



INSTITUTO DE REPRODUCCION ANIMAL CORDOBA



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

PROLONGACIÓN DEL PROESTRO Y REDUCCION DEL PERIODO DE INSERCIÓN DEL DISPOSITIVO CON PROGESTERONA EN VAQUILLONAS PARA CARNE INSEMINADAS A TIEMPO FIJO

José Javier de la Mata

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, Abril 2016



INSTITUTO DE REPRODUCCION ANIMAL CORDOBA



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

**PROLONGACIÓN DEL PROESTRO Y REDUCCION DEL PERIODO DE
INSERCIÓN DEL DISPOSITIVO CON PROGESTERONA EN VAQUILLONAS
PARA CARNE INSEMINADAS A TIEMPO FIJO**

José Javier de la Mata

Comisión Asesora de Tesis

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

Co-Director: Dr. Med.Vet. (M.Sc., Ph.D.) Alejo Menchaca

Tribunal Examinador de Tesis

Med.Vet. (Ph.D.) Santiago Perez-Wallace

Med.Vet. (M.Sc.) Pablo Chesta

Med. Vet. (Ph.D.) Andrés Tríbulo

Presentación Formal Académica

Córdoba, 20 de Julio de 2016

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Gabriel Bó por la confianza y por todo el apoyo profesional durante la realización de esta Maestría. Con su ayuda no solo logré afianzar mis conocimientos, sino mejorar personal y profesionalmente. También quiero agradecer al Dr. Alejo Menchaca por su apoyo, consejos y ayuda durante este estudio. Gabriel y Alejo, son dos grandes personas, que fueron puntales importantes en mi formación y “contagiaron” la motivación para seguir estudiando y avanzado en este apasionante terreno de la reproducción bovina.

Agradezco a los Drs. Ignacio Videla Dorna y Lucas Cutaia del laboratorio Syntex por el aporte de productos hormonales, el continuo seguimiento y la confianza que me permitieron llevar a cabo los experimentos de este estudio.

Al Dr. Arturo de la Mata, gran padre y gran profesional que me inculcó la pasión por la reproducción bovina, y con quien trabajo diariamente en equipo compartiendo experiencias. Agradezco su activa participación en algunos de los experimentos realizados en esta tesis.

A los/las Drs./as. Oscar Goitia, Alberto Frene, Richard Núñez, Ana Meikle, Guido Kuffo Lara, Federico Cuadro y a las estudiantes de Medicina Veterinaria, Camila Brochado y Romina Artagaveyta quienes participaron de los experimentos, y sin ellos no hubiera sido posible realizar esta tesis.

Agradezco a las familias Teso y Macagno, por el aporte de establecimientos y animales y por la buena predisposición para desarrollar los experimentos en tiempo y forma. A Regoud Investissement Argentina SA por el aporte de establecimiento, animales y personal para realizar los experimentos.

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

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi familia:

A Cecilia Goitia, mi esposa y Julián de la Mata, mi hijo, quienes me dan amor y contención todos los días y felicidad absoluta.

A mis hermanos, Dolores y Manuel, siempre con su apoyo incondicional y mis ejemplos a seguir.

A mis padres Olga y Arturo, quienes me formaron como persona, contuvieron y apoyaron en todas las decisiones de mi vida.

A mi tía Marisa de la Mata, que también ha estado siempre, es una grandiosa persona con quien he compartido muchos e importantes momentos.

RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo evaluar la eficacia de un tratamiento de inseminación artificial a tiempo fijo a base de estrógenos y progestágenos (denominado: J-Synch) que consiste en reducir la duración del tratamiento con progesterona convencional a 6 días y prolongar el proestro. Se realizaron cuatro experimentos en vaquillonas *Bos taurus* para carne comparando el tratamiento J-Synch con un tratamiento Convencional con estrógenos y con 7 días de inserción del dispositivo de progesterona evaluando dinámica folicular, desarrollo luteal, concentraciones de estradiol y progesterona y la tasa de preñez. En el Experimento 1, se demostró que con el tratamiento J-Synch se logra tener un proestro de mayor duración con respecto al Convencional, con una diferencia de aproximadamente 28 h ($93,7 \pm 12,9$ h vs. $65,0 \pm 13,7$; $P < 0,05$). Las vaquillonas que recibieron el tratamiento J-Synch no difirieron con las que recibieron el Convencional en el diámetro del folículo ovulatorio, tasa ovulatoria, porcentaje ovulatorio y concentración sérica de estradiol preovulatoria. Por otro lado, la tasa de crecimiento folicular tendió a ser mayor ($P < 0,1$) y el tamaño del cuerpo lúteo luego de la ovulación fue mayor ($P < 0,05$) en las que recibieron el tratamiento J-Synch. Por último, las concentraciones séricas de progesterona durante los 12 días después de la ovulación también fueron mayores ($P < 0,05$) en las vaquillonas que recibieron el tratamiento J-Synch que el Convencional. El tratamiento J-Synch resultó en mayores tasas de preñez que las del Convencional cuando las condiciones nutricionales y condición corporal (CC) fueron óptimas [numéricamente en el Experimento 3 (59,7% vs. 53,1%) y significativamente en el Experimento 4 (67,9% vs. 46,6%; $P < 0,05$)]. Por el contrario, cuando las condiciones nutricionales fueron adversas y la CC fue baja, la tasa de preñez fue menor ($P < 0,05$) para este protocolo (Experimento 2; 37,8% vs. 49,3%). En conclusión, el protocolo corto de 6 días denominado J-Synch resulta en un proestro de mayor duración que el tratamiento Convencional, lo que genera una mayor concentración de progesterona durante la fase luteal subsiguiente. Las tasas de preñez fueron mayores en las vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch cuando las condiciones nutriciones fueron las adecuadas. Sin embargo, en condiciones nutricionales adversas los resultados con este protocolo fueron menores.

Palabras claves: Proestro, Estradiol, Progesterona, Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the efficacy of a new fixed-time artificial insemination treatment based on estrogen and progesterone (named: J-Synch), that consists in a reduced period of progesterone device insertion (6 days) and a prolonged proestrous, in ovulatory synchronization and fertility in *Bos Taurus* beef heifers. Four experiments were carried on, to compare a J-Synch protocol with a conventional protocol with estrogen and a 7-day progesterone device insertion, evaluating follicular dynamics, luteal development, estradiol and progesterone concentrations and pregnancy rate. In Experiment 1, J-Synch treatment showed a longer proestrous length ($P < 0,05$) respect the Conventional, with a difference approximately of 28 h ($93,7 \pm 12,9$ h vs. $65,0 \pm 13,7$). Heifers that were treated with J-Synch did not differ with those treated with Conventional treatment, finding similar follicular ovulatory diameter, ovulatory rate and preovulatory estradiol serum concentration. Moreover, follicular growth rate tended to be greater ($P < 0,1$) and the size of corpus luteum after ovulation was greater ($P > 0,05$) in heifers that received J-Synch treatment. Finally, progesterone serum concentration during 12 days after the ovulation was greater ($P < 0,05$) in heifers that received J-Synch protocol than heifers treated with Conventional protocol, during all the days of the study. When nutritional conditions and body score condition (BSC) were adequate, J-Synch protocol resulted in higher pregnancy rates than in the Conventional protocol [numerically in Experiment 3 (59,7 % vs. 53,1%) and significantly in Experiment 4 (67,9% vs. 46,6%; $P < 0,05$)] . On the other side, when nutritional conditions were adverse with low BSC, pregnancy rate was lower ($P < 0,05$) in J-Synch protocol (Experiment 2; 37,8% vs. 49,3%). In conclusion, the 6-day-protocol named J-Synch resulted in a longer proestrous length than in the Conventional protocol and with a higher progesterone concentration during the subsequent luteal phase. Pregnancy rate was greater in heifers treated with J-Synch protocol when nutritional conditions were adequate. However, pregnancy rate was lowered with this protocol when nutritional conditions were adverse.

Key words: Proestrous, Estradiol, Progesterone, Fixed-time artificial insemination

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
Factores relacionados con el éxito de un programa de IATF.....	3
Sincronización de la emergencia de la onda folicular y ovulación con estrógenos y progestágenos.....	4
Tratamiento Co-Synch + CIDR de 5 días.....	6
Madurez folicular y fertilidad en ganado bovino.....	7
Importancia del estradiol y la progesterona en el establecimiento y mantenimiento de la preñez.....	9
Tratamiento J-Synch.....	12
HIPOTESIS GENERAL	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
Animales e instalaciones.....	15
Experimento 1.....	17
Experimento 2.....	18
Experimento 3.....	20
Experimento 4.....	20
Ultrasonografías.....	22
Obtención de muestras de sangre y determinaciones hormonales.....	23
Análisis estadístico.....	23
Capítulo 3. RESULTADOS	25
Experimento 1.....	25
Concentraciones séricas hormonales.....	26
Experimento 2.....	30

Experimento 3.....	32
Experimento 4.....	33
Capítulo 4. DISCUSIÓN	35
Capítulo 5. CONCLUSIONES	43
Capítulo 6. BIBLIOGRAFIA	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vaquillonas cíclicas sometidas al protocolo J-Synch o al tratamiento Convencional en el Experimento1.....	26
Tabla 3.2. Tasa de preñez de Experimento 2 por réplica y por grupo de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo.....	31
Tabla 3.3. Tasa de preñez del Experimento 3 en vaquillonas de carne inseminadas a tiempo fijo con tratamientos J-Synch o Convencional.....	32
Tabla 3.4. Tasa de detección de celo, tasa de concepción, tasa de preñez a la IATF y tasa de preñez acumulada en dos protocolos J-Synch o Convencional en vaquillonas de carne.....	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1. Vaquillonas Angus en establecimiento “Chañar Chico” de Teso SA en la provincia de La Pampa, Argentina, pertenecientes a la réplica 2 del Experimento 3.....**16**
- Figura 2.2. Instalaciones en establecimiento “San Sebastián” y equipamiento de ultrasonografía en Florida, Uruguay, durante el desarrollo del Experimento 1.....**16**
- Figura 2.3. Tratamientos J-Synch y Convencional, monitoreo ultrasonográfico folicular y luteal y toma de muestras de sangre aplicados en vaquillonas para carne en el Experimento.....**18**
- Figura 2.4. Diseño experimental de los Experimentos 2 y 3 (Grupo J-Synch; Grupo Convencional). En el grupo J-Synch, el Día 0 las vaquillonas recibieron 2 mg de benzoato de estradiol junto a la aplicación de un dispositivo intravaginal de progesterona (DIB 0,5 g) y cloprostenol en el día de la remoción del DIB (Día 6). En el Día 9, setenta y dos h luego del retiro del DIB, se inseminó a tiempo fijo junto con la administración de acetato de gonadorelina (GnRH). En el grupo Convencional, en el Día 0 las vaquillonas recibieron 2 mg de benzoato de estradiol junto a la aplicación de un DIB 0,5 g y cloprostenol y 0,5 mg de cipionato de estradiol en el día de la remoción del DIB (Día 7). En el Día 9, cincuenta y dos h desde el retiro del DIB, las vaquillonas fueron IATF. Los diagnósticos de gestación se realizaron mediante ultrasonografía.....**19**
- Figura 2.5. Diseño experimental de Experimento 4 en el que se combinó detección de estro e IATF en vaquillonas sincronizadas con tratamiento J-Synch o Convencional.....**21**
- Figura 3.1. Crecimiento folicular desde la remoción del DIB hasta 72 h en Experimento 1. Las vaquillonas del grupo Convencional recibieron 0,5 mg CPE al retiro del DIB, mientras que las del grupo J-Synch recibieron GnRH a las 72 h pos remoción del DIB.**27**
- Figura 3.2. Distribución de las ovulaciones luego de la sincronización con el tratamiento J-Synch o Convencional en el Experimento 1. Las vaquillonas del grupo J-Synch (n=21) recibieron BE y un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB) en el Día 0, en el Día 6 se removieron los DIB y se aplicó PGF2 α y en el Día 9 se aplicó GnRH. Las vaquillonas del grupo Convencional (n=24) el Día 0 recibieron BE y DIB, en el Día 7 se removieron los DIB junto a una dosis de PGF2 α y CPE.....**28**
- Figura 3.3. Desarrollo luteal desde el Día 4 a 12 pos ovulación en vaquillonas de los grupos J-Synch (n=21) y Convencional (n=24) en el Experimento 1.....**29**
- Figura 3.4. Concentración sérica de estradiol de las vaquillonas en el Experimento 1. Las vaquillonas del grupo Convencional recibieron 0,5 mg CPE al retiro del DIB, mientras

que las del grupo J-Synch recibieron GnRH a las 72 h pos remoción del DIB (Día 0=Ovulación)..... **29**

Figura 3.5. Concentración de progesterona en vaquillonas tratadas con J-Synch y Convencional en el Experimento 1.**30**

LISTA DE ABREVIATURAS

BE.....	Benzoato de estradiol
CC.....	Condición Corporal
cm.....	Centímetros
CL.....	Cuerpo Lúteo
CPE.....	Cipionato de estradiol
CV.....	Coefficiente de Variación
d.....	Días
DF.....	Dinámica Folicular
DIB.....	Dispositivo intravaginal
DL.....	Desarrollo Luteal
E-17 β	Estradiol 17 Beta
eCG.....	Gonadotrofina coriónica equina
FD.....	Folículo Dominante
g.....	Gramos
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotrofinas
h.....	Horas
IA.....	Inseminación Artificial
IATF.....	Inseminación Artificial a Tiempo Fijo
IFN τ	Interferón tau
IM.....	Intramuscular
Kg.....	Kilogramos
LH.....	Hormona Luteinizante
mg.....	Miligramos
MHz.....	Mega Hertz

mm.....	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
ml.....	Mililitros
MS.....	Muestreo de sangre
ng.....	Nanogramos
PGF _{2α}	Prostaglandina
PIV.....	Producción in vitro
pg.....	Picogramos
RPM.....	Revoluciones por minuto
SEM.....	Error estándar de la media
TE.....	Transferencia de embriones
TG.....	Tracto Genital
UI.....	Unidades Internacionales
US.....	Ultrasonografías

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El ciclo estral bovino ha sido estudiado en profundidad a lo largo de los años. La descripción de diferentes mecanismos fisiológicos durante el ciclo estral (revisado por Forde et al., 2011a) y la comprensión de las dinámicas foliculares ováricas (Adams et al., 2008), han permitido su manipulación práctica con fines productivos en los bovinos. Esta manipulación del ciclo estral permitió el avance de distintas técnicas de reproducción asistida (Machaty et al., 2012), siendo las más destacadas a nivel comercial la inseminación artificial (IA), la superovulación y transferencia de embriones *in vivo* (TE) y la producción de embriones *in vitro* (PIV). La IA ganó popularidad y comenzó a ser utilizada de forma masiva desde la implementación de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF; Bó et al., 2001; Baruselli et al., 2001), la cual no requiere la detección del estro, simplificando las horas de trabajo y las fallas en la eficiencia de la técnica. Todas estas biotecnologías de la reproducción permiten mejorar la eficiencia de un rodeo, generando un progreso genético y logrando mayor rentabilidad.

En la actualidad existe una amplia gama de tratamientos de IATF disponibles para ser utilizados tanto en rodeos de carne como para producción lechera (Colazo et al., 2009; Bó et al., 2013). Básicamente los programas de IATF utilizados en la actualidad se agrupan según el tipo de hormona utilizada. Los protocolos denominados “OvSynch” (Thatcher et al., 1989; Pursley et al., 1995; Twagiramungu et al., 1995) y “Co-Synch” (Geary et al., 2001) utilizan análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y prostaglandinas (PGF 2 α) para la sincronización de la ovulación. También los

tratamientos “Co-Synch” han sido utilizados junto a la inserción de un dispositivo con progesterona (Martínez et al., 2002) resultando en mejores tasas de preñez en vaquillonas de carne. Por otro lado, los protocolos que emplean estradiol 17 β (E17 β ; Bó et al., 1994, 1995a, 1995b) o benzoato de estradiol (BE; Caccia y Bó, 1998; Moreno et al., 2001; Bó et al., 2002) junto con progesterona comúnmente administrada vía dispositivos intravaginales, han sido empleados para manipular la atresia folicular y emergencia de ondas foliculares y sincronización de la ovulación. En los últimos años, este último tratamiento se vio simplificado debido a la aplicación de cipionato de estradiol (CPE) como inductor de ovulación (Colazo et al., 2003), logrando alcanzar aceptables tasas de preñez en vacas de carne (Colazo et al., 2003; Uslenghi et al., 2014; Torres-Júnior et al., 2014). En general, tanto con protocolos de IATF a base de GnRH como con sales de estradiol y progesterona, las tasas de preñez promedian un 50 % en rodeos de razas para carne (Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2003; 2013; Cutaia et al., 2003).

En 2008, Bridges et al., presentaron un tratamiento Co-Synch modificado, utilizando además de GnRH y PGF2 α , un dispositivo con progesterona (CIDR, Zoetis) por 5 días. El protocolo fue denominado genéricamente Co-Synch de 5 días, con IATF/GnRH a las 72 h de retirado el CIDR, que resultó en tasas de preñez superiores a las obtenidas con un tratamiento Co-Synch + CIDR de 7 días, con IATF/GnRH a las 60 h. Este nuevo tratamiento se basó en varios estudios realizados en los que se determinó que la prolongación del proestro (en estos trabajos, período considerado desde la aplicación del agente luteolítico hasta la administración del inductor de ovulación) y la concentración sérica de estradiol preovulatoria, fueron las variables que más se correlacionaron con la fertilidad luego de una IA (Mussard et al., 2003, 2007, Bridges et al., 2010). Colazo y Ambrose (2011) encontraron una predicción probabilística del 80,1% de preñez cuando el proestro era de 72 h, siendo la fertilidad menor cuando el período era mayor o menor a 72 h.

En 2012, se desarrolló un nuevo tratamiento denominado “J-Synch” (de la Mata y Bó, 2012), que utiliza BE y progesterona por un período reducido de tiempo (6 días), reduciendo de esta manera el período de dominancia, y GnRH como inductor de la ovulación a las 72 h, promoviendo un proestro prolongado. Los resultados demostraron que el protocolo J-Synch es un tratamiento eficiente para sincronizar la ovulación en vaquillonas para carne de manera similar al protocolo Co-Synch de 5 días (de la Mata y Bó 2012; de la Mata et al., 2015).

Factores relacionados con el éxito de un programa de IATF

Las principales ventajas en programas de IA son la mejora genética, el aumento en la producción de kilos por vaca/vaquillona inseminada y la posibilidad de utilizar toros de bajo peso al nacer en el caso de vaquillonas púberes. El éxito en el resultado de la aplicación de esta técnica depende de varios factores como: 1) categoría del animal, 2) condición corporal (CC) y nutrición, 3) calidad seminal, 4) estrés y manejo. El estadio fisiológico del animal, así como su edad, la pubertad y su correlación con la CC, son factores importantes (Smith et al., 2012). Cuando se trate de vacas posparto para carne, el grado de anestro será clave en el éxito del resultado (Cutaia et al., 2003). Las tasas de preñez están directamente relacionadas al grado de CC y con el grado de anestro (Yavas y Walton; 2000), existiendo en la actualidad diferentes alternativas para lograr un mejoramiento con la aplicación de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en los tratamientos de sincronización para IATF (Baruselli et al., 2004; Núñez-Olivera et al., 2014; Pessoa et al., 2015). Los peores resultados se obtienen con bajas CC y el consecuente estatus ovárico de anestro típicos de sistemas de producción pastoriles extensivos.

La calidad del semen a ser utilizado también es un factor que influye en la tasa de fertilización y por ende en la tasa de preñez (Saake et al., 1994). Los atributos más

destacados de los espermatozoides necesarios para la fertilización contemplan morfología, motilidad progresiva, capacidad de motilidad hiperactiva e integridad de membranas como lo mencionan Amann y Hammerstedt (1993, citado de Dalton, 2013). Barth, (1995), recomienda realizar un examen de calidad previamente a la IATF, en el que deben encontrarse un mínimo de 25% de células motiles, con vigor 3 (0=sin movimiento, 5=movimiento rápido) inmediatamente luego del descongelado y un 15% de células motiles a un vigor 2 luego de 2 horas en incubación a 37 °C. La morfología debe tener un mínimo de 70% de espermatozoides normales y con no más del 15 a 20% de defectos de cabeza y del 25% de defectos de cola y acrosomas. El estrés y manejo de los animales muchas veces no es considerado, sin embargo en la bibliografía se reportaron varias publicaciones en las que observaron menores tasas de preñez en animales poco dóciles o con peor temperamento (Cooke, et al., 2009a; 2009b; 2010a; 2010b; 2011). La sumatoria de los diferentes factores afectará en cierta medida la performance en los resultados y no existe solo un factor que determine el éxito o fracaso de un programa de IATF.

Sincronización de la emergencia de la onda folicular y ovulación con estrógenos y progestágenos

En países en los que está disponible el uso de estradiol (estradiol 17- β o benzoato de estradiol) y progestágenos (dispositivos intravaginales o implantes auriculares) como en los países Latinoamericanos y Australia, entre otros, estas son las principales hormonas utilizadas para manipular y controlar el ciclo estral tanto en programas de IATF (Bó et al., 2013), como en sincronización de receptoras de embriones a tiempo fijo (Bó et al., 2012) y donantes de embriones en protocolos de superovulación (Baruselli et al., 2011) tanto en *Bos indicus* como en *Bos taurus*.

El BE y el E 17- β con o sin la administración de progesterona intramuscular (IM) y con la aplicación de un dispositivo intravaginal con liberación de progesterona,

demonstraron ser muy eficientes en varios estudios (Bó et al., 1995, Caccia y Bó, 1998; Martínez et al., 2000; Moreno et al., 2001) para sincronizar la emergencia de una nueva de onda de desarrollo folicular, iniciando aproximadamente cuatro días más tarde y con un alto porcentaje de animales sincronizados (>90%). Esto permite que todos los animales tengan en el Día 7 u 8, momento de la remoción del dispositivo y la aplicación de una dosis luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ un folículo dominante (FD) desarrollado capaz de ovular después de la administración de 1 mg de BE 24 h más tarde (Bó et al., 2002) o 0,5 mg CPE en el mismo momento de la remoción del dispositivo (Colazo et al., 2003). El tratamiento con CPE en el momento del retiro del dispositivo con progesterona es hoy el más utilizado para reducir el número de veces que los animales pasan por la manga (Bó et al., 2014). El momento óptimo de inseminación en estos tratamientos tiene un rango de 48 y 54 h desde la aplicación de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, que dependerá de la categoría del animal y de la dosis de progesterona que contengan los dispositivos utilizados. Recientemente se realizaron una serie de experimentos en Uruguay sobre 8.712 animales (Menchaca et al., 2013), con el objetivo de determinar el mejor horario de inseminación a tiempo fijo (48 vs 54 h) en vaquillonas *Bos taurus* tratadas con BE, progesterona, eCG y CPE, no encontrándose diferencias entre ambos momentos de inseminación, siendo posible inseminar las vaquillonas tanto a la mañana como de tarde sin afectar las tasas de preñez. Sin embargo, las vaquillonas que presentaron cuerpos luteos (CL) al inicio del tratamiento se preñaron alrededor de 7 puntos porcentuales por encima de las que no presentaban un CL ($P < 0,05$) y en todos los casos la tasa de preñez fue superior al 50%. Otra alternativa en vaquillonas en anestro (Menchaca et al., 2006), fue la combinación de BE y dispositivos con progesterona por 7 días y 300 UI de eCG al retiro y un análogo de GnRH a las 48 h, para inseminar a tiempo fijo entre 52 y 56 h. En este trabajo, la combinación de GnRH y eCG luego del tratamiento con progesterona, resultó en tasas de preñez superiores al compararse con 1,0 mg de BE como inductor de ovulación y eCG ($P < 0,05$), siendo durante varios años el tratamiento recomendado en Uruguay para vaquillonas. Sin embargo, otros trabajos realizados en Argentina no encontraron una tasa de preñez superior en vaquillonas tratadas con BE o GnRH como inductores de la ovulación (Bó et al., 2005). Algunos años después cuando este protocolo con GnRH a las 48 h se lo comparó con 0,5 mg de CPE al retiro del dispositivo (Menchaca et al., 2013), no se encontraron diferencias significativas siendo

este último más sencillo de aplicar y más económico, sustituyendo así al protocolo con GnRH. A su vez en Argentina se comparó el protocolo utilizando BE y CPE como inductor de la ovulación y si bien en algunos trabajos no se encontraron diferencias significativas (Bó et al., 2005) en otros trabajos el uso de CPE resultó en menores tasas de preñez que el BE (Uslenghi et al., 2014). No obstante, el uso de CPE es masivo en los países de la región por su practicidad (Bó et al., 2013).

Tratamiento Co-Synch + CIDR de 5 días

El protocolo para IATF en vacas y vaquillonas más difundido en EEUU utiliza GnRH y un dispositivo con progesterona por 7 días, con una tasa de preñez cercana al 50%. Bridges et al. (2008), compararon un protocolo Co-Synch de 7 días con un dispositivo de progesterona con IATF a las 60 h y un protocolo Co-Synch de 5 días con IATF a las 72 h en vacas de razas para carne. En este estudio, las tasas de preñez fueron 10,5 puntos porcentuales superiores en las tratadas con Co-Synch de 5 días. Resultados similares fueron reportados en vacas lecheras con una mejora significativa en las tasas de preñez en los animales que recibieron un Co-Synch de 5 días (Santos et al., 2010). En vaquillonas de razas de carne de 15 meses también demostró ser exitoso el tratamiento Co-Synch de 5 días con IATF a las 72 h cuando se comparó con otros dos protocolos (Perry et al., 2012) alcanzando tasas de preñez por encima de 60%, teniendo un gran impacto en los resultados la presencia de ciclicidad en las vaquillonas inseminadas. En estudios recientes (Whittier et al., 2013) se reportó que las vacas cruce Angus sincronizadas con el Co-Synch de 5 días, tuvieron mayor porcentaje de preñez que aquellas que recibieron un protocolo Co-Synch de 7 días (58,1% vs. 55,1%; $P < 0,05$).

En los últimos cinco años se han discutido algunas modificaciones en el tratamiento Co-Synch de 5 días tanto en la necesidad de aplicar la primera dosis de GnRH al inicio, el efecto de una simple o doble dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al retiro del dispositivo el Día 5

para asegurar la luteólisis de los CL inducidos por la primera dosis de GnRH, como horarios de inseminación, en vacas y vaquillonas de razas lecheras o carniceras. En un estudio de Rabaglino et al. (2010), no se encontraron diferencias en la regresión del CL en vaquillonas lecheras que ovularon a la primera dosis de GnRH en el momento de la IATF al aplicar 1 vs. 2 dosis de PGF_{2α} en el Día 5. Además, en otro estudio, Colazo y Ambrose (2011) demostraron que la primera dosis de GnRH no fue necesaria para lograr tasas de preñez aceptables en vaquillonas para leche. En vacas para carne también se evaluó la necesidad de administrar 1 o 2 dosis de PGF_{2α} en el Día 5, demostrando la misma eficiencia dos dosis de PGF_{2α} (25 mg por dosis de dinoprost) administradas conjuntamente en dos puntos de inoculación IM, o dos dosis separadas con un intervalo de 8 h (50 mg de dinoprost) en vacas para carne (Bridges et al., 2012a). En vaquillonas para carne algunos reportes indicaron que se obtuvieron mayores tasas de preñez al aplicar dos dosis de PGF_{2α} (Peterson et al., 2011) mientras que en otros estudios se reportaron resultados similares, a pesar de haber recibido o no la primera dosis de GnRH (Kasimanickam et al., 2014) tanto en vaquillonas de carne como de leche. Este último estudio concuerdan con lo reportado por Cruppe et al. (2014), que concluyeron que en vaquillonas para carne de 15 meses tratadas con el protocolo Co-Synch de 5 días, la omisión de la primera GnRH (en el Día 0) no afectó la tasa de preñez a la IATF, y una dosis única de PGF_{2α} al retiro del dispositivo fue efectiva para inducir la luteólisis a pesar de haber o no recibido la dosis inicial de GnRH. Con respecto a los horarios de inseminación, se han reportado estudios comparando los resultados de preñez a la IATF en vaquillonas para carne sincronizadas con tratamientos Co-Synch de 5 días. En un estudio en el que se utilizaron un total de 1098 vaquillonas cruce Angus (Kasimanickam et al., 2012), se comparó la IATF a las 56 h vs. la IATF a las 72 h desde el retiro de los dispositivos en el Día 5. Las vaquillonas inseminadas a las 56 h tuvieron en promedio de 10,3 puntos porcentuales más de tasa de preñez a la IATF que las vaquillonas inseminadas a las 72 h.

Madurez folicular y fertilidad en ganado bovino

La capacidad ovulatoria de un folículo dominante (>10 mm) se adquiere luego que este supera el diámetro de desviación (>8,5 mm) tal como fue reportado en un experimento utilizando vacas lecheras (Sartori et al., 2001). La ovulación de folículos de pequeño diámetro produjo menor fertilidad debido al desarrollo de un CL pequeño que generó bajas concentraciones séricas de progesterona en circulación en la fase luteal subsiguiente (Vasconcelos et al., 2001; Busch et al., 2008). Esto es observado durante el desarrollo temprano del CL, mientras que al alcanzar la maduración del CL después del Día 8 del ciclo estral, su tamaño no influye en las concentraciones circulantes de progesterona (Mann, 2009). Durante mucho tiempo, se consideró al tamaño folicular como el principal indicador de madurez folicular al momento de sincronizar la ovulación en programas de IA. Perry et al. (2005), encontraron menores tasas de preñez cuando se indujo a ovular con GnRH vacas de carne posparto con folículos menores a 11 mm, y a su vez incrementaron las mortalidades embrionarias/fetales. Esto se asoció con menores concentraciones séricas de estradiol preovulatorio y una consecuente menor concentración sérica de progesterona después de la IA, aunque estos efectos no fueron evidentes en folículos pequeños que ovularon espontáneamente. En vaquillonas de carne se encontró un máximo de probabilidad de preñez cuando el tamaño folicular en el momento de la IA fue de 12,8 mm, mientras que al presentar FD por debajo de 10,7 mm o por encima de 15,7 mm tuvieron menos chances de lograr una preñez (Perry et al., 2007). En vaquillonas que fueron inducidas a ovular folículos inmaduros se redujo el diámetro folicular ovulatorio, la función luteal y la tasa de concepción a la IA (Mussard et al., 2007). Además, se demostró que a un diámetro folicular constante, la duración del proestro tuvo una influencia sustancial sobre la tasa de concepción y estuvo positivamente relacionado con la maduración folicular y fertilidad (Day et al., 2010). Atkins et al., (2013) observaron que en vacas receptoras de embriones en el Día 7 del ciclo estral, la fertilidad se correlacionó con el diámetro folicular ovulatorio, la producción de estradiol preovulatorio y la subsecuente producción de progesterona (independientemente del tamaño del folículo de la donante) luego de una recuperación y transferencia de un único embrión. Por esto, se puede concluir que el diámetro folicular como único indicador de madurez folicular resulta inconsistente y otros factores como las concentraciones séricas de estradiol y progesterona y duración del

proestro, también deberían tenerse en cuenta, sobre todo en tratamientos a base de GnRH que son menos eficientes que el estradiol para sincronizar una nueva onda folicular.

Importancia del estradiol y la progesterona en el establecimiento y mantenimiento de la preñez

La tasa de fertilización en vaquillonas y vacas lecheras de moderada producción y en vaquillonas productoras de carne está en el orden del 90 al 100% cuando se utiliza semen de probada fertilidad (Sreenan y Diskin, 1980; Diskin and Sreenan, 1986). A medida que transcurre el tiempo luego de la fecundación en el oviducto, las pérdidas embrionarias se producirán por diferentes causas hasta alcanzar aproximadamente un 40 o 55%, con un máximo de pérdidas estimado entre el 70 a 80% entre los Días 8 y 16 luego de la IA (revisado por Diskin et al., 2016). El éxito en la tasa de preñez luego de un programa de IATF dependerá de varios factores tales como la sincronización de la ovulación de un ovocito competente, las concentraciones de estradiol preovulatorias adecuadas y producciones de progesterona por parte del CL adecuadas (revisado por Bridges et al., 2013; Geary et al., 2013; Lonergan et al., 2016). Las concentraciones de estradiol preovulatorio y progesterona luteal coordinan la regulación de sus propios receptores en el útero (Meikle et al., 2001; Kimmins y MacLaren, 2001). Las concentraciones de estrógenos preovulatorias preparan al útero durante el estro y la fase luteal temprana produciendo una regulación positiva (*up-regulation*) tanto para los receptores nucleares de estradiol (ESR1) como de progesterona (PGR; Ing et al., 1996; 1997) y otros como IGF-1 a nivel endometrial (Meikle et al., 2001, Sosa et al., 2010). Esto produce una serie de cambios en la expresión génica endometrial relacionados con proliferación celular y secreciones en el útero y oviducto. Ante el déficit de secreción de estradiol preovulatorio, se ve imposibilitada la señal para inducir la inhibición total de los receptores de oxitocina en el endometrio durante la fase luteal (Mann y Lamming, 2000). Por ello, la oxitocina se une a sus receptores causando una liberación prematura de PGF_{2α} y la consecuente regresión del CL (Mann y Lamming, 2000). Estos casos pueden darse tanto

en vacas posparto como en vaquillonas prepúberes en presencia de ciclos cortos o durante una sincronización de la ovulación en animales que no alcancen niveles mínimos de estradiol para continuar con una fase luteal de normal duración. Las concentraciones preovulatorias de estradiol también probablemente tengan un gran impacto en el éxito de la preñez a través del transporte de gametos y/o regulación del medioambiente uterino (Geary et al., 2013) y en el oviducto (Gonella-Díaz et al., 2015). Recientemente, se llevó a cabo un trabajo en un modelo animal novedoso sobre vacas ovariectomizadas que recibieron diferentes sales de estradiol exógeno, con el objetivo de examinar el rol del estradiol preovulatorio en la sobrevivencia de un embrión transferido en el Día 7 del ciclo estral (Madsen et al., 2015). Se indujo el establecimiento de la gestación mediante soporte hormonal exógeno y este trabajo permitió demostrar la importancia del estradiol preovulatorio durante los primeros 29 días de gestación debido a un efecto directo sobre el medioambiente uterino. El período crítico de las pérdidas embrionarias en vacas debido a déficit de estradiol fue alrededor de los Días 22 y 24, durante la implantación. Otros autores también observaron que el incremento preovulatorio de estradiol resultó en un incremento en el éxito de la preñez (Perry et al., 2005; 2007; Lopes et al., 2007; Bridges et al., 2010). Además, la exposición al estradiol durante el período preovulatorio fue necesaria para un continuo crecimiento embrionario (Madsen et al., 2015), incrementando a su vez, la competencia ovocitaria, mejorando el transporte espermático y la calidad embrionaria (Larimore et al., 2015).

La progesterona juega un rol clave en eventos reproductivos asociados con el establecimiento y mantenimiento de la preñez y en la regulación endometrial de secreciones esenciales para la estimulación y cambios del *conceptus* (Lonergan y Forde, 2014). El crecimiento y desarrollo del *conceptus* requiere de la acción de la progesterona sobre el útero para regular la función endometrial, incluyendo interacciones *conceptus*-madre (Garrett et al., 1988), reconocimiento de la preñez y la receptividad uterina en la implantación (Spencer et al., 2007). Al igual que el estradiol, la progesterona es la encargada de autorregular sus propios receptores uterinos como los de estrógeno. Al aumentar sus niveles plasmáticos durante la fase luteal temprana se produce una regulación

negativa (*down-regulation*) sobre los receptores ESR1 y PGR uterinos, disminuyendo la concentración de los mismos a partir de la luteólisis (Meikle et al., 2001). Se ha observado, que estos cambios están relacionados a la preparación del endometrio y la composición de la secreción histotrófica o fluido uterino para la recepción del embrión en el Día 4 después de la ovulación, cuando el embrión presente el estadio de 16 células aproximadamente hasta su posterior elongación (Forde et al., 2009). Tan pronto como se forma el estadio de mórula alrededor del Día 5 o 6, en el Día 7 se forma el de blastocisto. Después de la eclosión de la zona pelúcida en el Día 8 o 9, el blastocisto comienza a crecer y a cambiar de forma de esférico a ovoide y filamentoso para continuar con la elongación entre el Día 12 y 14. El *conceptus* así formado, continua creciendo y comienza a secretar interferón tau (IFN τ) alrededor del Día 16, el cual interviene en el bloqueo de las prostaglandinas, evitando el mecanismo de luteolisis (Thatcher et al., 1995). Si bien no se conocen con exactitud los valores óptimos que deberían alcanzar los niveles plasmáticos de progesterona, existe una correlación entre la concentración plasmática de progesterona materna con la producción de IFN τ por el *conceptus* (Kerbler et al., 1997; Mann et al., 2006). Las concentraciones de progesterona elevadas a partir del Día 3 del ciclo, incrementaron significativamente el crecimiento en longitud del embrión (durante la elongación), con mayor producción de IFN τ y mayor tasa de preñez (Mann y Lamming 2001, Inskeep et al., 2004, McNeill et al., 2006). Una vez producido el reconocimiento materno-fetal, se desarrollaran diferentes mecanismos que dan paso a la implantación embrionaria (Spencer et al., 2007). Hasta el estadio de blastocisto, el embrión se puede definir como “autónomo” y esto se puede evidenciar en el hecho que en vacas donantes superovuladas pueden transferirse a receptoras vacías sincronizadas, y el tracto reproductivo no necesita estar expuesto al embrión antes del Día 7 y existen reportes hasta el Día 16 (Betteridge et al., 1980). Sin embargo el *conceptus* en el período poseclosión y en la preimplantación depende de secreciones histotróficas endometriales (glándulas). Después del Día 16 existen cambios significativos y detectables en la expresión génica del endometrio (Forde et al., 2009) cuando el endometrio responde a secreciones del *conceptus* filamentoso. Ante cualquier disminución en las concentraciones de progesterona circulante podrá desencadenar una pérdida embrionaria.

Tratamiento J-Synch

En 2012, se desarrolló un nuevo tratamiento denominado “J-Synch” (de la Mata y Bó, 2012), que se basó en el uso de BE y un dispositivo con progesterona por un período de 6 días en lugar de 7 u 8 días como los tratamientos comúnmente utilizados (Convencionales) y GnRH como inductor de ovulación a las 72 h posteriores al retiro del dispositivo intravaginal. Esto permitió disminuir el período de dominancia y prolongar el proestro, ya que se demostró que la calidad embrionaria puede verse afectada cuando la dominancia de un folículo ovulatorio aumenta más de 1,5 días (Cerri et al., 2009) y la prolongación del proestro se correlacionó con mayores concentraciones séricas de estradiol, aumentando la fertilidad en la IATF (Bridges et al., 2008; 2010). Comparando el protocolo J-Synch vs. el Co-Synch de 5 días en vaquillonas de carne (de la Mata y Bó, 2012), los tratamientos no difirieron ($P > 0,1$) en la tasa ovulatoria (91,6% vs. 92,8%), hora media de ovulación ($97,1 \pm 17,4$ h vs. $95,1 \pm 12,5$ h), diámetro de folículo ovulatorio ($11,7 \pm 0,2$ vs. $12,0 \pm 0,5$ mm), ni en el porcentaje de concepción (50% vs. 57%). Datos similares fueron encontrados en vaquillonas Holando-Argentino (Ré et al., 2014). Además este tratamiento demostró alcanzar aceptables tasas de preñez en receptoras de embriones sincronizadas y transferidas en el Día 7, con una tasa de preñez que superó el 55% (de la Mata et al., 2013a). Estos estudios previos con este nuevo tratamiento dieron origen a los experimentos realizados en la presente tesis.

HIPÓTESIS GENERAL

La implementación de un protocolo de IATF que se caracteriza por la prolongación del proestro y la reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona, denominado J-Synch, aumenta las tasas de preñez en comparación con un tratamiento Convencional en vaquillonas *Bos taurus* para carne.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la utilización de un tratamiento de IATF que se caracteriza por la prolongación del proestro y la reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona, denominado J-Synch, sobre la dinámica folicular, niveles hormonales y tasas de preñez en vaquillonas *Bos taurus* para carne

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar la tasa de crecimiento folicular, diámetro del folículo ovulatorio, momento ovulatorio, tasa ovulatoria y desarrollo luteal, en vaquillonas para carne tratadas con el protocolo J-Synch (Experimento 1).

Evaluar las concentraciones séricas de estrógenos y progesterona durante el proestro y fase luteal en vaquillonas para carne tratadas con el protocolo J-Synch (Experimento 1).

Comparar las tasas de preñez en vaquillonas *Bos taurus* para carne sincronizadas con el protocolo J-Synch con un protocolo Convencional que utiliza sales de estradiol y progesterona (Experimentos 2, 3 y 4).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales e instalaciones

Para este trabajo se utilizaron vaquillonas *Bos taurus* de razas británicas cíclicas de entre 15 y 24 meses de edad, de establecimientos ganaderos de las provincias de La Pampa y Buenos Aires en Argentina y en el Departamento de Florida en Uruguay, en condiciones de pastoreo natural y/o pasturas implantadas (Figura 2.1). Para la selección de las vaquillonas se utilizaron los siguientes criterios: condición corporal mayor a 4 [escala del 1 (flaca) al 9 (obesa)], peso corporal mayor a 270 Kg, con un desarrollo uterino apropiado (diámetro de los cuernos próximo a la bifurcación mayor a 2 cm aproximadamente) y con presencia de CL y/o folículos mayores a 10 mm de diámetro en los ovarios (Gutierrez et al., 2014). Los animales fueron manejados en instalaciones adecuadas (corrales, mangas y cepos) que se encontraban en los establecimientos donde se realizaron los experimentos (Figura 2.2).



Figura 2.1. Vaquillonas Angus en establecimiento “Chañar Chico” de Teso SA en la provincia de La Pampa, Argentina, pertenecientes a la réplica 2 del Experimento 3.



Figura 2.2. Instalaciones en establecimiento “San Sebastián” y equipamiento de ultrasonografía en Florida, Uruguay, durante el desarrollo del Experimento 1.

Experimento 1

Se diseñó un experimento en Florida en Uruguay para comparar el protocolo J-Synch vs. el protocolo Convencional, evaluando dinámica folicular, momento ovulatorio, desarrollo luteal y concentración sérica de los principales esteroides sexuales (estradiol y progesterona). Se utilizaron 48 vaquillonas cíclicas Hereford y Angus, con un peso promedio de 348 Kg (rango 285 – 420) y con una condición corporal (CC) media de 5 (escala 1 al 9). Los animales se dividieron en dos grupos: J-Synch (n=24) y Convencional (n=24). El tratamiento J-Synch, consistió en la administración de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol®, Syntex SA, Argentina) y un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0,5 g®, Syntex SA, Argentina) en el Día 0. En el Día 6 se removieron los DIB y se administró 500 µg de cloprostenol (PGF_{2α}; Ciclase DL®, Syntex, Argentina). En el Día 9 (72 h pos retiro de DIB) se administró una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH; Gonasyn Gdr®, Syntex, Argentina). El tratamiento Convencional consistió en 2 mg de BE y un DIB 0,5 (Syntex SA, Argentina) en el Día 0. En el Día 7 se administró PGF_{2α} (Ciclase DL®, Syntex, Argentina), 0,5 mg de cipionato de estradiol (CPE; Cipyosin®, Syntex, Argentina) y se retiraron los DIB. Todas las hormonas inyectables se administraron por vía intramuscular (IM) profunda con agujas 40 x 12 -18 G x 1 ½ y jeringas de volumen adecuado (3 o 5 ml totales). El diseño experimental se observa en la Figura 2.3.

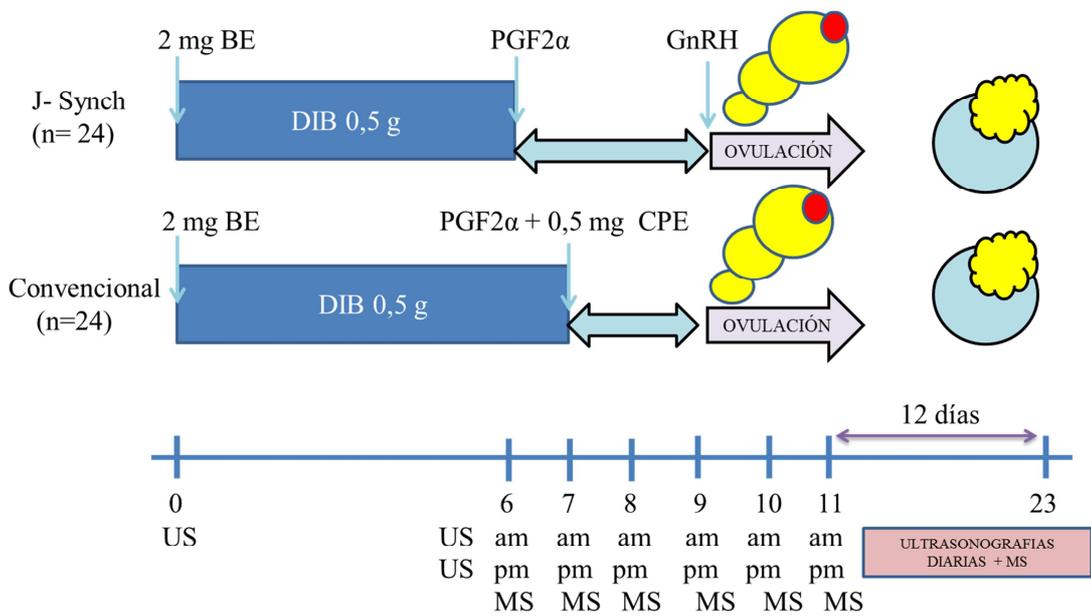


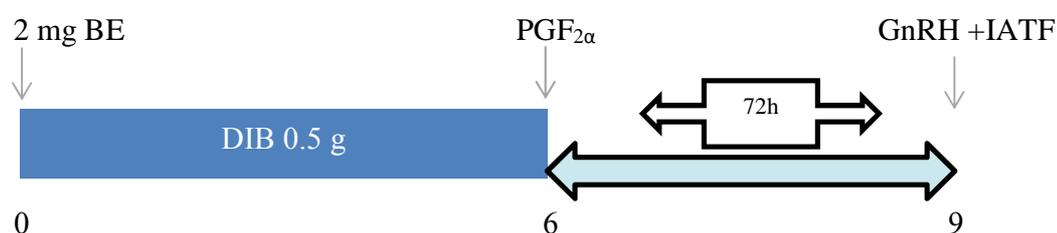
Figura 2.3. Tratamientos J-Synch y Convencional, monitoreo ultrasonográfico folicular y luteal y toma de muestras de sangre aplicados en vaquillonas para carne en el Experimento 1.

Experimento 2

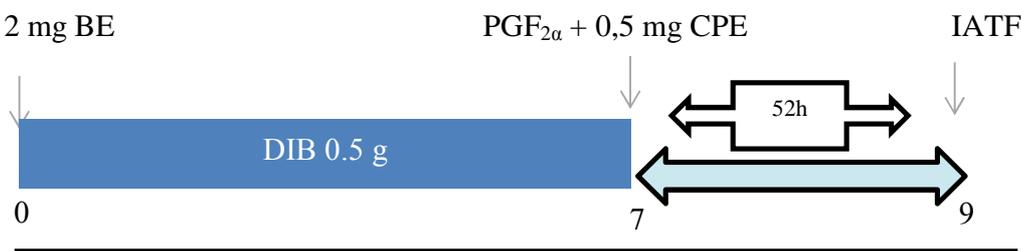
En este experimento se llevaron a cabo cuatro réplicas sobre 555 vaquillonas Angus y Angus x Hereford de establecimientos de La Pampa y Buenos Aires, para evaluar la fertilidad en vaquillonas inseminadas con un tratamiento J-Synch vs. un tratamiento Convencional. Las réplicas se realizaron en los meses de invierno y en condiciones de sequía que causó una menor disponibilidad forrajera y por lo tanto una menor calidad nutricional durante todo el experimento con la consecuente disminución de la CC en los animales (de $5,3 \pm 0,6$ a $4,3 \pm 0,5$). Todas las vaquillonas recibieron un dispositivo y 2 mg de BE IM en el Día 0. Las vaquillonas del grupo Convencional ($n=280$) recibieron $PGF_{2\alpha}$, 0,5 mg de CPE IM y se retiraron los DIB en el Día 7. Las vaquillonas fueron inseminadas a tiempo fijo (IATF) en el Día 9 (a partir de las 52 h luego de la remoción del DIB). Las

vaquillonas del grupo J-Synch (n=275), recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ y remoción del DIB en el Día 6. En el Día 9 recibieron GnRH, y fueron IATF a las 72 h luego de la remoción del DIB. En todos los animales se utilizó pintura en la base de la cola, como método de ayuda visual para la detección de la manifestación de estro. La pintura utilizada en la base de la cola el día del retiro del DIB fue Painstik® (LA-CO Industries, Inc. USA) y el grado para evaluar fue subjetivo, considerando como manifestación de estro cuando la pintura fue “borrada” o sin manifestación de celo cuando la pintura permaneció sin alteraciones (“intacta”). Las dosis de semen utilizadas en todas las réplicas fueron de toros de probada fertilidad y de centros de inseminación de referencia de Argentina. Las dosis fueron evaluadas previamente a su utilización basándose en los valores mínimos referidos por Barth (1995). La tasa de preñez se determinó por ultrasonografía o palpación transrectal entre los 60 - 90 días pos inseminación. El diseño experimental puede observarse en la Figura 2.4.

J-Synch



Convencional



Referencias: BE (2 mg benzoato de estradiol), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (500 μg cloprostenol), GnRH (100 μg acetato de gonadorelina), CPE (0.5 mg cipionato de estradiol), IATF (inseminación artificial a tiempo fijo).

Figura 2.4. Diseño experimental de los Experimentos 2 y 3 (Grupo J-Synch; Grupo Convencional). En el grupo J-Synch, el Día 0 las vaquillonas recibieron 2 mg de benzoato de estradiol junto a la aplicación de un dispositivo intravaginal de progesterona (DIB 0,5 g) y cloprostenol en el día de la remoción del DIB (Día 6). En el Día 9, setenta y dos h luego del retiro del DIB, se inseminó a tiempo fijo junto con la administración de acetato de gonadorrelina (GnRH). En el grupo Convencional, en el Día 0 las vaquillonas recibieron 2 mg de benzoato de estradiol junto a la aplicación de un DIB 0,5 g y cloprostenol y 0,5 mg de cipionato de estradiol en el día de la remoción del DIB (Día 7). En el Día 9, cincuenta y dos h desde el retiro del DIB, las vaquillonas fueron IATF. Los diagnósticos de gestación se realizaron mediante ultrasonografía.

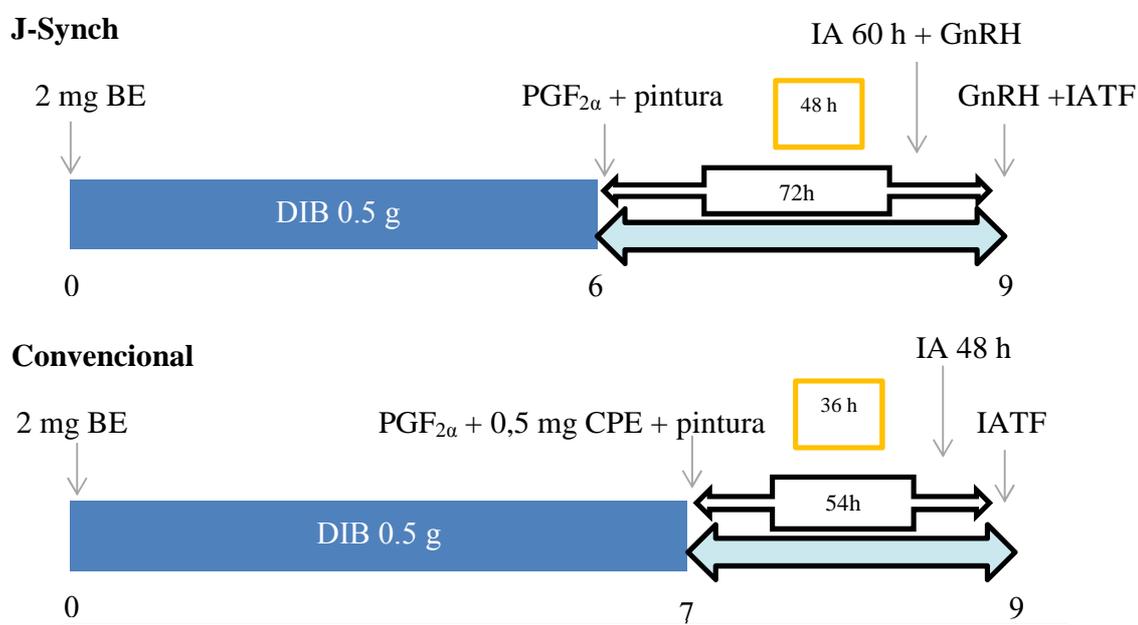
Experimento 3

En este experimento se llevaron a cabo 4 réplicas sobre 583 vaquillonas Angus y Hereford de establecimientos de La Pampa, y se evaluó la fertilidad con un tratamiento J-Synch (n=293) vs. Convencional (n=290). Los tratamientos fueron los mismos que en el Experimento 2, pero con la diferencia que estos se realizaron en la estación de primavera, con condiciones nutricionales óptimas y una abundante oferta forrajera. La tasa de preñez se determinó por ultrasonografía entre 30 y 45 días pos inseminación. El diseño experimental puede observarse en la Figura 2.4.

Experimento 4

Este experimento se llevó a cabo en la estación de primavera en un establecimiento de La Pampa, con 208 vaquillonas Angus y Hereford, para evaluar la tasa de preñez en una combinación de detección de estro e IATF. En este caso los tratamientos fueron los mismos que en los experimentos anteriores y se utilizó pintura en la base de la cola, el día del retiro del DIB, como método visual de detección de estro. Las vaquillonas del grupo Convencional (n=105) que presentaron pintura “borrada” a las 36 h pos retiro de DIB, recibieron una IATF a las 48 h, mientras que las que tuvieron la pintura “intacta” (aquellas que manifestaron estro tardíamente o no lo hicieron), se inseminaron más tarde (54 h). Las

vaquillonas del grupo J-Synch (n=103) que presentaron pintura "borrada" a las 48 h pos retiro de DIB, fueron IATF a las 60 h junto con una dosis de GnRH mientras que las que tuvieron pintura "íntacta" (aquellas que manifestaron estro tardíamente o no lo hicieron), fueron IATF a las 72 h junto con una dosis de GnRH. La tasa de preñez se determinó por ultrasonografía a los 55 días post inseminación. El diseño experimental puede observarse en la Figura 2.5.



Referencias: BE (2 mg benzoato de estradiol), PGF_{2α} (500 μg cloprostenol), GnRH (100 μg acetato de gonadorelina), CPE (0.5 mg cipionato de estradiol), IATF (inseminación artificial a tiempo fijo), IA (inseminación artificial), pintura (pintura en la base de la cola como método visual indirecto en la detección de estro).

Figura 2.5. Diseño experimental de Experimento 4 en el que se combinó detección de estro e IATF en vaquillonas sincronizadas con tratamiento J-Synch o Convencional.

Ultrasonografías

Para la visualización de las estructuras ováricas y uterinas se utilizó un equipo WED-9618 V (Shenzen Well D, China) y un Mindary DP 30 (Mindray Building, Keji 12 Road South, Hi – tech Industrial Park, Nanshan, Shenzhen, China), ambos equipos provistos de un transductor lineal de 7,5 y 5 MHz, respectivamente y en modo B. Las vaquillonas fueron inmovilizadas en mangas y cepos en donde se les efectuó la ecografía transrectal para registrar todas las estructuras ováricas y diagnósticos de gestación.

En el Experimento 1, las vaquillonas de ambos grupos fueron examinadas cada 12 h desde la remoción del DIB hasta la ovulación (dinámica folicular) siguiendo al folículo dominante (FD). La ovulación fue definida como el momento en que el FD dejó de observarse y esto fue confirmado con una siguiente ecografía 12 h más tarde. Luego de la ovulación los animales fueron monitoreados una vez por día para evaluar el desarrollo del cuerpo lúteo (CL) hasta 12 días pos ovulación. Todas las estructuras fueron medidas mediante el software del equipo (utilizando su calibre) y tanto en la medición del FD como en CL se registró: el diámetro vertical y el horizontal y se calculó un promedio (Kastelic et al., 1990). Para estimar el tamaño de tejido luteal se calculó el volumen de una esfera ($V=4.\pi.r^3/3$). Cuando el CL presentaba una cavidad, el volumen de la misma fue restado al volumen total del CL, teniendo así una aproximación al volumen de tejido luteal presente en el ovario (mm^3).

En los Experimentos 2, 3 y 4, los diagnósticos de gestación por ultrasonografía se realizaron entre los 30 y 90 días luego de la inseminación según se describe en cada experimento en particular.

Obtención de muestras de sangre y determinaciones hormonales

En el Experimento 1, para las determinaciones hormonales se tomaron muestras de 10 mL de sangre por punción yugular. Las muestras fueron conservadas a 4 °C durante 4 – 6 h, luego centrifugadas a 3000 RPM durante 20 minutos para separar el suero, el cual se congeló a -20 °C para su posterior análisis. Todas las muestras fueron tomadas en el mismo horario al amanecer de cada día de acuerdo al siguiente diseño: se obtuvieron a partir del retiro de los dispositivos intravaginales (Día 6 y Día 7 para los tratamientos J-Synch y Convencional, respectivamente) hasta el Día 12 luego de la ovulación. Las concentraciones séricas de estradiol-17 β y progesterona fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA; Sirois y Fortune, 1990; Meikle et al., 2001) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Tanto las concentraciones séricas de progesterona como las de estradiol- 17 β , fueron determinadas por duplicado mediante RIA en fase sólida y líquida respectivamente, utilizando Kits para progesterona (DIAsource ImmunoAssays SA Rue du Bosquet, 21348 Louvain-la-Neuve - Belgium) y estrógenos (MP Biomedicals, LLC, 3 Hutton Center Drive, Suite 100, Santa Ana, CA, USA). La concentración mínima detectable para estradiol-17 β fue 88 pg/mL y el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo para los controles bajo (7,45%) y alto (14,60%). El CV inter-ensayo para los mismos controles fue bajo (8,80%) y alto (14,40%) respectivamente. La concentración mínima detectable para progesterona fue 0,27 ng/mL y el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo para los controles bajo (9,18%) y alto (17,82%). El CV inter-ensayo para los mismos controles fue bajo (10,0%) y alto (24,2%) respectivamente.

Análisis estadístico

Para todos estos análisis se utilizó el software Infostat 2.0 ® (Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, 2013). En el Experimento 1 las variables continuas puntuales fueron

analizadas por ANOVA. Para el análisis del patrón de crecimiento del FD y las concentraciones séricas de estradiol y progesterona en el tiempo se utilizaron Modelos Lineales Generales y Mixtos. Para el análisis del FD se consideró como Día 0 el día de la remoción de DIB y se tomaron las mediciones realizadas hasta el momento de la ovulación. Para el análisis de la concentración sérica de estradiol, se consideró como Día 0 el día de la ovulación. Para el análisis del volumen de CL y concentración sérica de progesterona se consideró como Día 0 al día de la ovulación y se tomaron las mediciones realizadas hasta el Día 12. El modelo incluyó los factores tratamiento, día y su interacción. Se utilizó como variable aleatoria el número de identificación de cada animal. Cuando se detectaron efectos significativos de tratamiento o su interacción se utilizó la diferencia media mínima (DMS) de Fisher ($\alpha=0,05$) para comparar las medias entre los grupos para cada día por el test de LSD. Los resultados son presentados como media \pm SEM y las diferencias se consideraron significativas cuando $P<0,05$ y tendencia cuando $P<0,1$.

En los Experimentos 2, 3 y 4, se ajustaron regresiones logísticas múltiples utilizando una aproximación de MLGM para variables binarias (preñada o vacía) y con enlace logit para evaluar qué factores y en qué medida afectaron la preñez.

RESULTADOS

Experimento 1

El porcentaje de animales ovulados no varió entre grupos y este fue del 87,5% (21/24) para el grupo J-Synch mientras que del 100% para el grupo Convencional (24/24;) ($P>0,1$; Tabla 3.1). Las vaquillonas pertenecientes al grupo J-Synch tuvieron un horario medio de ovulación que fue mayor ($P<0,0001$) al del grupo Convencional (Tabla 3.1; Figura 3.2). Esta diferencia fue de 28,7 horas entre tratamientos. El diámetro del folículo ovulatorio no varió entre grupos ($P>0,1$), sin embargo la tasa de crecimiento folicular tendió a ser mayor en las vaquillonas del grupo J-Synch ($P<0,1$; Tabla 3.1). La curva de crecimiento folicular puede observarse en la Figura 3.1. Los diámetros foliculares fueron mayores ($P<0,05$) en las vaquillonas del grupo Convencional a las 12, 24, 36, 48 y 60 h desde la remoción de los DIB, excepto a las 72 h en donde no hubo diferencias ($P>0,1$) entre tratamientos. Todos los animales que habían sido monitoreados durante el crecimiento del FD hasta la ovulación, presentaron CL subsiguiente, al cual se lo continuó monitoreado diariamente. En el desarrollo luteal hubo diferencias entre tratamientos ($P=0,04$), y un efecto día ($P<0,0001$), sin embargo no hubo interacción tratamiento x día ($P=0,8$). En el volumen de los CL al Día 7 de desarrollo existió una tendencia entre tratamientos ($P<0,1$), siendo $456,2\pm 17,5 \text{ mm}^3$ y $410,7\pm 18,1 \text{ mm}^3$ para los animales tratados con J-Synch y Convencional respectivamente (Figura 3.3). La media de volumen luteal calculada durante los Días 4 a 12 fue mayor ($P=0,04$) en el grupo J-Synch ($398,7\pm 10,0 \text{ mm}^3$) en comparación al grupo Convencional ($357,3\pm 10,0 \text{ mm}^3$; Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vaquillonas cíclicas sometidas al protocolo J-Synch o al tratamiento Convencional en el Experimento 1.

Variable	Tratamiento	
	J-SYNCH	CONVENCIONAL
Nº de Vaquillonas	24	24
Diámetro FD al retiro del DIB (mm)	8,3 \pm 1,2 ^a	10,0 \pm 2,4 ^b
Diámetro FD a la ovulación (mm)	13,0 \pm 1,04 ^a	12,8 \pm 0,95 ^a
Hembras ovuladas	21/24 (87,5%)	24/24 (100%) ^a
Intervalo retiro DIB a la ovulación (h)	93,7 \pm 12,94 ^a	65,0 \pm 13,67 ^b
Tasa de crecimiento FD (mm/día)*	1,3 \pm 0,4 ^c	1,0 \pm 0,4 ^d
Diámetro FD al momento del inductor de ovulación (mm)**	12,3 \pm 1,3 ^a	10,0 \pm 2,4 ^b
Volumen de CL (mm³)***	398,7 \pm 10,0 ^a	357,3 \pm 10,0 ^b
Concentración sérica de P4 (ng/mL)****	4,7 \pm 0,2 ^a	3,9 \pm 0,1 ^b

Letras diferentes indican diferencias significativas (^a^b P<0,05) (^c^d P<0,1)

* Desde la remoción del DIB hasta la ovulación.

** Días 9 y 7 para los grupos J-Synch y Convencional respectivamente.

*** Desde el Día 4 hasta el Día 12 pos ovulación.

**** Desde la ovulación hasta el Día 12.

Concentraciones séricas hormonales

Las vaquillonas del grupo Convencional recibieron 0,5 mg de CPE en el momento de la remoción del DIB, sin embargo, la concentración sérica de estrógenos observada desde la remoción de los DIB hasta las 72 h no difirió entre tratamientos (P>0,1; Figura 3.4).

La concentración sérica de progesterona fue evaluada desde la ovulación (Día 0) hasta el Día 12 de la fase luteal y se observa en la Figura 3.5. El tejido luteal de las vaquillonas del grupo J-Synch produjo mayores concentraciones séricas de progesterona ($P=0,03$; Figura 3.5) durante los días de estudio (Tabla 3.1).

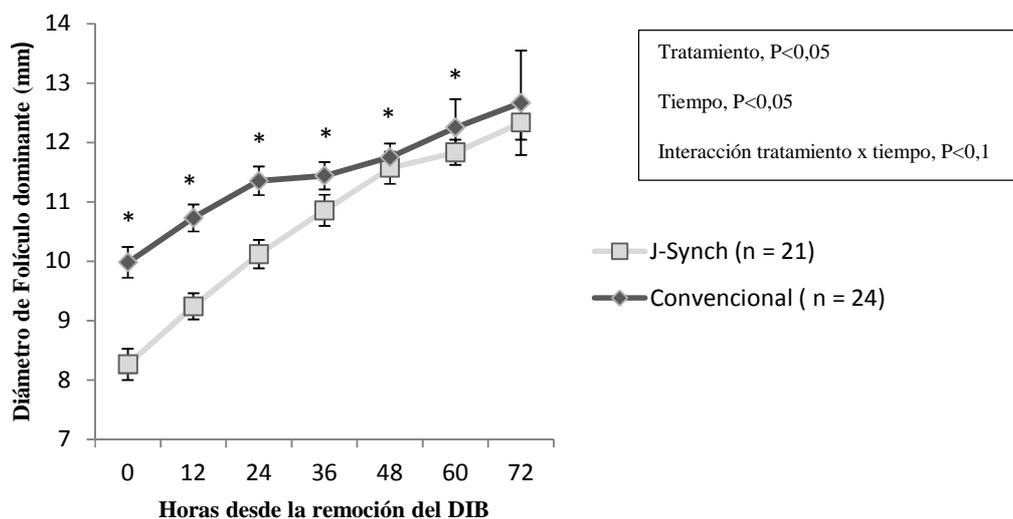


Figura 3.1. Crecimiento folicular desde la remoción del DIB hasta 72 h en el Experimento 1. Las vaquillonas del grupo Convencional recibieron 0,5 mg CPE al retiro del DIB, mientras que las del grupo J-Synch recibieron GnRH a las 72 h pos remoción del DIB. Los asteriscos indican las horas en las cuales hubo diferencias ($P < 0,05$) entre tratamientos.

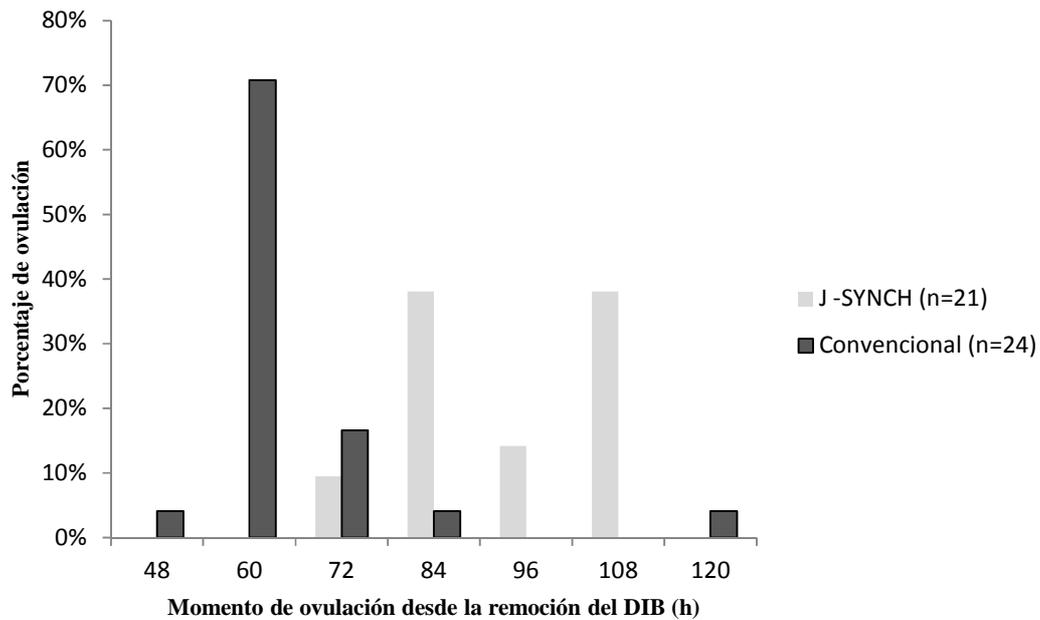


Figura 3.2. Distribución de las ovulaciones luego de la sincronización con el tratamiento J-Synch o Convencional en el Experimento 1. Las vaquillonas del grupo J-Synch (n=21) recibieron BE y un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB) en el Día 0, en el Día 6 se removieron los DIB y se aplicó PGF2 α y en el Día 9 se aplicó GnRH. Las vaquillonas del grupo Convencional (n=24) el Día 0 recibieron BE y DIB, en el Día 7 se removieron los DIB junto a una dosis de PGF2 α y CPE.

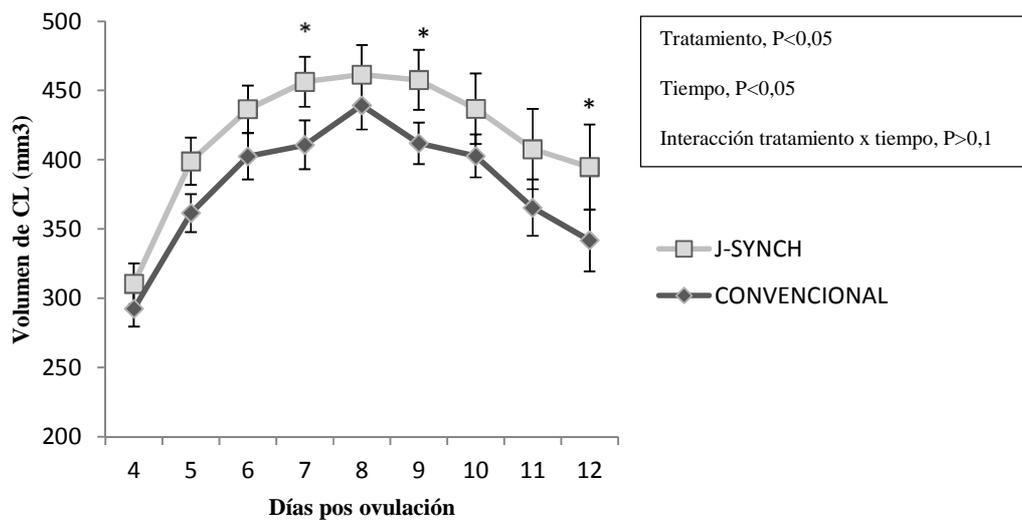


Figura 3.3. Desarrollo luteal desde el Día 4 a 12 pos ovulación en vaquillonas de los grupos J-Synch (n=21) y Convencional (n=24) en el Experimento 1. Los asteriscos indican los días en que los tratamientos tendieron ($P < 0,1$) a ser diferentes.

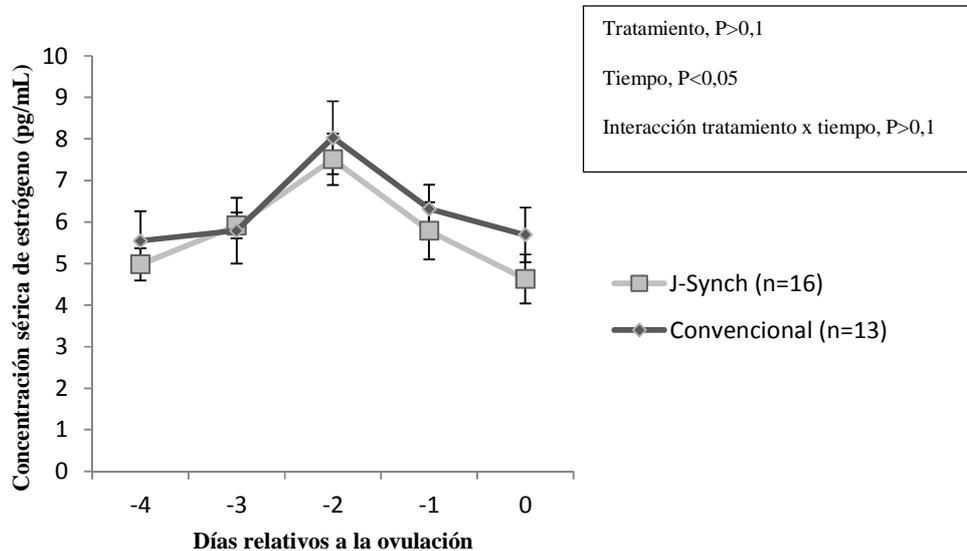


Figura 3.4. Concentración sérica de estradiol de las vaquillonas en el Experimento 1. Las vaquillonas del grupo Convencional recibieron 0,5 mg CPE al retiro del DIB, mientras que las del grupo J-Synch recibieron GnRH a las 72 h pos remoción del DIB (Día 0=Ovulación).

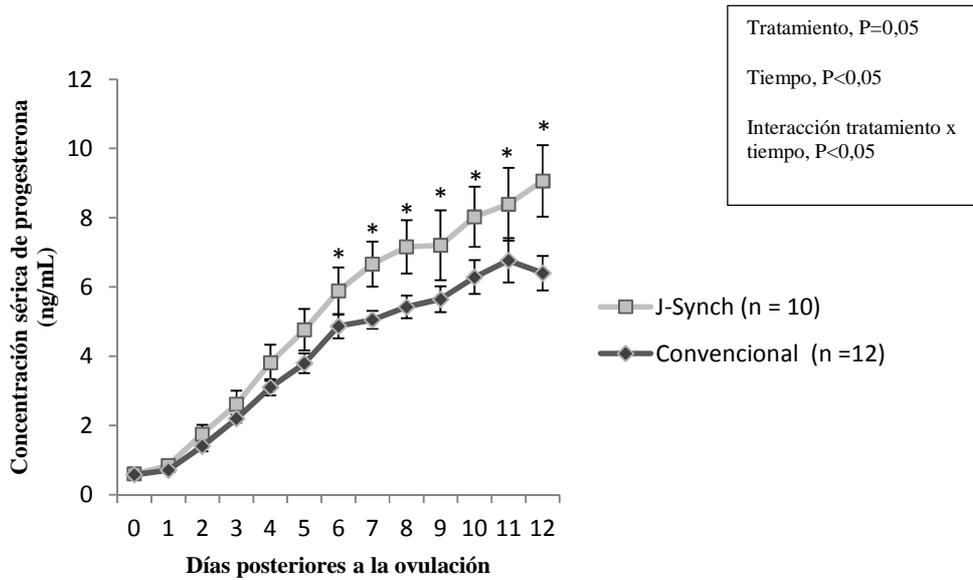


Figura 3.5. Concentración de progesterona en vaquillonas sometidas a los tratamientos J-Synch y Convencional en el Experimento 1. Los asteriscos indican los días en los cuales se detectaron diferencias ($P<0,05$) entre tratamientos.

Experimento 2

Durante los meses invernales en los que se llevaron a cabo estas réplicas, se registraron bajas precipitaciones, lo cual afectó fuertemente la calidad forrajera y por ende la nutrición general de las vaquillonas. Esto se vio reflejado en una baja de aproximadamente en promedio de un punto de CC (de $5,3\pm 0,6$ a $4,3\pm 0,5$) desde el inicio de los tratamientos hasta el diagnóstico de gestación en el Experimento 2 y bajos porcentajes de preñez. Las tasas de preñez en las réplicas 1, 2, 3 y 4 se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Tasa de preñez de Experimento 2 por réplica y por grupo de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo.

Exp 2.*	J-Synch	Convencional	P
Réplica 1	45% (27/60)	56,6% (34/60)	0,2
Réplica 2	19,4% (7/36)	44,4% (16/36)	0,02
Réplica 3	31,1% (9/29)	41,1% (14/34)	0,4
Réplica 4	40,6% (61/150)	49,3% (74/150)	0,1
TOTAL	37,8% (104/275)	49,3% (138/280)	0,008

* En el Experimento 2, las vaquillonas del tratamiento convencional recibieron 0,5 mg de CPE al momento del retiro del DIB (Día 7) y fueron inseminadas a partir de las 52 h. En el tratamiento J-Synch, el DIB fue removido en el Día 6 y las vaquillonas recibieron GnRH a las 72 h y fueron IATF.

Al contabilizar todos los resultados de preñez por tratamiento de las cuatro réplicas, la tasa de preñez total fue mayor para las vaquillonas del grupo Convencional en comparación con las del grupo J-Synch ($P=0,008$), como así también hubo diferencias significativas entre réplicas ($P=0,03$), pero no hubo interacción réplica x tratamiento ($P=0,5$). Sólo hubo una diferencia significativa entre tratamientos en la réplica 2 ($P=0,02$), en el resto de las réplicas no hubo diferencias entre tratamientos ($P>0,1$). Considerando todas las réplicas de este experimento, los animales que manifestaron estro antes de la IATF tuvieron tasas de preñez mayores ($P<0,001$) para ambos tratamientos, que en las vaquillonas que no lo hicieron [51% (179/352) vs. 32% (65/203), respectivamente]. No hubo diferencias significativas entre los toros utilizados para la IATF en ninguna réplica, mientras que sólo se registró un efecto inseminador en la réplica 4, en donde el inseminador “A” logró tasas de preñez significativamente mayores (58,1% , 43/74 y 44,7%, 34/76 para grupos Convencional y J-Synch, respectivamente) que el inseminador “B” (40,1%, 31/78 y 32,4%, 24/74) para grupos los Convencional y J-Synch, respectivamente ($P=0,04$). No obstante no hubo interacción inseminador por tratamiento ($P>0,1$).

Experimento 3

En el Experimento 3, si bien la tasa de preñez fue 59,7% para el grupo J-Synch y 53,1% para las vaquillonas del grupo Convencional, las diferencias no fueron significativas ($P>0,1$; Tabla 3.3). En la réplica 1, hubo una tendencia a favor de las vaquillonas del grupo J-Synch en la tasa de preñez ($P=0,09$; Tabla 3.3). En el resto de las réplicas no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P>0,1$), registrándose una diferencia numérica en las réplicas 3 y 4 a favor del grupo J-Synch. No hubo diferencias significativas entre las otras variables analizadas (inseminador y toro) en ninguna de las réplicas ($P>0,05$). Sin embargo, hubo diferencias significativas entre réplicas ($P=0,0005$), pero no hubo interacción réplica x tratamiento ($P=0,5$). Considerando todas las réplicas de este experimento, las vaquillonas que manifestaron estro antes de la IATF tuvieron tasas de preñez mayores ($P<0,001$) para ambos tratamientos, que en las vaquillonas que no lo hicieron [62% (252/407) vs 42% (69/166), respectivamente].

Tabla 3.3. Tasa de preñez del Experimento 3 en vaquillonas de carne inseminadas a tiempo fijo con tratamientos J-Synch o Convencional.

Exp 3.*	J-Synch	Convencional	P
Réplica 1	50,7% (33/65)	35,3% (23/65)	0,09
Réplica 2	60% (30/50)	66% (33/50)	0,5
Réplica 3	58,5% (24/41)	51,1% (22/43)	0,4
Réplica 4	64,2% (88/137)	57,6% (76/132)	0,2
TOTAL	59,7% (175/293)	53,1% (154/290)	0,12

* En el Experimento 3, las vaquillonas del tratamiento convencional recibieron 0,5 mg de CPE al momento del retiro del DIB (Día 7) y fueron inseminadas a partir de las 52 h. En el tratamiento J-Synch, el DIB fue removido en el Día 6 y las vaquillonas recibieron GnRH a las 72 h y fueron IATF.

Experimento 4

La tasa de detección de estro y la tasa de preñez a la IATF no difirió entre grupos ($P>0,1$; Tabla 3.4). Sin embargo, la tasa de preñez al estro observado tendió a ser mayor ($P<0,1$) y la tasa de preñez acumulada fue significativamente mayor ($P<0,05$) en las vaquillonas del grupo J-Synch (80% y 67,9% respectivamente) que en el grupo Convencional (50% y 46,6% respectivamente; Tabla 3.4). Además las vaquillonas dentro del grupo J-Synch que presentaron pintura “borrada” a las 48 h pos remoción del DIB y fueron inseminadas 12 h más tarde (60 h), tuvieron tasa de preñez mayor ($P<0,05$) que aquellas dentro del mismo grupo que fueron IATF.

Tabla 3.4. Tasa de detección de celo, tasa de concepción, tasa de preñez a la IATF y tasa de preñez acumulada en dos protocolos J-Synch o Convencional en vaquillonas de carne.

Exp 4.*	J-Synch	Convencional	P
Tasa de estro	38,8% (40/103)	28,5% (30/105)	$>0,1$
Tasa de concepción	80,0% (32/40)	50,0% (15/30)	0,09
Tasa de preñez IATF	60,3 % (38/63)	45,3% (34/75)	$>0,1$
Tasa de preñez IA	67,9% (70/103)	46,6% (49/105)	0,006

* En el Experimento 4, todas las vaquillonas fueron pintadas en la base de la cola en día de la remoción del DIB. Las vaquillonas que tuvieron la pintura “borrada” a las 36 h (Convencional) o a las 48 h (J-Synch) luego de la remoción del DIB fueron IATF 12 h más tarde. Las vaquillonas que tuvieron pintura “intacta” fueron IATF a 52 h (Convencional) o a las 72 h (J-Synch) luego de retirados los DIB.

Se realizó un análisis de los resultados de los Experimento 3 y 4 en conjunto, ya que si bien en el Experimento 4 se inseminó un 33,6% de las vaquillonas a las 12 h del estro, las condiciones nutricionales y de manejo de las vaquillonas de ambos experimentos fueron similares. Sumando la totalidad de vaquillonas ($n=791$) inseminadas con el protocolo J-Synch ($n=396$) vs. las vaquillonas inseminadas con el protocolo Convencional

(n=395), observamos que la tasa de preñez total fue mayor ($P=0,006$) en el protocolo J-Synch (61,9%) vs. el Convencional (51,4%).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados en esta tesis, soportan parcialmente la hipótesis ya que el tratamiento J-Synch, que se caracteriza por la prolongación del proestro y la reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona aumentó las tasas de preñez en comparación con un tratamiento Convencional en vaquillonas *Bos taurus* para carne, cuando las condiciones de CC y nutrición fueron las adecuadas (Experimentos 3 y 4). Sin embargo, cuando las condiciones nutricionales no fueron favorables, no hubo efecto beneficioso de este tratamiento corto de IATF (Experimento 2).

En el Experimento 1, las vaquillonas del grupo J-Synch, tuvieron mayor duración de proestro en comparación al grupo Convencional, con una diferencia entre tratamientos de aproximadamente 28 h. Esto demuestra que el tratamiento J-Synch prolonga el proestro y concuerda con datos preliminares (de la Mata y Bó, 2012) en donde la duración del proestro en vaquillonas de carne fue de $97,1 \pm 17,4$ h así como en vaquillonas raza Holando-Argentino (Ré et al., 2014) que reportaron una duración de proestro de $103,8 \pm 3,3$ h. La prolongación del proestro genera mayores concentraciones séricas circulantes de estradiol producido por el FD, favoreciendo la madurez folicular y mejorando la fertilidad (Bridges et al., 2008; 2010; 2012b; 2014). Esto, a su vez se relaciona a una mejor calidad y supervivencia embrionaria (Larimore et al., 2015; Madsen et al., 2015) y a una mayor concentración sérica de progesterona producida por el CL subsiguiente (Bridges et al., 2010; Perry et al., 2005; 2007; Pitaluga et al., 2013). Las concentraciones séricas de estradiol preovulatorio no variaron en este experimento entre tratamientos ($P > 0,1$). Sin embargo, debe recordarse que las vaquillonas del grupo Convencional recibieron una dosis

de 0,5 mg CPE en el día de la remoción del DIB, y que los kits de RIA detectan y miden estradiol-17 β en suero o plasma, sin poder diferenciar entre los de origen endógeno (producidos en un 99,9% por el FD) y los producidos por el clivaje en sangre de CPE a estradiol-17 β . Por lo tanto, se puede pensar que las vaquillonas del grupo J-Synch tuvieron mayores concentraciones séricas de estradiol si no se hubiera inyectado CPE en las del tratamiento Convencional. En el futuro deberán ser investigadas las concentraciones de estradiol dentro del FD ovulatorio (intrafolicular) en lugar de las concentraciones séricas para comprobar estas diferencias sin la interferencia de estradiol exógeno.

Con respecto a las concentraciones de progesterona estas fueron mayores en las vaquillonas pertenecientes al grupo J-Synch y pueden relacionarse a la mayor duración de proestro registrada en este grupo. Además el volumen del CL fue numéricamente mayor en las vaquillonas del grupo J-Synch, alcanzando una tendencia estadística en los Días 7, 9 y 12 de la fase luteal. Varios trabajos demuestran que a mayor tamaño de CL se incrementa la producción de progesterona (Vasconcelos et al., 2001; Busch et al., 2008) hasta alcanzar su madurez alrededor del Día 8 del ciclo estral, en donde su tamaño no influye en las concentraciones circulantes de progesterona (Mann, 2009). Otros autores demuestran que una mayor concentración de progesterona circulante afecta la fertilidad y que muchas pérdidas embrionarias pueden ser atribuidas a niveles de progesterona inadecuados (Spencer et al., 2007; Diskin et al., 2016; Lonergan et al., 2016). Los efectos de la progesterona sobre el endometrio y en consecuencia sobre el embrión determinan el mantenimiento de la preñez debido a cambios significativos en el transcriptoma endometrial tanto en el ciclo estral como en la preñez temprana (Forde et al., 2009; Forde et al., 2011b). La progesterona elevada acelera los cambios temporales normales que ocurren en el transcriptoma endometrial (Forde et al., 2009) y en el momento de la disminución de los receptores de progesterona en el epitelio luminal (Okumu et al., 2010). En consecuencia, se acelera la elongación del *conceptus* (Carter et al., 2008) que está asociado con una mayor sobrevivencia embrionaria. La reducción de los niveles circulantes de progesterona resulta en una modificación en el transcriptoma endometrial y un retraso en el desarrollo embrionario (Forde et al., 2012; Forde y Lonergan, 2012). Además varios

autores encontraron una correlación entre la concentración plasmática de progesterona materna con la producción de IFN τ por el *conceptus* (Kerbler et al., 1997; Mann et al., 2006). Estas mejoras en las concentraciones de progesterona registradas en el grupo J-Synch sugieren una mejora en el medioambiente endometrial, acelerando cambios en la expresión génica y la elongación del *conceptus* con una consecuente mejor supervivencia embrionaria. En el futuro se deberá investigar en profundidad el medioambiente uterino, evaluando expresión génica de receptores y proteínas receptoras de hormonas, relacionadas al desarrollo embrionario.

Los diámetros entre folículos dominantes fueron mayores en las vaquillonas del grupo Convencional durante casi todos los días de la dinámica folicular evaluada por ultrasonografía, excepto a las 72 h pos retiro del DIB. Sin embargo no variaron ($P > 0,1$) los diámetros foliculares ovulatorios entre tratamientos, siendo $13,0 \pm 1,0$ mm en el grupo J-Synch y $12,8 \pm 1,0$ mm en el grupo Convencional. Más aún, la tasa de crecimiento folicular tendió a ser mayor ($P < 0,1$) en el grupo J-Synch. Si relacionamos estos datos con las concentraciones séricas de estradiol, se puede sugerir que los folículos dominantes ovulatorios de las vaquillonas del grupo J-Synch podrían haber producido mayor estradiol, sin diferir los diámetros foliculares ovulatorios entre tratamientos. Estos datos concuerdan con lo reportado por Bridges et al. (2010), en el cual se informó que a diámetros foliculares constantes, los animales que reciben tratamientos de proestro prolongado (entre 2 a 4,7 días) logran mejores tasas de concepción que los animales con tratamientos de proestro corto (< 2 días). Pitalugo et al. (2013), encontraron mayor proporción de vacas en estro, una mejor respuesta ovulatoria y una tendencia a mejorar el diámetro de CL durante la fase luteal temprana en vacas en las cuales se manipuló el período de proestro con gonadotrofinas (eCG) y estradiol (CPE). Esto respalda aún más la posibilidad que los folículos dominantes de los animales del grupo J-Synch produzcan mayores niveles de estradiol que los animales del grupo Convencional.

Con respecto a los resultados de preñez de los Experimentos 2, 3 y 4 tomados en su conjunto parecen contradictorios. En el Experimento 2, al inicio las vaquillonas se encontraban ciclando y con buena CC. Sin embargo, debido a condiciones climáticas adversas (bajas precipitaciones y sequía) durante el transcurso del experimento, se registró un impacto negativo en la nutrición de los animales luego de haber sido inseminados con baja cantidad y calidad forrajera, y probablemente esto generó un grado de anestro debido al estrés nutricional y déficit de plano de aumento de peso. En ninguna de estas réplicas las tasas de preñez superaron el 50%. Además, la tasa de preñez fue mayor en el grupo Convencional que en el grupo J-Synch. Las probables fallas en el grupo J-Synch pueden atribuirse a una baja pulsatilidad de LH (Yavas y Watson, 2000), con bajas concentraciones de estradiol sérico y como consecuencia un menor diámetro folicular, que al haber sido inducido a ovular, no alcanzó el diámetro mínimo de ovulación (Sartori et al., 2001) o la ovulación fue tardía. Existe evidencia que la inducción de la ovulación con GnRH de folículos de pequeño tamaño reducen la fertilidad debido a i) inmadurez folicular, ii) a una menor producción de estradiol folicular y iii) una consecuente menor producción de progesterona por parte del CL subsecuente o baja tasa ovulatoria (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005; Mussard et al., 2007; Mann, 2009). La tasa de preñez del grupo Convencional en el Experimento 2, fue aceptable (49,3%), y esto se puede relacionar a la administración exógena de CPE en el día de la remoción del DIB (Día 7), que pudo haber suplementado las bajas producciones de estradiol endógeno en este grupo. Esto puede explicar en parte la disminución en la tasa de preñez en el grupo J-Synch en este experimento que no recibió CPE. Jinks et al. (2012), informaron una mejora de la fertilidad en vacas inducidas a ovular folículos pequeños con la administración de 0,5 mg de CPE, 24 h antes de la IA, mejorando significativamente la preñez. Además, Souza et al. (2008), encontraron una mayor tasa de preñez cuando se administró estradiol-17 β 12 h antes de la administración de GnRH en vacas lecheras con baja condición corporal. El efecto de la baja pulsatilidad de LH y/o la baja tasa de crecimiento folicular, podrían haber sido compensado en este experimento con el uso de eCG en el día de la remoción del DIB, como lo demostró Núñez-Olivera et al. (2014), en vacas en anestro posparto. En este trabajo la eCG incrementó la tasa de crecimiento folicular, el área de CL y la concentración sérica de

progesterona luego de la aplicación de 400 UI eCG en la remoción del dispositivo intravaginal. Sá Filho et al. (2010), reportaron datos similares en vaquillonas *Bos indicus* con una mejora en la tasa de preñez. De acuerdo con esta noción, datos publicados de experimentos realizados recientemente en Uruguay (Bó et al., 2016 en prensa), sobre un total de 2349 vaquillonas *Bos taurus* que recibieron 300 UI de eCG en el momento de la remoción del dispositivo con progesterona, se encontró una tasa de preñez significativamente mayor ($P=0,01$) a favor del tratamiento J-Synch (56,1%, 631/1125) en comparación con el tratamiento Convencional (50,7%, 620/1224). Lo importante para destacar es que en este último trabajo al recibir todas las vaquillonas eCG en el momento de la remoción del dispositivo, el probable efecto negativo de no tener suficientes niveles de estradiol circulantes en las vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch, que no recibieron CPE haya sido superado por el efecto estimulante de la esteroidogénesis que produce la eCG al unirse sobre los receptores de FSH y LH de los folículos dominantes (Murphy y Martinuk, 1991).

En el Experimento 3, si bien las tasas de preñez no difirieron, se observó una diferencia numérica a favor de tratamiento J-Synch con respecto al Convencional (59,7% vs. 53,1%, respectivamente). En este caso se puede pensar que la cantidad de animales por grupo en este experimento careció de potencia estadística. Sin embargo los datos publicados ya mencionados anteriormente (Bó et al., 2016 en prensa) encontraron diferencias a favor del tratamiento J-Synch, lo mismo que en el Experimento 4. Observaciones de campo (de la Mata, com. pers.) sobre 1576 vaquillonas Angus y Hereford inseminadas en rodeos comerciales con el protocolo J-Synch, muestran una tasa de preñez promedio de 60% (rango entre 35 a 76,6%). Estos datos son comparables a los informados por Day y Bridges (2015), en los que sobre un total de 7352 vacas posparto para carne inseminadas con protocolo Co-Synch + CIDR de 5 días, promedió una tasa de preñez de 63%. Perry et al. (2012), reportaron una tasa de preñez de por encima del 60% con el uso de Co-Synch + CIDR de 5 días en vaquillonas cíclicas de razas para carne. En un trabajo publicado por Bridges et al. (2008), se informó una tasa de preñez 10,5 puntos porcentuales mayor con un tratamiento Co-Synch + CIDR de 5 días, que promovía la

prolongación del proestro, en vacas posparto de carne en comparación a un tratamiento Co-Synch + CIDR de 7 días con proestro de menor duración. Santos et al. (2010), encontró datos similares en vacas Holstein (39,3% Co-Synch 5 días vs. 33,9% Co-synch 7 días; $P < 0,05$). Durante más de 15 años, el tratamiento más comúnmente utilizado en Sudamérica ha sido el Convencional con BE y progesterona por 7 días, con o sin la adición de 300 o 400 UI de eCG al retiro del dispositivo (Bó et al., 2013). En estos, las tasas de preñez alcanzadas en rodeos para carne rondan el 50% (Baruselli et al., 2001; 2004; 2013; Bó et al., 2001, 2002, 2014; Cutaia et al., 2003; Sá Filho et al., 2009). El tratamiento J-Synch demostró ser eficiente y lograr tasas de preñez aceptables en vaquillonas para carne y en el Experimento 3, las tasas de preñez superaron el 55% en la mayoría de las réplicas. Esto demuestra que la prolongación del proestro en el J-Synch resulta en un efecto positivo y logra mayores tasas de preñez que el tratamiento Convencional en vaquillonas *Bos taurus* para carne. Esto coincide con varios autores que afirman que la prolongación del proestro mejora las tasas de preñez (Bridges et al., 2008) debido principalmente a la madurez folicular, a la mayor concentración sérica de estradiol preovulatorio (Bridges et al., 2010; 2014) y a la mayor progesterona liberada en plasma por el CL subsecuente (Bridges et al., 2010; Perry et al., 2005). Además se relaciona a un mejor desarrollo del medioambiente uterino con mayores concentraciones de receptores nucleares de progesterona en el epitelio glandular del endometrio y mayor concentración de ARNm que codifique para receptores de estrógenos (ESR1) en el Día 15,5 pos ovulación, contribuyendo al mantenimiento de la preñez (Bridges et al., 2012b).

En el Experimento 4, se combinó la detección de estro e IATF con el objetivo de evaluar la tasa de preñez en animales que manifestaban estro antes de ser IATF. En un trabajo preliminar que se llevó a cabo (de la Mata et al., 2013b) con vaquillonas sincronizadas con J-Synch, alrededor del 60% de las vaquillonas manifestó estro previo a ser IATF a las 72 h, resultando la tasa de preñez mayor ($P < 0,05$) en las vaquillonas que manifestaron estro (76,3%) en comparación a las que no lo hicieron (42,3%). Algo similar se observó en los Experimentos 2 y 3, en que las vaquillonas que manifestaron estro antes de ser IATF lograron mayores tasas de preñez ($P < 0,05$) en comparación a las vaquillonas

que no demostraron estro en ambos tratamientos (aproximadamente 20 puntos porcentuales de diferencia). Por ello desarrollamos el Experimento 4, ya que existía una proporción de animales que manifestaban estro antes de las 48 h pos remoción del DIB y consideramos que lo mejor sería adelantar el momento de IA en esos animales. Si bien las tasas estro no variaron entre grupos ($P > 0,1$), la tasa de concepción en el Experimento 4, tendió a ser mayor ($P < 0,1$) en el grupo J-Synch en comparación al grupo Convencional (80,0% vs 50,0%, respectivamente). Dentro del grupo J-Synch, las vaquillonas que manifestaron estro y fueron IA a las 60 h tuvieron mayor tasa de preñez que las que se IATF a las 72 h ($P < 0,05$). Este resultado puede explicarse debido a que los animales que manifiestan estro antes de ser IATF resultan en mayores tasas de preñez debido a la mayor concentración sérica de estradiol preovulatorio, mayor diámetro folicular, mayor tasa ovulatoria y por tanto desarrollaron un CL con mayor capacidad secretoria de progesterona durante la fase lútea (Perry et al., 2005; 2007; Sá Filho et al., 2011). Esto además se relaciona con una mejor calidad y estadio embrionario y con un número mayor de espermatozoides accesorios en la fecundación (Larimore, et al., 2015). El momento de inseminación en las vaquillonas pudo haber jugado un rol importante en el Experimento 4, cuando los animales fueron IA a estro detectado. La ovulación en las vacas normalmente ocurre a las 24 y 32 h del inicio del estro (Trimberger, 1948; Walker et al., 1996). Luego de la ovulación el ovocito tiene un período corto para ser fecundado. La fertilidad óptima se obtiene 6 y 12 h posteriores a la ovulación (Brackett et al., 1980) y la viabilidad media de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra se estima entre 24 y 30 h (Trimberger, 1948). En los animales inseminados a estro detectado la mejora se puede deber además a un momento óptimo de inseminación en ambos grupos y en el J-Synch puede haber sido un factor extra vinculado con la mejora en la fertilidad. La tasa acumulada de preñez fue mayor en el grupo J-Synch, demostrando nuevamente el efecto positivo del proestro prolongado en este tratamiento.

Si consideramos los Experimentos 3 y 4, en los cuales las condiciones de nutrición y CC fueron similares, la preñez resulta significativamente mayor en las vaquillonas que recibieron tratamiento J-Synch en comparación a las que recibieron

tratamiento Convencional. Esto concuerda con los datos de Bó et al. (2016 en prensa), en los cuales la tasa de preñez fue significativamente superior ($P < 0,05$) en los animales tratados con J-Synch, superando en 5 puntos porcentuales al tratamiento Convencional en vaquillonas. También estos datos de preñez son comparables a los de Menchaca et al. (2015), que reportaron la utilización con éxito del protocolo J-Synch con la adición de 400 UI de eCG en la sincronización de vacas receptoras de embriones sexados producidos *in vitro* en un total de 954 vacas cruce Hereford que fueron tratadas con el tratamiento J-Synch + 400 UI de eCG ($n=464$) y con tratamiento Convencional + 400 UI de eCG ($n=481$). Los embriones fueron transferidos en fresco en el Día 16 o 17, resultando en una tasa de preñez mayor ($P < 0,05$) en el grupo J-Synch (49,3%, 229/464) que en el tratamiento convencional (40,9%, 197/481). En el futuro deberían realizarse nuevas investigaciones que comparen ambos tratamientos en vacas de razas para carne o en vacas lecheras, en estado de ciclicidad o en anestro con el agregado de eCG al retiro del dispositivo, para corroborar estos datos en otras categorías. Los datos obtenidos son promisorios y sugieren que el tratamiento J-Synch puede tener un efecto positivo sobre el medioambiente uterino de las receptoras para que los embriones implantados se desarrollen y resulten en mayores tasas de preñez que el tratamiento Convencional.

En resumen, las vaquillonas que recibieron el tratamiento J-Synch tuvieron mayor duración de proestro, tendieron a presentar una tasa de crecimiento folicular mayor y desarrollaron un CL de mayor volumen que produjo mayores concentraciones circulantes progesterona después de la ovulación. Además, las vaquillonas que recibieron el tratamiento J-Synch, tuvieron una mejor tasa de preñez cuando existió un plano de alimentación favorable, relacionándose a la prolongación del proestro. Sin embargo, en condiciones nutricionales desfavorables la prolongación del proestro con el tratamiento J-Synch tuvo un efecto negativo sobre la fertilidad.

CONCLUSIONES

La conclusión principal de esta tesis es que la implementación de un protocolo de IATF que se caracteriza por la prolongación del proestro y la reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona, denominado J-Synch, aumenta las tasas de preñez en comparación con un tratamiento Convencional en vaquillonas *Bos taurus* para carne cuando las condiciones nutricionales fueron las adecuadas. Cuando existió un déficit nutricional, con una baja de la CC, el efecto de prolongación de proestro tuvo un efecto negativo sobre la tasa de preñez.

Además se realizaron las siguientes conclusiones específicas:

El tratamiento J-Synch tuvo una duración del proestro de mayor duración que el tratamiento Convencional, y luego de la ovulación, el CL resultante tuvo una mayor capacidad secretora de progesterona que el tratamiento Convencional.

Las vaquillonas que ovularon con el tratamiento J-Synch tendieron a presentar una mayor tasa de crecimiento folicular con respecto al tratamiento Convencional, sugiriendo una mayor capacidad secretora de estradiol-17 β en el tratamiento J-Synch, sin variar los diámetros foliculares ovulatorios entre tratamientos.

Las vaquillonas que ovularon con el tratamiento J-Synch produjeron una mayor concentración sérica de progesterona durante la fase luteal subsiguiente.

La combinación de detección de estro e IATF, bajo condiciones nutricionales adecuadas, en el tratamiento J-Synch, podría mejorar los resultados de preñez aún más.

Las vaquillonas que manifestaron estro antes de ser IATF resultaron en mayores tasas de preñez tanto en las tratadas con tratamiento J-Synch como con tratamiento Convencional.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72-80.
- Atkins J.A., Smith M.F., MacNeil M.D., Jinks E.M., Abreu F.M., Alexander L.J. and Geary T.W. 2013. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *Journal of Animal Science* 91: 722-733.
- Baruselli P.S., Madureira E.H., Marques M.O. 2001. Programas de IA a tiempo fijo en *Bos indicus*. Resúmenes Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba; 95-116.
- Baruselli P.S., Reis E.L., Marques M.O., Nasser L.F. and Bó G.A. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science* 82-83: 479-486.
- Baruselli P.S., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Gimenes L.U., Sá Filho M.F., Martins C.M., Rodrigues C.A., Bó G.A. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76: 1583-1593.
- Barth A.D. 1995. Evaluation of frozen Semen by the Veterinary Practitioner. Proc. of Bovine Short Course. Society for Theriogenology, 105-110.
- Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Randall G.C., Mitchell D. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10 -16 days after oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility* 59: 205-216.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Tribulo H.E., Caccia M., Mapletoft R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol – 17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41: 1555-1569.
- Bó G.A., Adams G.P., Caccia M., Martínez M., Pierson R.A., and Mapletoft R.J. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 39: 193-204.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A. and Mapletoft R.J. 1995b. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43: 31-40.
- Bó G.A., Cutaia L., Brogliatti G.M., Medina M., Tríbulo R., Tríbulo H. 2001. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en ganado bovino utilizando progestágenos y

- estradiol. Resúmenes Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba; 117-136.
- Bó G.A., Cutaia L. y Tríbulo R. 2002. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda parte. *Taurus* 15: 17-32.
- Bó, G.; Cutaia, L.; Chesta, P.; Balla, E.; Pincinato, E.; Peres, L.; Maraña, D.; Avilés, M.; Menchaca, A.; Veneranda, G.; Baruselli, P. 2005. Implementación de Programas de Inseminación Artificial en Rodeos de Cría de Argentina. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. Tomo I, pp. 97-128
- Bó G.A., Peres L.C., Cutaia L.E., Pincinato D., Baruselli P.S. and Mapletoft R.J. 2012. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 272-277.
- Bó G.A., Baruselli P.S. and Mapletoft R.J. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Animal Reproduction* 10: 137-142.
- Bó G.A., de la Mata J.J., Ré M., Huguenine E. y Menchaca A. 2014. Inseminación Artificial a Tiempo Fijo utilizando tratamientos que acortan el período de inserción del dispositivo con progesterona y alargan el proestro. Memorias de las 7º Jornadas Taurus de Reproducción Bovina p 95-100.
- Bó G.A., de la Mata J.J., Baruselli P.S. and Menchaca A. 2016. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. 18th International Congress of Animal Reproduction, Tours, France. *Theriogenology* (en prensa) DOI: [10.1016/j.theriogenology.2016.04.053](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.053)
- Brackett B.G., Oh Y.K., Evans J.F. and Donawick W.J. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biology of Reproduction* 23: 189-205.
- Bridges G.A., Helser L.A., Grum D.E., Mussard M.L., Gasser C.L., and Day M.L. 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843-851.
- Bridges G.A., Mussard M.L., Burke C.R., and Day M.L. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science* 117: 208-215.
- Bridges G.A., Ahola J.K., Brauner C., Cruppe L.H., Currin J.C., Day M.L., Gunn P.J., Jaeger J.R., Lake S.L., Lamb G.C., Marquezini G.H.L., Peel R.K., Radunz A.E., Stevenson J.S. and Whittier W.D. 2012a. Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F2 α in the five-day CO-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *Journal of Animal Science* 90: 4814-4822.

- Bridges G.A., Mussard M.L., Pate J.L., Ott T.L., Hansen T.R. and Day M.L. 2012b. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Animal Reproduction Science* 133: 16-26.
- Bridges G.A., Day M.L., Geary T.W., and Cruppe L.H. 2013. Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *Journal of Animal Science* 91: 3002-3013.
- Bridges G.A., Mussard M.L., Hesler L.A. and Day M.L. 2014. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology* 81: 632-638.
- Busch D.C., Atkins J.A., Bader J.F., Schafer D.J., Patterson D.J., Geary T.W. and Smith M.F. 2008. Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows. *Journal of Animal Science* 86: 553-563.
- Caccia M. and Bó G.A. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 49: 341.
- Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Kenny D.A., Roche J.F. and Lonergan P. Effect of increasing progesterone from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 20: 368-375.
- Cerri R.L.A., Rutigliano H.M., Chebel R.C., and Santos J.P. 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 137: 813-823.
- Colazo M.G., Kastelic J.P. and Mapletoft R.J. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855-865.
- Colazo M.G., Mapletoft R.J., Martínez M.F. and Kastelic J.P. 2009. Selección de los tratamientos hormonales disponibles en el mercado para la sincronización de celos en vaquillonas de carne. Resúmenes en CD del VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba.
- Colazo M.G. and Ambrose D.J. 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.
- Cooke, R. F., Arthington J. D., Araujo D. B., and Lamb G. C. 2009a. Effects of acclimation to human interaction on performance, temperament, physiological responses, and pregnancy rates of Brahman-crossbred cows. *J. Anim. Sci.* 87:4125-4132.
- Cooke, R. F., Arthington J. D., Austin B. R., and Yelich J. V.. 2009b. Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* 87:3403-3412.

- Cooke, R. F., Mueller C., DelCurto T., and Bohnert D. W. 2010a. Effects of temperament on reproductive and physiological responses of beef cows. BEEF046 In: 2010 Oregon Beef Council Report, pp 10-13.
- Cooke, R. F., and Bohnert D. W. 2010b. Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of replacement beef heifers. BEEF045 In: 2010 Oregon Beef Council Report, pp 6-9.
- Cooke, R. F., Bohnert D. W., Meneghetti M., Losi T. C., and Vasconcelos J. L. M. 2011. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed-timed AI in *Bos indicus* beef cows. Livest. Sci. LIVSCI-D-11-414R1.
- Cruppe L.H., Day M.L., Abreu F.M., Kruse S., Lake S.L., Biehl M.V., Cipriano R.S., Mussard M.L. and Bridges G.A. 2014. The requirement of GnRH at the beginning of the five-day CO-Synch + controlled internal drug release protocol in beef heifers. *Journal of Animal Science* 92: 4198-4203.
- Cutaia L., Veneranda, G., Tríbulo, R., Baruselli, P.S., Bó, G.A. 2003. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo: Análisis de factores que afectan los resultados. Resúmenes de V Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba, Argentina. pp. 119 - 132.
- Day M.L., Mussard M.L., Bridges G.A. and Burke C.R. 2010. Controlling the dominant follicle in beef cattle to improve estrous synchronization and early embryonic development. *Proceedings of the Eighth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants – Society of Reproduction and Fertility, Anchorage, Alaska.* Volume 67 pp405-419.
- Day M.L. and Bridges G.A. 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.
- Dalton J.C. 2013. Características del semen de relevancia para la inseminación artificial a tiempo fijo. Resúmenes del X Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba, pp 183-198.
- de la Mata J.J. and G.A. Bó. 2012. Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos de benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Taurus* 55:17-23.
- de la Mata J.J. C.A. de la Mata and G.A. Bó. 2013a. Características foliculares y luteales y tasa de preñez en receptoras de embriones sincronizadas con un protocolo J-Synch 6 d. 10° Simposio Internacional de Reproducción Animal, Pabellón Argentino, Córdoba, Argentina. Resúmenes pp.378 (abstract).
- de la Mata J.J. C.A. de la Mata and G.A. Bó. 2013b. Evaluación del grado de despintado en la base de la cola sobre la tasa de preñez en vaquillonas Angus sincronizadas con un

- protocolo de IATF. 10º Simposio Internacional de Reproducción Animal, Pabellón Argentino, Córdoba, Argentina. Resúmenes pp.308 (abstract).
- de la Mata J.J., Menchaca A. y Bó G.A. 2015. Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en vaquillonas para carne. Resúmenes del XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Pabellón Argentina, Córdoba. Resúmenes pp 143-157.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Diskin M.G. and Sreenan J.M. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility* 59: 463-468.
- Diskin M.G., Walters S.M., Parr M.H. and Kenny D.A. 2016. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 83-93.
- Forde N., Carter F., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Spencer T.E., Bazer F.W., McBride R., Boland M.P., O'Gaora P., Lonergan P. and Roche J.F. 2009. Progesterone-Regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction* 81: 784-794.
- Forde N., Beltman M.E., Lonergan P., Diskin M., Roche J.F., Crowe M.A. 2011a. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science* 124: 163-169.
- Forde N., Beltman M.E., Duffy G.B., Duffy P., Mehta J.P., O'Gaora P., Roche J.F., Lonergan P. and Crowe M.A. 2011b. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating progesterone and consequences for the conceptus elongation. *Biology of Reproduction* 84: 266-278.
- Forde N. and Lonergan P. 2012. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: what is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle?. *Journal of Reproduction and Development* 58: 189-195.
- Garrett J.E., Geisert R.D., Zavy M.T., Morgan G.L. 1988. Evidence of maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 84: 437-446.
- Geary T.W. and Whittier J.C. 2001. Effects of timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist* 14: 217-220.
- Geary T.W., Smith M.F., MacNeil M.D., Day M.L., Bridges G.A., Perry G.A., Abreu F.M., Atkins J.A., Pohler K.G., Jinks E.M. and Madsen C.A. 2013. Influence of follicular characteristics of ovulation on early embryonic survival. *Journal of Animal Science* 91: 3014-3021.
- Gonella-Diaza A.M., Silva Andrade S.C., Sponchiado M., Pugliesi G., Mesquita F.S., Van Hoek V., de Francisco Strefezzi R., Gasparin G.R., Countinho L.L., Binelli M. 2015.

Size of the ovulatory follicle dictates spatial differences in the oviductal transcriptome in cattle. *PLoS ONE* 10(12):e0145321

- Gutierrez K., Kasimanickam R., Tibary A., Gay J.M., Kastelic J.P., Hall J.B., Whittier W.D. 2014. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. *Theriogenology* 81: 918-924.
- Ing N.H., Spencer T.E. and Bazer F.W. 1996. Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biology of Reproduction* 54: 591-599.
- Ing N.H. and Tornesi B. 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biology of Reproduction* 56: 1205-1215.
- Inskip E.K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science* 82 (E-Suppl.):E24-E39.
- Jinks E.M., Smith M.F., Atkins J.A., Pohler K.G., Perry G.A., MacNeil M.D., Roberts A.J., Waterman R.C., Alexander L.J. and Geary T.W. 2012. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *Journal of Animal Science* 91: 1176-1185.
- Kasimanickam R., Asay M., Firth P., Whittier W.D. and Hall J.B. 2012. Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef heifers synchronized with five-day CO-Synch + controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology* 77: 1624-1631.
- Kasimanickam R., Firth P., Schuenemann G.M., Whitlock B.K., Gay J.M., Moore D.A., Hall J.B. and Whittier W.D. 2014. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2 α in a 5-day progesterone-based Co-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology* 81: 797-804.
- Kastelic J.P., Bergfelt D.R., Ginther O.J. 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33: 1269-1278.
- Kerbler T.L., Buhr M.M., Jordan L.T., Leslie K.E. and Walton J.S. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714.
- Kimmins S. and MacLaren L.A. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22: 742-748.
- Larimore E.L., Amundson O.L., Bird S.L., Funnell B.J., Kruse S.G., Bridges G.A. and Perry G.A. 2015. Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *Journal of Animal Science* 93: 2806-2812.

- Lonergan P. and Forde N. 2014. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal*, 8:s1, pp 64-69.
- Lonergan P., Forde N. and Spencer T. 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 66-74.
- Lopes A.S., Butler S.T., Gilbert R.O., Butler W.R. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Journal of Animal Science* 99: 34-43.
- Machaty Z., Peippo J., Peter A. 2012. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 78 (5):937-950.
- Madsen C.A., Perry G.A., Mogck C.L., Daly R.F., MacNeil M.D., Geary T.W. 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Animal Reproduction Science* 158: 96-103.
- Mann G.E. and Lamming G.E. 2000. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Animal Reproduction Science* 64: 171-180.
- Mann G.E., Fray M.D., Lamming G.E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *The Veterinary Journal* : 500-503.
- Mann G.E. 2009. Corpus luteum size and plasma progesterone concentrations in cows. *Animal Reproduction Science*, (Short communication) 115: 296-299.
- Martínez M.F., Adams G.P., Kastelic J.P., Bergfelt D.R. and Mapletoft R.J. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology* 54: 757-769.
- Martínez M.F., Kastelic J.P., Adams G.P. and Mapletoft R.J. 2002. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *Journal of Animal Science* 80: 1746-1751.
- Menchaca A., Vilariño M., Ibarra D. 2006. GnRH and eCG associated with a progesterone treatment increased pregnancy rate after FTAI in prepueral heifers. *Proceeding of the 7th International Ruminant Reproduction Symposium, Wellington, Nueva Zelanda.*
- Menchaca A., Núñez R., Wijma R., García Pintos C., Fabini F., de Castro T. 2013. How fertility can be improved in fixed-time AI programs in beef cattle. *Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba.* pp. 103-134.
- Menchaca A., Dutra S., Carrau J.M., Sapriza F., Salazar J., de la Mata J.J., Bó G.A. 2015. Improvement of pregnancy rate by using the 6-day J-Synch protocol in recipient cows transferred with in vitro produced embryos. *Animal Reproduction* 12 p. 651 (abstract).

- Meikle A., Sahlin L., Ferraris A., Masironi B., Blanc J.E., Rodríguez-Irazoqui M., Rodríguez-Piñón M., Kindahl H., Forsber M. 2001. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor α and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Animal Reproduction Science* 68: 45-56.
- Moreno D., Cutaia L., Villata L., Otisi F. and Bó G.A.. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol y progesterone. *Theriogenology* 55: 408 (abstract).
- Murphy B.D. and Martinuk S.D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *The Endocrine Society* 12: 27-44.
- Mussard M.L., Burke C.R., Gasser C.L., Behlke E.J., Coliflower K.A., Grum D.E. and Day M.L. 2003. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulate dominant follicles of early or late maturity. *Biology of Reproduction* 68(Suppl.1):332.(Abstr.)
- Mussard M.L., Burke C.R., Behlke E.J., Gasser C.L. and Day M.L. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *Journal of Animal Science* 85: 937-943.
- McNeill R.E., Sreenan J.M., Diskin M.G., Cairns M.T., Fitzpatrick R., Smith T.J. and Morris D.G. 2006. Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during early luteal phase. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 573-583.
- Núñez-Olivera R., de Castro T., García-Pinto C., Bó G.A., Piaggio J. and Menchaca A. 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Animal Reproduction Science* 146: 111-116.
- Okumu L.A., Forde N., Fahey A.G., Fitzpatrick E., Roche J.F., Crowe M.A. and Lonergan P. 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction* 140: 143-153.
- Perry G.A., Smith M.F., Lucy M.C., Green J.A., Parks T.E., MacNeil M.D., Roberts A.J. and Geary T.W. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 102: 5268-5273.
- Perry G.A., Smith M.F., Roberts A.J., MacNeil M.D. and Geary T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85: 684-519.
- Perry G.A., Grant J.K., Walker J.A., Bridges G.A., Kruse S.G., Bird S., Heaton K., Arias R., Lake S.L. 2012. Comparison of three CIDR based fixed-time AI protocols for beef heifers. *J. Anim. Sci.* 90 (Suppl. 3) : 237 (abstract)

- Pessoa G.A., Martini A.P., Carloto G.W., Rodrigues M.C., Claro Júnior I., Baruselli P.S., Bauner C.C., Rubin M.I., Correa M.N., Leivas F.G., Sá Filho M.F. 2016. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos Taurus* beef cows subjected to artificial insemination protocol. *Theriogenology* 85: 792-799.
- Peterson C., Alkar A., Smith S., Kerr S., Hall J.B., Moore D., Kasimanickam R. 2011. Effects of one versus two doses of prostaglandin F₂alpha on AI pregnancy rates in a 5-day, progesterone-based, CO-Synch protocol in crossbred beef heifers. *Theriogenology* 75: 1536-1542
- Pitaluga P.C.S.F., Sá Filho M.F., Sales J.N.S., Baruselli P.S., Vicenti L. 2013. Manipulation of the proestrous by exogenous gonadotropin and estradiol during a timed artificial insemination protocol in suckled *Bos indicus* beef cows. *Livestock Science* 154: 229-234.
- Pursley R.J., Mee M.O. and Wiltbank M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂α and GnRH. *Theriogenology* 44(7):915-23.
- Rabaglino, M.B., Risco, C., Thatcher, M.J., Kim, I.H., Santos, J.E, Thatcher, W.W.2010. Application of one injection of prostaglandin F(2alpha) in the five-day Co-Synch+CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93: 1050-1058.
- Ré M., de la Mata J.J. and Bó G.A. 2014. Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reprod. Fert. and Develop.* 26:118 (abstract).
- Saake R.G., Nadir S. and Nebel R.L. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41: 45-50.
- Sá Filho O.G., Meneghetti M., Peres R.F.G., Lamb G.C., Vasconcelos J.L.M. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 72: 210-218.
- Sá Filho M.F., Torres-Júnior J.R.S., Penteado L., Gimenes L.U., Ferreira R.M., Ayres H., Castro e Paula L.A., Sales J.N.S., Baruselli P.S. 2010. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science* 118: 182-187.
- Sá Filho M.F., Santos J.E.P., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Baruselli P.S. 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 76: 455-465.
- Santos J.E.P., Narciso C.D., Rivera F., Thatcher W.W. and Chebel R.C. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93: 2976-2988.

- Sartori R., Fricke P.M., Ferreira J.C.P., Ginther O.J. and Wiltbank. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction* 65: 1403-1409.
- Sirois J, Fortune J.E. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127(2): 916-925.
- Smith M.F., Pohler K.G., Perry G.A. and Patterson D. 2012. Physiological factors that affect pregnancy rate to artificial insemination in beef cattle. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, Sioux Falls, SD , pp. 33-51.
- Sosa C., Carriquiry M., Chalar C., Crespi D., Sanguinetti C., Cavestany D., Meikle A. 2010. Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone-Insulin-like growth factor system throughout the estrous. *Animal Reproduction Science* 122: 208-214.
- Sousa A.H., Gümen A., Silva E.P.B., Cunha A.P., Guenther J.N., Peto C.M., Caraviello D.Z. and M.C. Wiltbank. 2007. Supplementation with estradiol 17- β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 4623-4634.
- Sreenan J.M. and Diskin M.G. 1986. The extent and timing of embryonic mortality in cattle. *Embryonic Mortality in Farm Animals*. Eds J.M. Sreenan and M.G. Diskin, pp 142-158.
- Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W., Burghardt R.C. and Palmarini M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 65-78.
- Thatcher W.W., Macmillan K.L., Hensen P.J. and Drost M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31: 149-164.
- Thatcher W.W., Meyer M.D., Danet-Desnoyers G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 49: 15-28.
- Torres-Júnior J.R.S., Penteado L., Sales J.N.S., Sá Filho M.F., Ayres H., Baruselli P.S. 2014. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. *Animal Reproduction Science* 151: 9-14.
- Trimberger G.W. 1948. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. *Nebraska Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 153: 1-26.
- Twagiramungu H., Guilbault L.A. and Dufour J.J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *Journal of Animal Science* 73: 3141-3151.

- Uslenghi G., González Chavez S., Cabodevila J. and Callejas S. 2014. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Animal Reproduction Science* 145: 1-7.
- Vasconcelos J.L.M., Sartori R., Oliveira H.N., Guenther J.G. and Wiltbank M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
- Walker W.F., Nebel R.L. and McGilliard M.L. 1996. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 79: 1555-1561.
- Whittier. W.D., Currin J.F., Schramm H., Holland S., Kasimanickam R.K. 2013. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology* 80: 963 – 969.
- Yavas Y. and Walton J.S. 2000. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54: 1-23.