51,4% (57/111)</b>	<b>58,7% (64/109)</b>

Los porcentajes no difieren ( $P>0,05$ ).

### DISCUSIÓN

La aplicación de dos dosis de PGF en intervalo de 12 horas a partir del retiro del dispositivo con P4 (Experimento 1), no logró aumentar la tasa de preñez que puede ser obtenida en vacas lecheras sincronizadas con el protocolo CO-Synch de 5 días. En consecuencia, los resultados obtenidos permiten rechazar la primera hipótesis planteada. No obstante, los resultados de los experimentos 2 y 3, soportan la segunda hipótesis ya que, al disminuir el tiempo de la permanencia del dispositivo con P4 de 5 a 4 días, no difirió de la tasa de preñez alcanzada en vacas lecheras al ser sincronizadas con protocolo CO-Synch.

En el Experimento 1, a pesar de la falta de significación estadística se observó una ligera diferencia numérica de la tasa de preñez a favor del grupo de vacas que recibieron el tratamiento 2PGF. Esta variación numérica concuerda con lo reportado por Bridges *et al.*, (2012); quienes, en un experimento en vacas de carne en lactación, reportaron que la tasa de preñez fue mayor cuando se administraron dos dosis de PGF en intervalo de 8 horas posterior al retiro de un implante de P4 que cuando se administró una sola dosis. En estudios sobre la respuesta de la PGF en diferentes estadios del ciclo estral bovino, se ha informado que una sola administración de PGF no es muy efectivo en la regresión de un CL recién formado (Momont y Seguin, 1982; Tsai y Wiltbank, 1998), lo cual puede ajustarse al efecto de la primera dosis de GnRH, que ocasiona la ovulación del folículo dominante presente al inicio de los tratamientos. El intervalo óptimo entre administraciones de PGF en un protocolo de 5 días ha sido investigado en varias ocasiones en vacas de carne (Colazo y Mapletoft, 2017), pero hay limitada información sobre la situación en vacas lecheras. Cabe señalar que la cantidad de vacas utilizadas en este experimento limitan nuestra capacidad de detectar diferencias estadísticas entre tratamientos. Pese a ello, al registrar 14,6% más de tasa de preñez con tratamiento 2PGF, para el desarrollo de los experimentos 2 y 3 se optó por utilizar doble dosis de PGF en intervalo de 12 horas a partir del retiro del implante de P4.



En el Experimento 2, al inicio del estudio mediante ultrasonografía y radioinmunoensayo para P4, se determinó que más del 80% de los animales eran cíclicos, el porcentaje de vacas sin un CL (probablemente en anestro) no difirió entre los grupos. Las concentraciones medias de P4 al inicio de los experimentos tanto en el grupo 4-D como en el 5-D fueron mayores a 3 ng/ml ( $3,7\pm 0,3$  y  $3,1\pm 0,4$  ng/ml, respectivamente), esto puede haber influido en la efectividad de la inyección inicial de GnRH para inducir la ovulación. Giordano *et al.*, (2012) demostraron que cuando las concentraciones de P4 son altas y un CL está presente, este último ejerce retroalimentación negativa, inhibiendo el aumento del pico preovulatorio LH y la ovulación posterior (Pulley *et al.*, 2015; Stevenson y Pulley, 2016). La inserción de un dispositivo intravaginal de P4 da como resultado un aumento inmediato en las concentraciones de P4 en sangre (Galvão *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2008) que puede reducir la efectividad de la inyección inicial de GnRH para causar la ovulación. En el presente estudio el 46,9% de las vacas ovularon después de la GnRH inicial y todas esas vacas presentaron un nuevo CL al Día 5, a la administración de la primera PGF, lo cual puede sugerirse que fue en respuesta al primer tratamiento con GnRH.

El diámetro del folículo dominante durante los días de seguimiento ultrasonográfico así como el porcentaje de animales que ovularon con la segunda dosis de GnRH no fue diferente para las vacas del grupo 5-D sobre el 4-D (93,8% vs 90,6% respectivamente). Esto concuerda con lo reportado por Palomares *et al.*, (2015), quienes realizaron un estudio en el cual compararon un programa CIDR + CO-Synch de 4 y 5 días en vaquillas lecheras, y aunque el desarrollo folicular y el momento de la ovulación no se evaluaron en este estudio, sus resultados sugieren que ambos protocolos pudieron inducir una sincronización de la ovulación adecuada.

Con respecto a las concentraciones de P4 al retiro del dispositivo en el Día 5, estas fueron mayores ( $P < 0,05$ ) en las vacas pertenecientes al tratamiento 4-D sobre el 5-D, lo cual es lógico de esperar debido a que hay un día más para que se desarrolle el CL en las vacas que ovularon a la primera GnRH. Cuando se tabularon las concentraciones de P4 a la IATF se determinó que el 71,9% y el 84,4% de las vacas del grupo 4-D y 5-D respectivamente tenían concentraciones  $< 0,5$  ng/ml, lo cual corrobora con informes

anteriores de luteólisis exitosa en vacas no lactantes (Valdecabres-Torres *et al.*, 2013), y en vacas lactantes (Stevenson *et al.*, 2013). Por el contrario, Santos *et al.*, (2010), encontraron que la regresión del CL basada en las concentraciones de P4, fue menor en las vacas que recibieron un tratamiento CIDR + CO-Synch de 7 días que en aquellos recibiendo un protocolo de 5 días con dos inyecciones de PGF administradas con 24 horas de diferencia. Las vacas que tuvieron concentraciones de P4  $\geq 0,5$  ng/ml, se estima que son aquellas que al Día 5 presentaron una nueva estructura lútea resultante de la primera GnRH que indujo ovulación y estas pueden ser consideradas problemáticas por luteólisis incompleta o fallida. La mayoría de las vacas en ambos grupos tenían baja concentración de P4 a la IATF, por lo tanto, la doble inyección de PGF en intervalo de 12 horas a partir de la remoción del implante de P4, fue eficaz para causar regresión y una disminución en las concentraciones de P4 independientemente del tiempo de la permanencia del dispositivo de P4 (4 o 5 días).

El intervalo medio de ovulación a partir de la remoción del dispositivo de P4 no difirió entre tratamientos, registrando una media de  $90,62 \pm 5,3$  y  $86,4 \pm 4,1$  horas para las vacas del grupo 4-D sobre el 5-D respectivamente. Sobre este tema Wiltbank *et al.*, (2011) dieron a conocer que la ovulación en vacas lecheras ocurre con cierta variabilidad entre las 70 y 75 horas después de la remoción del dispositivo de P4 y la administración de la PGF, por lo que es adecuado que la IA se realice entre las 10 y 12 horas antes de la ovulación. Sin embargo, la segunda administración de GnRH puede disminuir esta variabilidad después de la remoción del dispositivo de P4 para la IATF. El ovocito liberado con la ovulación, tiene un período corto para ser fecundado. La fertilidad óptima se obtiene de 6 a 12 horas después de la ovulación (Brackett *et al.*, 1980) y la viabilidad media de los espermatozoides en el tracto genital bovino se estima entre 24 a 30 horas (Trimberger, 1948). Con estos antecedentes el intervalo medio de ovulación obtenido estaría dentro de los rangos esperados y son una base de conocimiento para ampliarlos en posteriores investigaciones.

Por otra parte, a pesar que el área del CL al Día 15 post IATF fue mayor ( $P < 0,01$ ) en las vacas del grupo 5-D, la concentración de P4 no difirió entre tratamientos. Vasconcelos *et al.*, (2001), demostraron que a mayor tamaño del CL se incrementa la

producción de P4 hasta alcanzar su madurez alrededor del Día 8 del ciclo estral (Busch *et al.*, 2008), en donde su tamaño no influye en las concentraciones circulantes de P4 (Mann, 2009). Varios autores han expuesto que la concentración de P4 es de gran importancia para el desarrollo del embrión y el mantenimiento de la gestación temprana (Spencer *et al.*, 2018; Lonergan *et al.*, 2016). Al no haber diferencias en la concentración de P4 entre los grupos, no se debería esperar una influencia de la P4 en la fase luteal sobre la tasa de preñez.

La tasa de preñez obtenida con el tratamiento 5-D presentó una ligera tendencia numérica (9,4% más) sobre el grupo 4-D. Esta variación entre tratamientos concuerda con los resultados de un trabajo realizado por Palomares *et al.*, (2015) en vaquillas lecheras, el cual se registró una diferencia de 8,3% más para el grupo de 5 días. Esto puede ser atribuible a las diferencias en crecimiento y maduración folicular o sincronización de la ovulación con relación al tiempo de la IA.

En el presente estudio, modificamos el protocolo CO-Synch + P4 de 5 días para probar nuestra hipótesis de que acortar la duración del protocolo en 1 día no afectaría la fertilidad en vacas lecheras en lactación. La tasa de preñez obtenida fue consistente con el concepto de vacas que se caracterizan por una rotación más lenta de los folículos, tienen un patrón común de dos ondas foliculares por ciclo estral y períodos más largos de dominancia folicular que las vaquillas (Ginther *et al.*, 1989). Sobre la base de estos eventos fisiológicos, Fricke *et al.*, (2016), afirmó que la ovulación a la primera GnRH y el reclutamiento de una nueva onda folicular podría tener menos efecto sobre la fertilidad en vacas lecheras si se aplica un protocolo de 5 días que uno de 7 días. Por lo tanto, se estima que tanto el protocolo de 4-D y 5-D fueron igualmente capaces de sincronizar la ovulación de un folículo joven competente cuando se aplica en momentos aleatorios del ciclo estral en vacas lecheras en lactación. Disminuir la longitud del programa CIDR + CO-Synch de 7 a 5 días (IATF a las 72 horas) ha sido previamente investigado para evitar el efecto negativo de la dominancia folicular extendida en la tasa de preñez a la IATF en ganado de carne (Bridges *et al.*, 2008) y de leche (Santos *et al.*, 2010). Las vacas del grupo de 7 días ovularon un folículo más grande con concentraciones más altas de E2 en el día de la IA que aquellas en el grupo CO-Synch de 5 días (Santos *et al.*, 2010). Sin embargo, la tasa de

preñez fue mayor con CO-Synch de 5 días que con el programa de 7 días (39,2% y 33,9%). Por el contrario, Mellieon *et al.*, (2012), no encontraron diferencias en la tasa de preñez en vaquillas lecheras tratadas con los protocolos CIDR + CO-Synch de 5 o 7 días (29,9% y 26,8%, respectivamente) cuando la IATF se realizó a las 72 horas después del retiro del CIDR.

Se han informado programas efectivos de 5 días en los cuales se sincronizó la ovulación en vacas lecheras lactantes en confinamiento (Bisinotto *et al.*, 2010) y en pastoreo (Ribeiro *et al.*, 2011). En esos estudios, la IATF se realizó 72 horas después de la remoción del dispositivo de P4, y se administró la segunda GnRH de 12 a 18 horas antes o en el momento de la IA. Ribeiro *et al.*, (2012) en un programa de 5 días administró una segunda dosis de PGF en el día 6 para asegurar la regresión de cualquier nueva estructura lútea que se formó después de la ovulación inducida por la primera GnRH. En los programas de 5 días las tasas de preñez se redujeron cuando se administró una dosis única de 25 mg de cloprostenol (Santos *et al.*, 2010) o si 2 dosis se administraron al mismo día (día 5 después de la primera GnRH), en comparación con administrar una dosis al Día 5 y una segunda dosis en Día 6, demostrando la necesidad de colocar dos PGF en estos protocolos cortos en vacas en lactancia. Aumentar la dosis de cloprostenol de 0,5 a 0,75 mg en el Día 7, aumentó la regresión en vacas multíparas, pero no en primíparas, resultando en mejores resultados de preñez a los 39 días post IATF (Giordano *et al.*, 2013), pero esto no ha sido estudiado en vacas de leche tratadas con un CO-Synch de 5 días.

En el Experimento 3, se observó que el porcentaje de vacas que manifestaron estro no difirió entre los grupos. El estro según Allrich (1994), fue definido como el período en el cual la hembra bovina es sexualmente receptiva y se debe a un aumento en las concentraciones circulantes de estradiol en un momento en que las concentraciones de P4 son bajas. Nuestros hallazgos son diferentes al trabajo de Palomares *et al.*, (2015), quienes reportaron que las vaquillas del grupo CIDR + CO-Synch de 5 días mostraron mayor porcentaje de expresión de celo dentro del periodo de observación (72 h del retiro del dispositivo); sin embargo, estas vaquillas tuvieron menor concentración de E2 en comparación con los animales del grupo de 4 días. Sorprendentemente el 64,3% de las vaquillas del grupo CIDR + CO-Synch de 4 días que no mostraron celo, tenía altas

concentraciones de E2 en el momento de AI (rango: 3,28 a 20,30 pg / ml, con una media: 6,89 pg/ml). Las limitaciones del estudio, no permitieron diferenciar estadísticamente estos hallazgos.

Las tasas de preñez logradas por los tratamientos 4-D y 5-D fueron similares (51,4% y 58,7% respectivamente) y no presentaron significancia. Sin embargo, se observaron diferencias ( $P < 0,01$ ) con tasas de preñez más altas para las vacas de los grupos 4-D y 5-D que presentaron celo con respecto a las que no presentaron celo. Al respecto, se puede aclarar que, durante el desarrollo folicular, la etapa de dominancia que conduce a la ovulación se caracteriza por la continua disminución de las concentraciones de FSH y el aumento de los pulsos de LH. El folículo dominante sigue creciendo y se presenta un aumento de la secreción de E2 y la inhibina (Fortune *et al.*, 2004). Además, una cascada secuencial de aumento de los pulsos de LH y aumento de las concentraciones de E2 desencadena el inicio del estro. Cuando el folículo dominante alcanza el tamaño ovulatorio, los niveles de E2 aumentan significativamente hasta alcanzar el umbral. Este evento genera una retroalimentación positiva que estimula el aumento de LH que altera la esteroidogénesis folicular. Por lo tanto, la secreción de estrógenos por parte del folículo dominante disminuye abruptamente (Senger, 2011). Es concebible que un número significativo de vacas del grupo 4-D y 5-D fueron sometidas a un crecimiento folicular activo, que generó el comportamiento de monta, produciendo la remoción de la pintura de la base de la cola, por consecuencia del aumento de los niveles de E2 en el momento de la IA lo cual favoreció la tasa de preñez para las vacas que manifestaron estro. Por el contrario, es posible que las vacas que no presentaron estro podrían haber tenido un folículo más pequeño con bajos niveles de E2 e inmaduro para ovular en respuesta a la GnRH, lo cual disminuyó la tasa de preñez en estos grupos.

Se ha sugerido que la progresión de los eventos requeridos para el crecimiento y supervivencia del conceptus están influenciados por la coordinación de los eventos que llevan a una disminución en las concentraciones de P4 y a un aumento en las concentraciones de E2 antes de la aparición del estro (Bridges *et al.*, 2013). Además, se ha informado que las concentraciones de E2 preovulatorio tienen un impacto positivo en el desarrollo posterior del conceptus, y que las vacas que exhiben estro tienen una mayor

supervivencia embrionaria en el día 19 de gestación en comparación con las que no muestran el estro (Davoodi *et al.*, 2016). Se ha demostrado anteriormente que la aparición de estro en los programas de IATF se asocia positivamente con la tasa de preñez a la IA en bovinos de carne *Bos taurus* (Richardson *et al.*, 2016) y *Bos taurus* x *Bos indicus* (Bó *et al.*, 2017). Por lo tanto, la expresión del estro puede influenciar positivamente sobre la tasa de preñez a la IA en los protocolos de IATF.

Cabe señalar que existen otros puntos a destacar para la discusión de los resultados obtenidos. Primero, no se dispone de investigaciones que hayan evaluado el uso del protocolo CO-Synch + P4 por 5 días en vacas lecheras, o similares en la serranía ecuatoriana. En segundo lugar, los resultados generan una base de datos para el desarrollo de otros ensayos y/o su repetición con un mayor número de unidades experimentales. Es probable que el tamaño de muestra limitaron el poder estadístico para hallar diferencias significativas. Y tercero, respecto a los aceptables porcentajes de preñez obtenidos, aunque no difirieron significativamente, el uso del protocolo 4-D, se presenta como una alternativa promisoría a los programas de IATF convencionales, debido a las prestaciones y facilidades para su horario de manejo, al iniciar el tratamiento en un día determinado de la semana e inseminar a los animales el mismo día de la siguiente semana, sin la necesidad de tratar a los animales durante los fines de semana. Esto sin duda podría mejorar el punto crítico del manejo de las explotaciones lecheras que es asegurar que el personal realice los tratamientos en tiempo y forma adecuada. Se necesitan también estudios complementarios para ajustar el tiempo de IA en relación con el momento de la ovulación en un intento de mejorar la fertilidad.

### CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis de Maestría confirman las hipótesis de que la disminución en el tiempo de permanencia del dispositivo con P4 de 5 a 4 días, no afecta negativamente la tasa de preñez obtenida en vacas lecheras sincronizadas con protocolo CO-Synch.

Además, se dedujeron las siguientes conclusiones específicas:

El diámetro del folículo dominante durante los días de seguimiento, así como la tasa de ovulación no difirió entre tratamientos (4-D y 5-D).

El tiempo de presentación de las ovulaciones a partir del retiro del dispositivo con P4 no fue diferente entre los grupos de tratamientos (4-D y 5-D).

El área del cuerpo lúteo formado en la fase lútea siguiente fue significativamente mayor en las vacas tratadas con el protocolo de 5 días (5-D), pero las concentraciones de P4 no difirieron entre los grupos.

La tasa de preñez en las vacas del grupo 4-D y 5-D que presentaron estro fue significativamente mayor con respecto a los grupos de animales que no manifestaron síntomas visibles de estro.

### BIBLIOGRAFÍA

- Adams G., Matteri R. and Ginther O. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 96: 627-640.
- Adams G. and Pearson R. 1995. Bovines model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 43: 113-120.
- Allrich R. 1994. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci.* 77: 2738-2744.
- Austin E., Mihm M., Ryan M., Williams D. and Roche J. 1999. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J. Anim. Sci.* 77: 2219-2226.
- Barth A. 1995. Evaluation of frozen Semen by the Veterinary Practitioner. *Proc. Of Bovine Short Course. Society for Theriogenology*, 105-110.
- Binelli M., Pugliesi G., de Oliveira M., Rodrigues França M., de Oliveira Cardoso B., Piffero B., Sousa N., Latorraca L. and Cuellas Cuadros F. 2017. Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte. *Rev Bras Repro Anim.* 41: 121-129.
- Bisinotto R., Ribeiro E., Martins L., Marsola R., Greco L., Favoreto M., Risco C., Thatcher W. and Santos J. 2010. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J. Dairy Sci.* 93: 5798-5808.
- Bisinotto R. and Santos E. 2011. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 258-266.
- Bó G., Martínez M., Nasser L., Caccia M., Tribulo H. and Mapletoft R. 1993. Follicular dynamics in *Bos-indicus* and *Bos-taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. *Proc 10 Congreso Brasileño de Reproducción Animal*, pp. 221 (abstract).
- Bó G., Alonso A., Caccia M., Carcedo J., Cutaia L., Moreno D., Martínez M. and Baruselli P. 2008. *Fisiología de la reproducción de la vaca*. IRAC, Córdoba. 1 ed. 4ª reimp, pp. 49-57.



- Bó G., Cedeño A., Tribulo A., Andrada S., Tribulo R., Mapletoft R. 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).
- Bodensteiner K., Kot K., Wiltbank M. and Ginther O. 1996. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 45: 1115-1128.
- Brackett B., Oh Y., Evans J. and Donawick W. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Reprod.* 23: 189-205.
- Bridges G., Helsler L., Grum D., Mussard M., Gasser C. and Day M. 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., Mussard M., Burke C. and Day M. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrines function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117: 208-215.
- Bridges G., Ahola J., Brauner C., Gruppe L., Currin J., Day M., Gunn P., Jaeger J., Lake S., Lamb G., Marquezine H., Peel R., Radunz A., Stevenson J. and Whittier W. 2012. Determination of the appropriate delivery of PGF2 $\alpha$  in the 5-day CO-Synch + CIDR protocol in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 90: 4814-4822.
- Bridges G., Day M., Geary T., Cruppe L. 2013. Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J. Anim. Sci.* 91, 3002-3013.
- Bridges G., Mussard M., Hesler L. and Day M. 2014a. 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.
- Bridges G., Lake S., Kruse S., Bird S., Funnell B., Arias R., Walker J., Grant J. and Perry G. 2014b. Comparison of three CIDR based fixed-timed AI protocols for beef heifers. *J. Anim. Sci.* 92: 3127-3133.
- Busch D., Schafer D., Wilson D., Mallory D., Leitman N., Hayden J., Ellersieck M., Smith M. and Petterson D. 2008. Timing of artificial insemination in postpartum beef cows following administration of the CO-Synch + controlled internal drug-release protocol. *J. Anim. Sci.* 98: 8741-8752.
- Colazo M. and Ambrose D. 2011. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology* 76: 578-588.
- Colazo M. and Mapletoft R. 2017. Programas de IA a tiempo fijo en ganado de carne y lechero en Canadá. Resúmenes del XII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba. pp. 119-138.

- Cruppe M, Maquivar M., Jinks E., Fogle G., Mussard M., Pires A. 2010. The influence of two doses of PGF2a given at 2 or 12 hour intervals on luteolysis and pregnancy rate to timed AI with the 5-d CO-Synch þ CIDR program. *J. Anim Sci.* 88(suppl); 767(abstract).
- Cruppe L. and Day M. 2011. Maximización de las tasas de preñez con inseminación artificial al tiempo fijo con el programa Co-Synch + CIDR de 5 días. Resúmenes del IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba. pp. 193-222.
- Day M. 2015. State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim. Reprod.* 12: 472-478.
- Day M. and Bridges G. 2015. Recientes avances en el uso del programa CIDR CO-Synch de 5 días en el ganado bovino para carne. Resúmenes del XI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba. pp. 129-142.
- De Castro T., Valdez L., Rodriguez M., Benquet N. and Rubianes E. 2004. Decline in Assayable Progesterone in Bovine Serum under different storage conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 36: 381-384.
- de la Mata JJ, Núñez-Olivera F, Cuadro F, Bosolasco D, de Brund V, Meikle A, Bó GA Menchaca A. 2018. Impact of extending the proestrus length in an oestradiol and progesterone-based oestrus synchronization program on follicular and luteal development, uterine gene expression, and protein localization, and pregnancy rates in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* 30:1541–1552
- De la Sota R. 2000. Detección de celos: como calcular su intensidad y exactitud. *Taurus;* 2(7), 19-27.
- DesCôteaux L., Collon J. and Gnemmi G. 2010. Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. Iowa, USA. Blackwell Publishing, pp 246.
- Davoodi S, Cooke RF, Fernandes AC, Cappelozza BI, Vasconcelos JL, Cerri RL. 2016. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology;* 85: 645-655.
- Dick A.R. 1990. Studies on the use of the CIDR intravaginal device for reproductive management of the dairy cattle. Universidad de Massey. Tesis Maestría. p. 331.
- Diskin M., Austin E. and Roche J. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 211-228.
- Driancourt M. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.

- El-Zarkouny S., Cartmil J., Hensley B. and Stevenson J. 2004. Pregnancy in Dairy Cows After Synchronized Ovulation Regimens With or Without Presynchronization and Progesterone. *J. Dairy Sci.* 87: 1024-1037.
- Findlay J., Robertson D., Clare I., Klein R., Doughton B., Xiao S., Russel D. and Shukovski L. 1992. Hormonal regulation of reproduction: general concepts. *Animal Reproduction Sci.* 28: 319-328.
- Fortune J., Rivera G., Yang M. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Sci.* 82-83: 109-26.
- Fricke P., Santos V., Carvalho P., Maia C., Carneiro B., Valenza A. and Crump P. 2016. Adding a second prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment to but not reducing the duration of a PRID-Synch protocol increases fertility after resynchronization of ovulation in lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 99: 1-11.
- Galvão K., Santos J., Juchem S., Cerri R., Coscioni A. and 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.
- Geary T., Whittier J., Downing E., LeFever D., Silcox R., Holland MD, Nett T. and Niswender G. 1998. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. *J. Anim. Sci.* 76: 1523-15127.
- Geary T., Whittier J., Hallford D. and MacNeil M. 2001. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-synch protocols. *J. Anim. Sci.* 79: 1-4.
- Ginther O., Kanopf L. and Kastelic J. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87: 223-230.
- Ginther O., Wiltbank M., Ficke P., Gibbons J. and Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
- Ginther O., Kot K., Kulick L. and Wiltbank M. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48: 75-87.
- Ginther O., Bergfelt D., Kulick L. and Kot K. 1998. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* 50: 507-519.
- Ginther O. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Sci.* 60/61: 61-79.

- Giordano J., Fricke P., Guenther J., Lopes G.Jr., Herlihy M., Nascimento A. and Wiltbank M. 2012. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 3781-3793.
- Giordano J., Wiltbank M., Fricke P., Bas S., Pawlisch R., Guenther J. and Nascimento A. 2013. Effect of increasing GnRH and PGF2 $\alpha$  dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 80: 773-783.
- Goodman A. and Hodgen G. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 39: 1-73.
- Gümen A., Guenther J. and Wiltbank M. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 3184-3194.
- Kasimanickam R., Day M., Rudolph J., Hall J. and Whittier W. 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., Firth P., Schuenemann G., Whitlock B. and Gay J. 2014. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2 $\alpha$  in a 5-day progesterone-based CO-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology* 81: 797-804.
- Kastelic J., Knopf L., Ginther O. 1990. Effect of day of prostaglandin treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Animal Reproduction Sci.* 23: 169-180.
- Kastelic J., Ginther O. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Animal Reproduction Sci.* 26: 13-24.
- Keith B., Leslie K., Johnson W. and Walton. 2005. Effect of presynchronization using prostaglandin F2 $\alpha$  and a milk-ejection test on pregnancy rate after the timed artificial insemination protocol, Ovsynch. *Theriogenology* 63: 722-738.
- Knopf L., Kastelic J., Schallenberger E. and Ginther O. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6: 111-120.
- Ko J., Kastelic J., Schallenberger E. and Ginther O. 1991. Effects of dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 91: 511-519.
- Lamb G., Stevenson J., Kesler D., Garverick H., Brown D. and Salfen B. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79: 2253-2259.

- Lima F.S., Ayres H., Favoreto M.G., Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S. 2011. Effects of gonadotropin-releasing hormone at initiation of the 5-d 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., Ribeiro, E.S., Bisinotto R.S., Greco L.F., Martínez, N. 2013. Hormonal manipulation in the 5-day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 96: 7045-7065.
- Lonergan P., Forde N. and Spencer T. 2016. Role of prostaglandin in embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 28: 66-74.
- Lucy M. 1992. Factors that ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Animal Sci.* 70(11), 3615-3626.
- Macmillan K. and Curnow R. 1977. Tail painting a simple form of oestrus detection in New Zealand dairy herds. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*; 5: 357-361.
- Macmillan K. and Peterson A. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device in cattle (CIDR-B) for oestrus synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of anoestrus. *Animal Reproduction Sci.* 33: 1-25.
- Mann G. 2009. Corpus luteum size and plasma progesterone concentrations in cows. *Animal Reproduction Sci.*, (short comunicación), 115: 296-299.
- Martínez M., Adams G., Bergfelt D., Kastelic J. and Mapletoft R. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Animal Reproduction Sci.* 57: 23-33.
- Martínez M., Kastelic J., Adams G. and Mapletoft R. 2002. The use of progestins in regimens for fixed-timed artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 57: 1049-1059.
- Martínez M., Tutt D., Quirke L., Tattersfield G. and Juengel J. 2014. Development of a GnRH-PGF2 $\alpha$ -progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle *J. Anim. Sci.* 92: 4935-4948.
- Márquez I., Otero L. and López-Ortega A. 1997. Concentración de progesterona sérica en hembras bovinas en diferente época. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato Ciencias Veterinarias. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. Año 3, Nro. 1, p.35-42.
- Medina L. 2012. Cómo maximizar la eficiencia y eficacia en la detección de celo con el uso combinado de pinturas y prostaglandinas en vacas lecheras cíclicas, Tesina de grado, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina. 32 pp.

- Melendez P., Gonzalez G., Aguilar E., Loera O., Risco C. and Archbald D. 2006. Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 4567-4572.
- Mellieon H.I., Pulley S.L., Lamb G.C., Larson J.E., Stevenson J.S. 2012. Evaluation of the 5-day versus a modified 7-day CIDR breeding program in dairy heifers. *Theriogenology* 78: 1997-2006.
- Menchaca A y Chifflet N. 2015. Caracterización de la actividad ovárica al inicio del servicio en rodeos de cría en Uruguay. *Memorias de las XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandu, Uruguay.*
- Menchaca A., Núñez-Oliveira R., García-Pintos C., Cuadro F., Bosolasco D., Fabini F., Dutra S., de la Mata J. and Bó G. 2017. Efecto de la Prolongación del proestro en la fertilidad de los programas IATF. *Resúmenes del XII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba.* pp. 191-216.
- Mihm M., Baguisi A., Boland M. and Roche J. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102:123-130.
- Momont H. and Seguin B. 1982. Temporal factors affecting the response to prostaglandin F2a products in dairy cattle. *Proc. Ann. Conf. Soc. Theriogenology* 1:166-167.
- Moreira F., de la Sota R., Diaz T. and Thatcher 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. and Thatcher W. 2001. Effects of pre synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 1646-1659.
- Nation D., Morton J., Cavalieri J. and Macmillan K. 2001. Factors associated with the incidence of "Phantom cows" in Australian dairy herds. *New Zealand Society of Animal Production* 61: 180-183.
- Palomares R., Haslett J., Carpenter K., Gutierrez J., Rolling E. and Jones A. 2014. Evaluation of Monday-Friday 4-day CIDR timed artificial insemination protocol in dairy heifers: a pilot study. *Theriogenology.* 6; 372.
- Palomares R.A., Fishman H.J., Jones A.L., Ferrer M.S., Jenerette M. and Vaughn A. 2015. Comparison of 4- versus 5-day Co-Synch + controlled internal drug release (CIDR) + timed artificial insemination protocols in dairy heifers. *Theriogenology* 1-7.

- Peel R., Seabrook J., Seidel Jr G, Whittier J., Grove A. and Ahola J. 2012. Effect of 2, 4 and 5 hour interval between 2 prostaglandin F2a injections administered with the 5-d CO-Synch þ CIDR protocol on pregnancy rates in beef cows. *Prof Anim Sci.* 28; 623-627.
- Pires A., Ferraz Junior M., Biehl M., Santos M., Barroso J., Gonçalves J., Sartori R. and Day M. 2016. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nellore cattle. *Theriogenology* 86: 1939-1643.
- Pulley S., Keisler D. and Stevenson J. 2015. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 98: 6188-6201.
- Pursley J., Mee M. and Wiltbank M. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using Pgf2a and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- Pursley J., Silcox R. and Wiltbank M. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronized of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2139-2144.
- Rabaglino M., Risco C., Thatcher M., Kim I., Santos J. and Thatcher W. 2010a. Application of one injection of prostaglandin F2 (alpha) in the five-day Co-Synch+CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 95:1050-1058.
- Rabaglino M., Risco C., Thatcher M., Lima F. and Santos J. 2010b. Use of five-day progesterone-based timed AI protocol to determine if flunixin meglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. *Theriogenology* 73: 1311-1318.
- Rabiee A., Lean I. and Stevenson M. 2005. Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 88: 2754-2770.
- Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal cyclical, and left-right variations. *Acta Endocr. Copenh;* 52(suppl): 7-68.
- Rhodes F., Fitzpatrick L., Entwistle K. and De'ath G. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. *J. Reprod. Fertil.* 104: 41-49.
- Ribeiro E., Cerri R., Bisinotto R., Lima F., Silvestre F., Greco L., Thatcher W. and Santos J. 2011. Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. *J. Dairy Sci.* 94: 4984-4996.

- Ribeiro E., Bisinotto R., Favoreto M., Martins L., Cerri R., Silvestre F., Greco L., Thatcher W. and Santos J. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F<sub>2α</sub> as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78: 273-284.
- Richardson BN, Hill SL, Stevenson JS, Djira GD, Perry GA. 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.
- Roche J., Ireland J. and Mawhinney S. 1981. Control and induction of ovulation in cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 30: 211-222.
- Ross, P., Aller, J., Callejas, S., Butler, H. and Alberio, R. 2004. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestogen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology* 62: 265-273.
- Ryan M., Mihm M. and Roche J. 1998. Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and the fate of that follicle wave in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Abstr Ser.* 21:61.
- Santos J., Narciso C., Rivera F., Thatcher W. and Chebel R. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:2976-2988.
- Santos J., Lima F., Ayres H., Favoreto M., Bisinotto R. 2011. Effects of gonadotropin-releasing hormone at initiation of the 5-d 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.
- Savio J., Boland M. and Roche J. 1990. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil.* 88: 596-579.
- Senger P. 2011. Pathways to pregnancy and parturition. Second edition. Redmond, OR: Current Conceptions Inc; p. 373.
- Siriois J. and Fortune J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39: 308-317.
- Souto L., Maquivar M., Mussard M., Bridges G., Grum D. and Day M. 2009. Fertility and luteal regression with 5-d CIDR synchronization programs in postpartum beef cows using differing luteolytic treatments. *J. Anim Sci.* 87(suppl2): 372(abstract).
- Spencer J.A., Carnahan K., Shafii B., Price W.J., Dalton J. and Ahmadzadeh A. 2018. Pregnancy outcomes are not improved by administering gonadotropin-releasing hormone at initiation of a 5-day CIDR Cosynch resynchronization protocol for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101: 1-8.



- Stevenson J., Tenhouse D., Krisher R., Lamb G., Larson J., Dahlen C., Pursley J., Bello N., Fricke P., Wiltbank M., Brusveen D., Burkhart M., Youngquist R. and Garverick H. 2008. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 91: 2901-2915.
- Stevenson, J., Pulley S., Hill S. 2013. Change in dose delivery of prostaglandin F2 $\alpha$  in a 5-day timed artificial insemination program in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96: 5769-5772.
- Stevenson J., Pulley S., Hill S. 2014. Pregnancy outcomes after change in dose delivery of prostaglandin F2 $\alpha$  and time of gonadotropin-releasing hormone injection in a 5-day timed artificial insemination program in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 7586-7594.
- Stevenson, J., and Pulley S. 2016. Feedback effects of estradiol and progesterone on ovulation and fertility of dairy cows after gonadotropin-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone. *J. Dairy Sci.* 99: 3003-3015.
- Stock A. and Fortune J. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132: 1108-1114.
- Sunderland S., Crowe M., Boland M., Roche J. and Ireland J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal Reproduction and Fertility* 101:547-555.
- Thatcher W., Schmitt J., De la Sota R., Burke J. and Risco C. 1996. Sincronización de estros en rodeos lecheros. Resúmenes II Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC, Córdoba, Argentina. p. 109-130.
- Trimberger G.W. 1948. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before after ovulation. *Nebraska Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 153: 1-26.
- Tsai S. and Wiltbank M. 1998. Prostaglandin F2 regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.*; 58:346-352.
- Twagiramungu H., Guilbault L. and Dufour J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *J. Animal Sci.* 73: 3141-3151.
- Valdecabres-Torres X., García-Muñoz A., García-Roselló E. and Cuervo-Arango J. 2013. Use of a split or single prostaglandin F2 $\alpha$  treatment in a 6-day synchronization protocol for non lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96: 1647–1652.

- Vasconcelos J., Silcox R., Rosa G., Pursley J., Wiltbank M. 1999. Synchronization rate, size of the ovulation 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. Sartori R., Oliveira H.N., Gunther 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.
- Whittier W., Currin J., Schramm H., Holland S. and Kasimanickam R. 2013. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day Co-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology* 80: 963-969.
- Wiltbank M., Souza A., Carvalho P., Bender R., Nascimento A. 2011. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev.* 24: 238-43.
- Wiltbank M., Sartori R., Fricke P. and Monteiro P. 2017. Programas optimizados de manejo reproductivo con un objetivo de 30% de tasa de preñez a los 21 días en los rodeos con una producción de 40 litros por día. Resúmenes del XII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba. pp. 217-234.