

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

Effect of esto expression and GnRH addition on pregnancy rate in lactating holstein cows synchronized with estradiol and progesterone devices

Juan Carlos Tschopp¹ , Gabriel Amilcar Bó^{1,2} 

¹ Instituto de
Reproducción Animal
Córdoba, Córdoba,
Argentina.

² Instituto A.P. de Ciencias
Básicas y Aplicadas,
Medicina Veterinaria,
Universidad Nacional
de Villa María, Villa
del Rosario, Córdoba,
Argentina.

* Corresponding author:
Juan Carlos Tschopp,
e-mail:
jtschopp1@gmail.com

Recibido: 07/04/2022

Aceptado: 11/05/2022

Publicado: 31/07/2022

ABSTRACT

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

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

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de GnRH al inicio y al final de un tratamiento con dispositivos con progesterona (P4) y estradiol (E2) y la expresión de celos sobre la tasa de preñez (TP) de vacas lecheras en lactancia inseminadas a tiempo fijo (IATF). Para la sincronización de celos se utilizó un tratamiento de 8 días con dispositivo intravaginal con P4 y EB en el día de la inserción y ECP como inductor de la ovulación. En el Experimento 1 se evaluó si la adición de GnRH al inicio del protocolo mejoraba la TP y si la división del horario de inseminación (IA), inseminando a las 48 h solo a las que presentaban celo y la adición de GnRH a las que no mostraron celo y la IA 12 h después (60 h) mejoraba la TP en comparación con la IATF de todas las vacas a las 48 h. Se demostró que la adición de GnRH en el Día 0 no mejoró la TP (44% vs 40%) como sí lo hizo la división del horario de IA con adición de GnRH (53 vs 31; P<0,01). El

objetivo del Experimento 2 fue estudiar la dinámica folicular y evaluar si la TP varía utilizando diferentes horarios de inseminación (48 h vs 60 h) de acuerdo a la expresión de celos en vacas tratadas con dispositivos con P4 y ECP como inductor de la ovulación. Se demostró que la división del horario de IA y la adición de GnRH disminuye la dispersión del intervalo entre la IA y la ovulación. Se encontró una interacción ($P < 0,05$) entre el horario de IA y la expresión de celos. Las tasas de preñez fueron mayores en las vacas en celo a las 48 h que fueron IA en ese momento (47,8%) y las que no estaban en celo a las 48 h y que fueron IA a las 60 h (53,4%) que las que no estaban en celo a las 48 h y que fueron IA en ese momento (19,4%) y las que estaban en celo a las 48 h y que fueron IA a las 60 h (29,7%). En el Experimento 3 se evaluó la TP en función de la adición o no de GnRH a las vacas que no presentaban celo a las 48 h. La tasa de preñez fue mayor ($P < 0,05$) en las vacas que no estaban en celo a las 48 h y que recibieron GnRH en ese momento e IA a las 60 h, que en las vacas que no mostraron celos y no recibieron GnRH (56,0% vs 39,8%). En el Experimento 4 se analizaron los factores que pueden afectar la TP en vacas tratadas con el protocolo desarrollado en este experimento. Se encontró que el stress calórico del mes de enero, una condición corporal $< 2,75$ y presencia de solo folículos < 10 mm (sin CL) afectan negativamente la TP. En conclusión, los resultados de esta serie de experimentos confirman la hipótesis de que la inclusión de una dosis de GnRH y la modificación del horario de inseminación aumentan la TP en vacas lecheras tratadas con dispositivos con progesterona y estradiol que no hayan manifestado celo al momento de la IATF cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación.

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

INTRODUCCION

Aunque los sistemas de manejo de los rodeos lecheros comerciales difieren en distintas partes del mundo, el objetivo reproductivo principal es preñar a las vacas lecheras lo más rápido posible después del parto (Lucy, 2004). El aumento de la producción individual en vacas de leche que ocurrió en las últimas décadas ha sido asociado a una menor eficiencia reproductiva (Washburn et al., 2002; López et al., 2004) relacionado a la dificultad para la detección de celos por las bajas expresiones de los mismos (Washburn et al., 2002; Wiltbank et al., 2006), debido a las menores concentraciones circulantes de estrógeno por el mayor metabolismo hepático de las hormonas esteroideas como resultado del mayor consumo de materia seca y mayor irrigación sanguínea a nivel hepático (Sangsritavong et al., 2002; Wiltbank et al., 2000). A su vez, los métodos tradicionales de detección de celos son ineficientes cuando son aplicados a grandes rodeos lecheros debido a la alta relación vacas/operarios, disminuyendo la precisión y la eficiencia en la detección de los celos (Nebel et al., 1987).

Uno de los impedimentos para lograr una fertilidad adecuada en las vacas lecheras es la demora en el retorno a los ciclos estrales durante los dos primeros meses después del parto (Santos et al., 2009). La falta de ciclicidad estral, un fenómeno también expresado como anovulación (Wiltbank et al., 2002), por lo general afecta a 25% de las vacas lecheras durante aproximadamente 65 días desde el inicio del período de lactancia (DIM; Walsh et al., 2007; Santos et al., 2009). Sin embargo, algunos rodeos podrían tener una prevalencia de hasta el 40% de vacas anovulatorias al final del período de espera voluntaria cuando hay mala salud perinatal y/o mal manejo nutricional (Walsh et al., 2007; Santos et al., 2009).

Para solucionar el problema de baja tasa de servicios se diseñaron diferentes tratamientos hormonales. Una de las alternativas más útiles para incrementar la cantidad de vacas inseminadas en un período corto de tiempo es la utilización de protocolos que sincronizan la ovulación y permiten la inseminación sistemática sin la necesidad de detectar celo, denominados protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Las vacas anovulatorias sometidas a programas de sincronización para la inseminación (IA) a detección de celo o

IA programada por lo general tienen un índice P/IA reducido (Santos et al., 2009; Bisinoto et al., 2010) y mayores porcentajes de pérdidas de preñez que las vacas cíclicas (Santos et al., 2004). Una de las causas de la baja fertilidad en vacas anovulatorias es probable que sea mediada por las bajas concentraciones de progesterona (P4) durante la fase final del crecimiento del folículo y/o afecten el medio endócrino durante el proestro y la función uterina durante el período postovulatorio (Cerri et al., 2011^a; 2011b). Una estrategia para contrarrestar esta baja concentración de P4 endógena ha sido la suplementación con fuentes exógenas de P4 en dispositivo intravaginales, permitiendo el desarrollo de protocolos de inseminación que mejoran la fertilidad de las vacas en anestro posparto y la inseminación de una población de animales significativamente mayor (Bó et al., 2009, Bisinotto et al., 2015a; 2015b).

Los tratamientos de IATF que más se usan en Argentina y el resto de Sudamérica son en base a sales de estradiol y dispositivos con P4 (Bó et al., 2009; 2013) y consisten en administrar 2 mg de benzoato de estradiol (EB) por vía intramuscular (i.m.) junto con la inserción del dispositivo, en lo que nosotros denominamos el Día 0 del tratamiento para sincronizar la emergencia de la onda folicular. En el Día 7 u 8 se extrae el dispositivo y se aplica PGF2 α i.m. para asegurar la luteólisis, junto con la administración de 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG). Además, se administra 1 mg de Cipionato de Estradiol (ECP) en el momento de la remoción del dispositivo o 1 mg de EB i.m. 24 h después para sincronizar la ovulación, realizando la IATF entre las 52 y 56 h de la remoción del dispositivo (Bó et al., 2009; 2013).

Se ha demostrado que los estrógenos (E2) administrados en la fase de elevados niveles de P4 inducen la regresión folicular y la emergencia de una nueva onda folicular sincrónica, mientras que la administración en la fase de bajos niveles de P4 inducen liberación de LH y la ovulación (Mapletoft et al., 2003). Los niveles de E2 en el proestro en vacas de alta producción son más bajos que en animales no lactantes (Sartori et al., 2002a) y animales de baja producción (López et al., 2004), probablemente debido a la alta tasa de metabolismo hepático de los esteroides (Sangsritavong et al., 2002). Estas menores concentraciones de estradiol pueden estar causando disminución en la eficiencia de transporte espermático por el

tracto uterino (Hawk, 1975), menor tasa de fertilización de los ovocitos además un medio ambiente uterino menos favorable para el desarrollo embrionario y el establecimiento de la preñez (Sartori et al., 2002b, Bridges et al., 2013, Jinks et al., 2013).

Souza et al. (2009) describieron que el cipionato de estradiol (ECP; 1 mg i.m.) aplicado al retiro del dispositivo incrementó el porcentaje de vacas en celo dentro de las 48 h, las cuales ovularon antes y fueron menos sincronizadas comparadas con vacas sin celo prematuro, existiendo una mayor variabilidad al momento del pico de LH en vacas tratadas con ECP en relación con las tratadas con GnRH. Debido a esta dispersión en la ovulación las vacas que presentarían un celo prematuro tendrían una buena fertilidad cuando se las insemina a las 48 h, mientras que cuando se las insemina a las 54 h se estaría logrando una buena concepción en aquellas hembras que sufren un atraso en la ovulación. Debido a esto resulta de interés profundizar el estudio sobre dinámica folicular, expresión de celos y ovulación, y su relación con la tasa de preñez (TP) cuando se utiliza ECP como inductor de ovulación. Otra manera de disminuir el número de encierres fue utilizar GnRH en el momento de realizar la IATF como inductor de la ovulación, con resultados similares al tratamiento tradicional en vacas de carne (Bó et al., 2000, Lamb et al., 2001). En presencia de un folículo dominante >10 mm la administración de GnRH induce la ovulación entre las 24 a 32 h (Pursley et al., 1998). La ovulación del folículo dominante está asociada con la disminución de la concentración plasmática de estradiol y por lo tanto se ha reportado una menor expresión de celos en los tratamientos que utilizan GnRH en lugar de E2 como inductor de la ovulación (Martínez et al., 2002).

Se diseñaron cuatro experimentos de IATF con E2 y dispositivos con P4 y ECP como inductor de ovulación en vacas Holstein en lactancia, para evaluar el efecto de la adición de GnRH al inicio y al final de un tratamiento y la expresión de celos sobre la TP. El objetivo del experimento 1 fue evaluar si la adición de GnRH al tratamiento con EB aplicado al momento de la inserción de un dispositivo con P4 mejora la TP. El objetivo del experimento 2 fue estudiar la dinámica folicular y el horario de ovulación de acuerdo con la expresión de celos. El objetivo del experimento 3 fue evaluar si la TP varía utilizando diferentes horarios de inseminación (48 h vs 60 h) de acuerdo con la expresión de celos. El objetivo del experimento 4 fue evaluar si la administración de GnRH a las vacas sin síntomas de celo a las 48 h de retirado el dispositivo y que son inseminadas a las 60 h aumenta la TP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron vacas lactantes Holstein provenientes de un establecimiento lechero comercial, sistema Dry Lot, de aproximadamente 400 vacas en ordeño de la localidad de Marull, ubicado al sudeste de la Provincia de Córdoba (República Argentina), alimentadas con dietas totales mezcladas (TMR) y suministradas en calle de comida a base de silo de maíz, heno de alfalfa, expeller de soja, semilla de algodón o expeller de girasol, maíz molido y sales minerales, balanceadas para atender o exceder los requerimientos nutricionales mínimos de cada categoría (NRC, 2001).

En los experimentos 1, 2 y 3 las vacas recibieron su primer servicio posparto. Se utilizó semen apto al examen de calidad

seminal. Para la asignación de los tratamientos en cada experimento las vacas fueron primero bloqueadas teniendo en cuenta las estructuras ováricas al inicio del tratamiento (presencia de CL, Quiste Ovárico o Folículo ≥ 25 mm, un folículo grande ≥ 10 mm y < 25 mm o un folículo chico < 10 mm de diámetro), condición corporal (CC), producción individual por día al control lechero anterior al inicio de la sincronización (PL), número de partos (NP) y días de parida (DP); y luego distribuidas al azar en cada grupo de tratamiento. Para la visualización de las estructuras ováricas, el diagnóstico de gestación y la reconfirmación de la preñez se realizó ecografía transrectal con un ecógrafo Honda HS-101V (Honda Electronics, Japón) equipado con un transductor de 5 MHz en modo B. Para la determinación de la CC se utilizó la escala de 1 a 5, donde 1 corresponde a vacas emaciadas y 5 vacas obesas, con divisiones de 0,25 puntos. (Edmonson et al., 1989).

Análisis Estadístico

Para el procesamiento de los datos de estos experimentos se utilizó el Software Estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2015). Se ajustó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto del tratamiento sobre las variables tamaño del folículo dominante (FD) en el momento de la remoción del dispositivo con P4 y previo a la ovulación, crecimiento diario del FD y momento de la ovulación. Luego, se analizaron los residuos del primer ajuste y se observó la presencia de homogeneidad de varianzas entre los diferentes tratamientos para el momento de ovulación. Para testear homogeneidad de varianzas entre tratamientos se utilizó la prueba de Bartlett. Las comparaciones de media se realizaron con la diferencia media mínima (DMS) de Fisher (alfa = 0,05) bajo el modelo extendido. Para analizar las curvas de la dinámica folicular bajo los distintos tratamientos se ajustó un ANOVA para modelos mixtos. Para analizar el intervalo entre la IA y la ovulación y la TP, se realizó un gráfico de dispersión donde la variable independiente fue el intervalo entre la IA y la ovulación y la variable dependiente fue la TP. Se analizó mediante modelo lineal generalizado bajo distribución binaria.

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

Experimento 1

Para este experimento se utilizaron 200 vacas Holstein en lactancia, con $72,3 \pm 29,1$ DP, $2,5 \pm 1,3$ NP, $33,2 \pm 7,1$ PL, con una CC de $2,8 \pm 0,4$ y que recibían su primer servicio.

El protocolo de sincronización de los celos que se utilizó fue, en el Día 0: colocación de un dispositivo intravaginal (DIV) de silicona inerte impregnados con 1g de P4 de liberación controlada (DIB® 1 g de P4; Zoetis) junto con la aplicación intramuscular de 2 mg de un análogo sintético de estradiol (EB 1mg/ml, Gonadiol®; Zoetis). En el Día 8 se retiraron los DIB y se aplicó 500 µg de un análogo sintético de Prostaglandina F2α (Cloprostenol Sódico 250 µg/ml, Ciclase® DL; Zoetis), 1 mg de análogo sintético de estradiol de acción prolongada (ECP 0,5 mg/ml, Cipiosyn®; Zoetis) y 400 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG 200 UI/ml, Novormon 5000®; Zoetis).

Los animales fueron divididos en un diseño factorial 2x2 para recibir una dosis de análogo sintético de la Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH; Gonadorelina Acetato 50 µg/ml, Gonasyn GDR®; Zoetis) al momento de la colocación del DIB (Día 0; n=100) o permanecer como controles no tratados (n=100), y para dividir el horario de inseminación inseminando a las 48 h las vacas que presentaban celo a las 48 h y aplicar una dosis de GnRH (Día 10) a las 48 h de retirado el dispositivo y atrasar a las 60 h la IA en animales que no manifiestan celo (n=100) o permanecer como controles no tratados y ser inseminadas todas las vacas a las 48 h independientemente de la manifestación de celo (n=100). Figura 1.

Para la determinación de presencia o ausencia de celo en los animales se contó con la ayuda de pinturas (Celotest, Biotay SA, Argentina), considerándose como animal en celo a todo aquel que a las 48 o 60 h de retirado el dispositivo presentaba más del 40 % de pérdida de color, tomando como referencia el experimento realizado en vacas Braford por Stharinger et al. (2011).

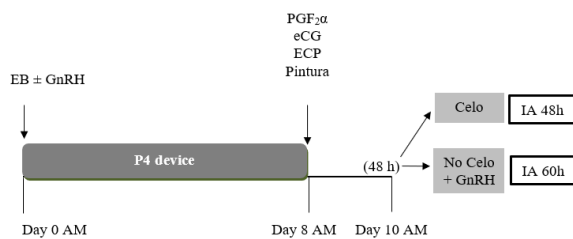


Figura 1. Esquema de los tratamientos hormonales del experimento 1.

Experimento 2

El experimento 2 es complementario del experimento 1 y se realizó una parte intensiva con ultrasonografía frecuente para evaluar la dinámica folicular y el intervalo inseminación ovulación, examinándose cada 12 h desde el momento del retiro del DIB hasta la ovulación o 120 h del retiro. Se utilizaron 40 vacas Holstein en lactancia, con $92,3 \pm 12,1$ DP, $2,8 \pm 1,4$ NP, $33,3 \pm 4,4$ LP, con una CC de $2,7 \pm 0,3$ y que recibían su primer servicio.

Para el diseño del experimento se las dividió en cuatro grupos: Grupo IATF 48: recibieron en el Día 0, 2 mg de EB junto con la aplicación de un DIB. En el Día 8 se removieron los DIB y se administró PGF2α, 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y Pintura en la base de la cola. En el Día 10 se les realizó la IATF a las 48 h de retirado los dispositivos. Grupo IATF 60: ídem al grupo 1 pero se inseminaron todas a las 60 h. Grupo GnRH IATF 60: el tratamiento hormonal es similar al del grupo 2 y se las inseminó a todas a las 60 h con la diferencia de que se les aplicó GnRH a las vacas que a las 48 h de retirado el DIB no habían mostrado celo. Grupo GnRH IATF 48 y 60: el tratamiento hormonal es similar al del grupo 3 con la diferencia de que las vacas que a las 48 h de retirado el dispositivo había estado en celo se las inseminó en ese momento y las que no mostraron celo a las 48 h se les aplicó GnRH en ese momento y se las inseminó a las 60 h. Figura 2.

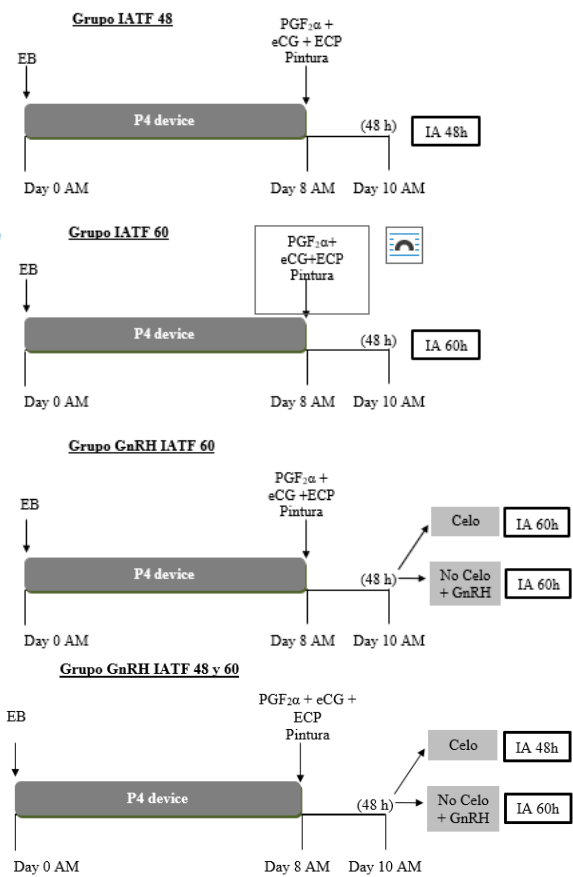


Figura 2. Esquema de los tratamientos hormonales del experimento 2 y 3.

Experimento 3

El diseño del experimento es igual al anterior pero menos intensivo, para evaluar la TP a la IATF de los diferentes tratamientos. Se utilizaron 400 vacas Holstein en lactancia, con $77,0 \pm 22,0$ DP, $2,3 \pm 1,4$ NP, $33,8 \pm 6,3$ LP, con una CC de $2,8 \pm 0,2$ y que recibían su primer servicio.

Experimento 4

Se utilizaron 1066 vacas Holstein en lactancia con $115,5 \pm 69,2$ DP, $2,2 \pm 1,2$ NP, $31,6 \pm 8,0$ LP y una CC de $2,9 \pm 0,2$. Para la asignación de los tratamientos se las dividió en dos grupos y se le asignó dos tratamientos al azar. Se utilizó un tratamiento de 8 días con DIB de 1 g. En el Día 0 se administró 2 mg de EB junto con la aplicación del DIV. En el Día 8 se retiraron los dispositivos y se administró PGF2α, 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y pintura en la base de la cola. A las 48 h de retirado el dispositivo se inseminó a todas las vacas que presentaron celo (pérdida de más del 40% de la pintura, n=565) y las que no manifestaron celo (n=501) recibieron una dosis de GnRH a las 48 h (n=248) y o permanecieron como controles no tratados (n=253) y fueron IATF a las 60 h. Figura 3.

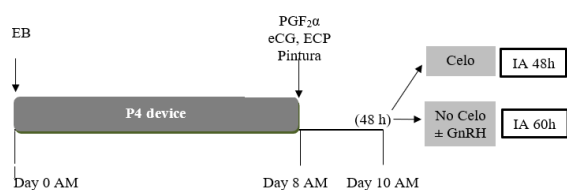


Figura 3. Esquema de los tratamientos hormonales del experimento 4.

RESULTADOS

Experimento 1

Del total de animales, el 62,0% (124/200) presentó celo dentro de las 48 h de retirado el dispositivo, mientras que el 38,0% (76/200) restante no. La aplicación de GnRH en las vacas que no mostraron celo a las 48 h y atrasar su IATF a las 60 h mejoró el porcentaje de preñez (53% vs 31%, $P < 0,01$). Por otro lado, la colocación de GnRH a la inserción del dispositivo en el Día 0 no mejoró significativamente las tasas

de preñez (44% vs 40%, $P > 0,5$), ni hubo una interacción entre la aplicación de GnRH en el Día 0 y el horario de inseminación ($P > 0,1$). Las variables condición corporal, días de parto, número de parto, producción y número de servicios no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$), así como tampoco la interacción entre tratamiento inicial con GnRH y división del horario de IA y aplicación de GnRH en las vacas que no manifestaron celo ($P > 0,1$).

Experimento 2

Los resultados sobre expresión de celos, tasa y hora de ovulación y desarrollo folicular según tipo de tratamiento se resumen en la Tabla 1. Se puede observar que si bien en el Grupo GnRH IATF 48 y 60 en el cual se utilizó GnRH como apoyo para inducir la ovulación del FPO disminuyó la expresión de celos ($P < 0,05$), no afectó la hora de celo ($P > 0,4$), tasa de ovulación ($P > 0,5$) y hora de ovulación ($P > 0,9$). Tampoco existió diferencia entre el diámetro del FO ($P > 0,2$) y la tasa de crecimiento folicular ($P > 0,3$).

Tabla 1. Expresión de celo y respuesta ovárica en vacas Holstein en lactancia IATF según tratamiento.

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

^{ab} denotan diferencias significativas ($P < 0,05$)

*Desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación.

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

Si analizamos el tamaño del FPO y momento de ovulación con respecto a la expresión de los celos podemos ver que las vacas que presentaron celo a las 48 h ovularon antes y con un folículo de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h ($P < 0,05$, Tabla 2).

Tabla 2. Momento de ovulación y tamaño de FPO en vacas Holstein según presencia (despintadas) o ausencia (pintadas) de celo a las 48 h de retirado el dispositivo.

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

^{ab} denotan diferencias significativas ($P < 0,05$)

*Desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación.

Para observar la dinámica de presentación de celos según tratamientos se unieron los Grupos IATF 48 e IATF 60 (sin GnRH) y los Grupos GnRH IATF 60 y GnRH IATF 48 y 60 (con GnRH). La tasa de expresión celos fue mayor en las vacas que

no recibieron GnRH en comparación con las vacas que se les adicionó GnRH ($P < 0,05$). En las vacas sin GnRH la expresión de los celos estuvo comprendida en un rango horario que fue de las 36 h a las 84 h, con una dispersión mayor (varianza $P < 0,01$) que en las vacas que recibieron GnRH, que mostraron celo entre las 48 y 60 h.

Si analizamos la dinámica de ovulación para el grupo sin GnRH (grupo IATF 48 más el grupo IATF 60) y con GnRH (grupo GnRH IATF 60 y grupo GnRH IATF 48 y 60) podemos observar que la tasa de ovulación fue del 95,0% para ambos grupos. Esto demuestra como la administración de GnRH induce ovulación disminuyendo la expresión de celos. Tampoco hubo diferencia significativa en la hora media de ovulación. Sin embargo, si observamos la ventana de ovulación se aprecia una tendencia ($P < 0,1$) a una menor dispersión del momento de ovulación en las vacas que se les adicionó GnRH en comparación con las que no recibieron GnRH. Ver Tabla 3.

En la Tabla 4 se puede ver que el intervalo entre la hora de inseminación y la ovulación fue mayor para el grupo IATF 48 que en el resto de los grupos ($P < 0,05$). El coeficiente de variación y la varianza fueron menores en el Grupo GnRH IATF 48 y 60 donde se dividió el horario de inseminación según expresión del celo y se administró GnRH a las vacas que a las

48 h de retirado el dispositivo no había mostrado signos de estro ($P < 0,05$). Se puede observar cómo en este grupo las ovulaciones se concentraron entre las 12 y 24 h desde el

momento de inseminación a diferencia del resto de los tratamientos donde la dispersión fue mayor.

Tabla 3. Porcentaje y hora promedio de ovulación en vacas IATF con ECP como inductor de la ovulación con o sin adición de GnRH.

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

^a Los porcentajes y media no difieren ($P > 0,05$)

^{cd} Las varianzas tienden a diferir ($P < 0,1$)

Tabla 4. Intervalo en horas entre el momento de inseminación y la hora promedio de ovulación en vacas Holstein IATF según tratamiento.

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

^{ab} denotan diferencias significativas ($P < 0,05$)

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

En la Figura 4 se observó que el mayor porcentaje de preñez se logró cuando las vacas ovularon entre las 12 y 24 h desde el momento de la inseminación, donde la máxima probabilidad de preñez se dio a las 23,7h. Se evidenció que dicho intervalo es estadísticamente diferente a los restantes. Se ajustó un modelo lineal generalizado cuadrático (regresión logística) para la variable binaria diagnóstico en función del intervalo IA-OV, resultando una dependencia estadísticamente significativa entre diagnóstico e intervalo IA-OV ($P < 0,01$).

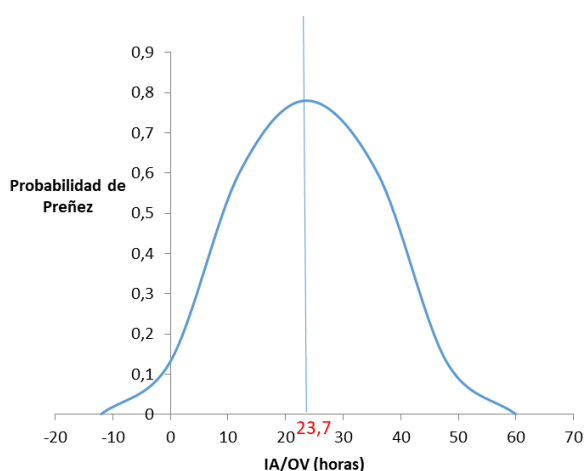


Figura 4. Probabilidad de preñez ajustado en función del intervalo desde la inseminación a la ovulación ($P < 0,01$).

Experimento 3

Al analizar la TP entre grupos se observó que no existió diferencia entre grupos Grupo IATF 48: 42,9% (42/98), Grupo IATF 60: 39,0% (39/100); Grupo GnRH + IATF 60:

40,2% (39/97); GnRH + IATF 48 y 60: 46,0% (46/100). Del total de 400 vacas iniciadas en el experimento, 5 vacas se han perdido debido a que fueron descartadas por venta o muerte antes del diagnóstico de gestación.

Si bien los diferentes tratamientos no afectaron la TP, cuando se analizaron los datos teniendo en cuenta la expresión de celos y el horario de inseminación (Tabla 5) se observó una interacción ($P < 0,01$) entre estos factores. Las vacas que no presentaron celo a las 48 h y fueron inseminadas a las 60 h y las vacas que presentaron celo a las 48 h y fueron inseminadas a las 48 h se preñaron más que las que mostraron celo a las 48 h y fueron inseminadas a las 60 h y las que no mostraron celo y fueron inseminadas a las 48 h ($P < 0,01$). Esto demuestra que la división del horario de inseminación en vacas IATF utilizando ECP como inductor de la ovulación mejora el porcentaje de preñez. Se pudo observar que las vacas que mostraron celo al momento de la IA después de la aplicación de GnRH tuvieron una mayor TP (59,5%, 29/67) que las que no lo hicieron (43,3%, 53/89 $P < 0,05$).

Tabla 5. TP según presencia o ausencia de celo a las 48 h en relación con la hora de IA.

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

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

Experimento 4

La tasa de preñez general fue mayor en el grupo tratado con GnRH a las vacas que no mostraron celo a las 48 h de retirado

el dispositivo (50,6%; 268/530 vs 42,7%; 229/236; $P < 0,01$) (Tabla 6).

Tabla 6. TP en vacas Holstein en lactancia IATF con ECP como inductor de la ovulación, con división en el horario de IA y adición o no de GnRH a las que no presenten estro a las 48 h.

Tratamiento	IA 48 h	Preñez	IA 60 h	Preñez	TP
Sin GnRH	52,8% (283/536)	45,6% ^a (129/283)	47,2% (253/536)	39,5% ^a (100/253)	42,7% ^c (229/536)
Con GnRH	53,2% (282/530)	43,6% ^a (123/282)	46,8% (248/530)	58,5% ^b (145/248)	50,6% ^d (268/530)

^{a,b,c} Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ($P < 0,01$).

Cuando se consideraron solo las vacas que no presentaron celo a las 48 h se encontró una interacción significativa ($P < 0,05$) entre las que mostraron celo a las 60 h (horario de la segunda IATF) y si recibieron o no GnRH. No hubo diferencia en la TP entre las vacas que presentaron celo a las 60 h con GnRH (61,1%; 55/90) o sin GnRH (53,5%; 54/101) y las que no presentaron celo a las 60 h pero que recibieron GnRH 12 h antes (57%; 90/158; $P > 0,1$), mientras que las vacas que no presentaron celo ni recibieron GnRH tuvieron una menor TP que los otros grupos (30,3%; 46/152; $P < 0,001$) (Tabla 7).

Tabla 7. TP según tratamiento en vacas que no presentaron celo a las 48 h de retirado el dispositivo y su relación con la presencia de celos a las 60 h.

Tratamiento	Celo 60 h	Tasa de Preñez
Sin GnRH	Si	53,5% (54/101) ^a
Con GnRH	Si	61,1% (55/90) ^a
Sin GnRH	No	30,3% (46/152) ^b
Con GnRH	No	57,0% (90/158) ^a

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ($P < 0,001$).

DISCUSIÓN

Del análisis de los resultados generales de esta serie de experimentos se puede confirmar la hipótesis de que la inclusión de una dosis de GnRH al final del tratamiento de sincronización y la modificación del horario de inseminación aumentan la tasa de preñez en vacas tratadas con dispositivos con P4 que no hayan manifestado celo al momento de la IATF cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación.

En el Experimento 1, la idea de colocar GnRH en el Día 0 fue mejorar la sincronía de una nueva onda folicular al estimular la liberación de LH y consecuentemente la ovulación de los folículos de mayor tamaño, con la subsiguiente formación de un CL evitando de esta manera la existencia de folículos persistentes de menor fertilidad (Pereira et al., 2015). No obstante, se observó que este tratamiento no mostró diferencias significativas en las tasas de preñez con los que solo utilizaron EB al inicio del tratamiento, indicando que el posible efecto ovulatorio de la GnRH sobre los folículos > 10 mm de diámetro (Wiltbank et al., 2013) no influyó la

respuesta al tratamiento. Pereira et al. (2015) realizaron un experimento para evaluar el efecto de la administración de GnRH en el Día 0 en vacas lecheras de alta producción en Brasil y observaron que el tratamiento con GnRH solo tuvo un aumento marginal en la TP especialmente durante la temporada fría del año y en vacas con ausencia de CL y baja P4 en el inicio del protocolo (< 3 ng/ml), mientras que en las con CL no se encontraron diferencias. Esto estaría indicando que la ausencia de diferencias significativas en el Experimento 1 de esta tesis, se puede deber principalmente a que la mayoría de las vacas (68%) tenían un CL en el momento del iniciar el tratamiento. La razón por la diferencia en el efecto de adicionar GnRH en las vacas sin CL con las vacas con CL puede ser debido a que la liberación de LH en respuesta a la administración de GnRH es mayor en vacas con bajos niveles de P4 que las que tienen altos niveles de P4 (Kastelic y Mapletoft, 1998). Por lo tanto, es lógico pensar que la GnRH va a tener un mayor efecto inductor de la ovulación del folículo dominante en las vacas con baja P4. De hecho, en el experimento de Pereira et al. (2015) la administración de GnRH en el Día 0 del tratamiento resultó en un mayor porcentaje de vacas que formaron un nuevo CL y mayores niveles circulantes de P4 en el Día de la remoción del dispositivo que en el grupo control que no recibió GnRH. Por lo tanto, el experimento de Pereira et al. (2015) muestra solo diferencias marginales en las vacas con CL, cuestionando la justificación de adicionar GnRH en el Día 0 en forma sistemática en vacas lecheras cuando la mayoría de ellas está ciclando al inicio del protocolo. Por lo tanto, debido a su alta eficiencia y simplicidad, los resultados del Experimento 1 no justificarían la adición de una dosis de GnRH en el momento de la inserción del dispositivo para la IATF de vacas lecheras en lactancia. El tratamiento que más se sigue utilizando en América Latina para iniciar una nueva onda folicular sincrónica en protocolos de IATF, es la combinación de P4 más estradiol, ya que suprime eficientemente la secreción de FSH y LH iniciando una nueva onda entre los 2 y 5 días, con un promedio de 4 días en un 90% de las vacas de carne (Bó et al., 1994; 1995; 2002) y un 75% de las vacas de leche (Balla et al., 2005) con variaciones según el nivel de producción. A pesar de que Souza et al. (2007b) demostraron que las vacas con mayores producciones de leche (> 35 kg/día) poseen una emergencia más temprana de la onda folicular ($3,5 \pm 0,2$ días) que las que poseen una producción menor (< 25 kg/día; $4,6 \pm 0,3$ días), eso no se ha traducido en diferencias en la TP en las vacas de este experimento.

En este experimento los tratamientos en los que se dividió el horario de inseminación con respecto a la expresión de celos tuvieron mayor TP (53% vs 31%, $P < 0,01$) que los que fueron IATF a las 48 h, coincidiendo con lo sugerido por Souza et al., (2009) que demostró que las vacas que presentan un celo prematuro presentarían una buena fertilidad cuando se las insemina a las 48 horas, mientras que cuando se las insemina a las 56 horas se estaría logrando una buena concepción en aquellas vacas que tienen un celo más retrasado.

El objetivo del Experimento 2 fue estudiar mejor la dinámica folicular en protocolos de IATF con E2 y dispositivos con P4 utilizando ECP como inductor de la ovulación y en base a estos hallazgos evaluar cuál era el mejor horario de inseminación y si la división del horario de IA y la adición de una dosis de GnRH a las que no presentaban signos de celo mejoraba la TP en comparación con las que utilizaban un único horario de IA. Los inductores de ovulación que más se utilizan en protocolos de IATF son hormonas que inducen un pico de LH, tales como los ésteres de estradiol y la GnRH. Con la aplicación de ECP al retiro del dispositivo la concentración plasmática de estradiol comienza a aumentar a las 12 horas (Vinckier et al., 1990; Souza et al., 2009; Uslenghi, 2016) y en presencia de un folículo dominante grande podría inducir un pico de LH anticipado, debido a la sumatoria del estradiol producido por la inyección de ECP y el estradiol endógeno producido por el propio folículo, adelantando la ovulación de los folículos de mayor tamaño (Colazo et al., 2003). De esta manera podrían llegar a ovular en forma temprana (antes de las 60 h) viéndose afectada la fertilidad de las vacas que ovulan tempranamente. Por otra parte, el pico de LH que produce el ECP es de menor magnitud que el producido cuando se utiliza EB como inductor de la ovulación ($9,4 \pm 2,2$ vs $20,5 \pm 1,9$ ng/ml) pero de mayor duración ($50,5 \pm 3,6$ vs $19,6 \pm 1,2$ h) que explica la mayor dispersión de celos y las ovulaciones (Sales et al., 2012). Las vacas tratadas con ECP como inductor de ovulación tienen una ventana de ovulación más amplia que cuando se utiliza EB, de aproximadamente 48 h, entre 42 y 90 h pos-retiro del dispositivo (Ayres et al., 2008; Uslenghi et al., 2014). Así, considerando que el ECP es administrado al retiro del DIV, y que la concentración plasmática de estradiol comienza a aumentar a las 13 h (Vinckier et al., 1990), las vacas tratadas con este inductor de la ovulación están expuestas a altas concentraciones de estradiol varias horas previas en comparación con las vacas que reciben EB a las 24 posteriores, y es justamente esto lo que podría inducir que algunos folículos que han alcanzado un estadio de desarrollo adecuado, ovulen en forma temprana (42 h pos retiro de los DIV) (Uslenghi et al., 2014); por lo cual los animales que entran en celo a las 48 h y se inseminan más tarde ven dificultada su preñez debido a que al ovular tempranamente tienen un ovocito envejecido al momento de la inseminación, disminuyendo la tasa de fecundación o produciendo muertes embrionarias tempranas (Dalton et al., 2001).

En el experimento 2 se pudo observar que, si bien los tratamientos en los cuales se utilizó GnRH como apoyo para inducir la ovulación del FPO disminuyó la expresión de celos, no afectó la hora de celo, tasa de ovulación y hora de ovulación. En las vacas sin GnRH la expresión de los celos estuvo comprendida en un rango horario que fue de las 36 a las 84 h, con una dispersión mayor que en las vacas que recibieron GnRH, que mostraron celo entre las 48 y 60 h. Esto demuestra como la administración de GnRH induce ovulación

disminuyendo la expresión de celos coincidiendo con lo reportado por Martínez et al. (2002) quien reportó que la ovulación del FD al administrar GnRH está asociada con la disminución de la concentración plasmática de E2 y por lo tanto menor expresión de celos. Tampoco hubo diferencia entre el diámetro del FPO y la tasa de crecimiento folicular. Si analizamos el tamaño del FPO y momento de ovulación con respecto a la expresión de los celos podemos ver que las vacas que presentaron celo a las 48 h ovularon antes y con un folículo de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h, similar a lo reportado por Salfen et al. (1999). Así mismo, hubo una tendencia ($P < 0,1$) a una menor varianza en la hora de ovulación en las vacas que recibieron GnRH en comparación con las que no. Cuando se analizó el horario de ovulación con respecto a la inseminación se pudo observar una menor dispersión desde el momento de la inseminación a la ovulación en el tratamiento donde se dividió el horario de IA y se utilizó GnRH en las vacas que no presentaron celo a las 48 h con respecto al resto de los tratamientos. Con este tratamiento las ovulaciones se concentraron entre las 12 y 24 h desde el momento de la IA, siendo el mejor intervalo inseminación/ovulación (IA/OV) para lograr una adecuada tasa de fertilización según sostienen Dransfield et al. (1998) y Rodríguez Hernández et al. (1995), a diferencia del resto de los tratamientos donde la dispersión fue mayor. Dransfield et al. (1998) demostraron que la probabilidad de que ocurra una concepción disminuía a medida que la IA se aproxima mucho al momento de la ovulación y cuando la IA se realizaba en animales ya ovulados. En este experimento se pudo determinar que el intervalo IA/OV donde se logró la mayor TP fue entre las 12 y las 24 h, donde la máxima probabilidad de preñez se dio a las 23,7h. Esto demuestra que la división del horario de IA y la adición de GnRH en vacas IATF utilizando ECP como inductor de la ovulación disminuye la dispersión entre la inseminación y la ovulación resultando en un adecuado control y sincronización de las ovulaciones. Las vacas que presentan un celo prematuro presentarían una buena fertilidad cuando se las insemina a las 48 h, mientras que la aplicación de GnRH para evitar retrasos en las ovulaciones y el atraso del horario de IA a las que no presentaron celo a las 48 h mejoraron el porcentaje de preñez.

El experimento 3 se realizó para evaluar las tasas de preñez a la IATF de los diferentes tratamientos, donde se observó que no hubo diferencia significativa entre tratamientos, contrariamente a lo encontrado en el Experimento 1. En el Experimento 1, el grupo que se inseminó de acuerdo a la expresión de celos tuvo una TP significativamente mayor que el grupo en el cual todas las vacas fueron IATF a las 48 h. Si bien se esperaba una mayor TP en este tratamiento, en el experimento 3 no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos. Es difícil poder explicar el motivo de estos resultados diferentes. Una diferencia posible puede ser el semen utilizado en cada uno de los experimentos. Se ha estimado que la máxima viabilidad espermática en el tracto genital femenino es de 24 a 30h (Hiers et al., 2003) por lo cual lograr una mejor sincronía entre la ovulación y el arribo de los espermatozoides debería mejorar la tasa de fecundación. Sin embargo, hay grandes variaciones entre toros en cuanto a la persistencia de espermatozoides viables en el tracto reproductivo femenino (Dalton, 2013). Por lo tanto, es posible que el semen utilizado en este estudio haya sido de una calidad superior o de mayor fertilidad individual que el utilizado en el Experimento 1, compensando en parte la

deficiencia en la distribución de las ovulaciones, permaneciendo viable en el tracto genital femenino durante un mayor período de tiempo. Desafortunadamente, estas diferencias de persistencia en el oviducto no son posibles de determinar por las pruebas *in vitro* convencionales de evaluación de la calidad seminal (Dalton, 2013). No obstante, a pesar de que las diferencias entre grupos no fueron significativas los valores favorecieron numéricamente al grupo en el que se dividió la IA de acuerdo a la expresión de celos.

La conclusión más importante del Experimento 3 es que, a pesar de no haber diferencias en la TP entre grupos, cuando se analizaron los datos teniendo en cuenta la expresión de celos y el horario de inseminación se encontró una interacción significativa entre ellas. Se demostró que las vacas que presentaron celo a las 48 h del retiro del dispositivo se preñaron más cuando se las inseminó a las 48 h y las que no presentaron celo se preñaron más cuando se las inseminó a las 60 h, afirmando que la división en el horario de inseminación en protocolos de IATF que utilizan ECP como inductor de la ovulación sería una medida adecuada para disminuir la sincronía IA/OV.

Además de eso, se observó que las vacas que demostraron celo previo a la IA obtuvieron mayor TP que las que no lo hicieron, tanto en las que presentaron celo a las 48 h (48% vs 30%) como las que mostraron celo luego de la aplicación de GnRH (60% vs 43%). Según Perry et al. (2014) existe una interacción entre el diámetro del FPO, el ambiente hormonal óptimo (demostrado por la expresión de celos), y el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Las vacas que presentan celo antes de la IA tienen más chances de ovular y lograr una preñez en comparación con las que no lo hacen (Perry et al., 2007). El diámetro folicular al momento de la IATF y la ocurrencia de estro al final del protocolo de sincronización es uno de los factores que pueden influenciar las respuestas de los protocolos de sincronización (Sa Filho et al., 2010; 2011b) porque está relacionado con la producción de E2, el tamaño del CL de la fase luteal subsiguiente y la producción de P4 (Thatcher et al., 2001; Souza et al., 2009). El crecimiento folicular final y el diámetro del FD en el momento de la IATF pueden afectar significativamente la calidad de los ovocitos, la ovulación, el ambiente uterino, y por consiguiente, la preñez. En vacas tratadas con EB al inicio del protocolo, los folículos ovulatorios más grandes en el día de la IATF muestran una mayor expresión de celos, mayor tasa de ovulación y dan lugar a un mayor número de preñeces por IA (Sá Filho et al., 2010; Tschopp y Bó, 2015). En base a esto, podríamos concluir que en vacas que presenten celo al momento de la IATF podríamos utilizar semen de mayor valor genético debido a que tienen mayor probabilidad de preñarse.

En el experimento 4 se evaluó la TP en función de la adición o no de GnRH a las vacas que no presentaban celo a las 48 h y se difería su inseminación a las 60 h. En este caso se encontró una diferencia estadística en favor del tratamiento que utilizó GnRH, demostrando que con la adición de GnRH a las vacas que no presentaron celo a las 48 h mejora la TP general a la IATF. Además, el hallazgo más importante de este experimento fue que no hubo diferencia en las TP entre las vacas que presentaron celo a las 60 h con GnRH o sin GnRH y las que no presentaron celo a las 60 h pero que recibieron GnRH 12 h antes, mientras que las vacas que no presentaron celo ni recibieron GnRH tuvieron una menor TP que los otros grupos.

Trabajos de Ribadu et al. (1999) informaron que el tratamiento de vacas lecheras repetidoras con GnRH al momento de la IA resultó en el aumento de los índices de preñez, pudiéndose deber simplemente a la estimulación de un pico de LH en el subconjunto de vacas que presentan celo evidente sin el posterior pico de LH u ovulación. Del mismo modo, la adición de GnRH a las vacas sin síntomas de celo a las 48 h parecería estar adelantando la ovulación en las vacas que todavía no han tenido un pico de LH y por lo tanto tendrían una ovulación muy retrasada. La administración de GnRH produce un pico de liberación de LH dos horas después de su administración i.m., en una magnitud que depende del estado en que se encuentra la onda folicular, desencadenando la ovulación en vacas con un FD > a 9 mm de diámetro (Souza et al., 2009).

Esto demuestra que la administración de GnRH mejora la TP induciendo una ovulación más sincrónica en las vacas que no presentan celo a las 60 h de retirado el dispositivo, probablemente debido a que la administración de GnRH induce la ovulación de las vacas que todavía no habían tenido un pico de LH y por lo tanto tendrían una ovulación muy retrasada y tal vez la ovulación de vacas con folículos más pequeños (Pereira et al., 2013; Vasconcelos et al., 2013). A diferencia de lo ocurrido que en el Experimento 2 donde se pudo observar que las vacas que presentaron celos se preñaron más que las que no presentaron celo, tanto a las 48 h como a las 60 h, coincidiendo con Perry et al. (2007) que observó que en general, las vacas que expresan celo antes de la inseminación tienen más chances de ovular en comparación con las que no lo hacen; en este experimento las vacas que no presentaron celo pero que recibieron la adición de una dosis de GnRH como inductor de la ovulación, se preñaron igual que las que expresaron celo a la hora de la IA. Pereira et al. (2016) reportaron que la expresión de celos al momento de la IATF o TETF se asoció con un aumento de la fertilidad mejorando la tasa de preñez (sin estro 25,5% vs con estro 38,9%) y disminución de la pérdida de preñez (sin estro 20,1% vs con estro 14,4%).

CONCLUSION

Los resultados de estos experimentos confirman la hipótesis de que la inclusión de una dosis de GnRH y la modificación del horario de inseminación aumentan la TP en vacas lecheras sincronizadas con un tratamiento a base de estradiol-progesterona. Las vacas que presentaron celo a las 48 h ovularon antes y con un folículo de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h, por lo tanto la inseminación con respecto a la expresión de celos disminuyó la dispersión entre la inseminación y la ovulación y mejoró las tasas de preñez. A su vez la expresión de celo previo a la inseminación mejoró la TP, tanto en las inseminadas a las 48 h de retiro del dispositivo como las que mostraron celo luego de la aplicación de la GnRH (entre las 48 y 60 h) y fueron IATF a las 60 h.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Los autores de este trabajo prepararon el artículo y contribuyeron de manera similar con las figuras y referencias

del mismo, y todos realizaron los ajustes finales y la supervisión de la escritura del artículo.

REFERENCIAS

- Ayres H, Martins CM, Ferreira RM, Mello JE, Dominguez JH, Souza HÁ, Vslentín R, Santos ICC, Baruselli PS. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos Indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 109, 77-87.
- Balla E, Filippi D, Marañña Peña D, Pincinato D, Perez LC, Cutaia L, Veneranda G, Martínez MF, Bó G. Efectos de diferentes protocolos de sincronización de la ovulación con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el desarrollo folicular y las tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia. *Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción en bovinos. IRAC 2006, Huerta Grande. Córdoba. 30 de junio y 1 de julio del 2006. CD (abstract).*
- Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JE. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010;93(8):3578-3587. doi:10.3168/jds.2010-3047
- Bisinotto RS, Castro LO, Pansani MB, et al. Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol. *J Dairy Sci.* 2015a;98(4):2515-2528. doi:10.3168/jds.2014-9058
- Bisinotto RS, Lean IJ, Thatcher WW, Santos JE. Meta-analysis of progesterone supplementation during timed artificial insemination programs in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015b;98(4):2472-2487. doi:10.3168/jds.2014-8954
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Caccia M, Tríbulo H, Mapletoft RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 1994; 41, 1555-1569.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 1995. 43, 31-40.
- Bó GA, Medina M, Tegli JC, Costamagna A, Brogliatti GM. Fixed-timed artificial insemination in CIDR-B treated cows induced to ovulated with estradiol benzoate or GnRH. *Proc. 14 th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2000. 14-14, págs. 2-45. Stockolm, Sweden.*
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 2002. 57, 53-72. 3.
- Bó GA, Cutaia LE, Souza AH, Baruselli PS. Actualización sobre protocolos de IATF en Bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona. *Taurus*, 2009. 41, 20-34.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2013. 10, 137-142.
- Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH. Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J Anim Sci.* 2013. 91:3002-3013.
- Cerri RL, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Olivera RA, Thatcher WW, Santos JEP. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.* 2011 a. 94:3342-3351.
- Cerri RL, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Olivera RA, Amstalden M, Baez-Sandoval GM, Olivera LJ, Thatcher WW, Santos JEP. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.* 2011 b. 94:3352-3365.
- Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 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*, 2003. 60, 855-865.
- Dalton JC, Nadir JH, Bame M, Noftzinger A, Nebel RL, Saacke RG. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2001. 84:2413-2418.
- Dalton J. Características del semen de relevancia para la inseminación artificial a tiempo fijo. *Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 183-198). Córdoba, Argentina. 2013.*
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. (s.f.). *InfoStat versión 2015. Obtenido de Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.: <http://www.infostat.com.ar>.*
- Diskin MG, Morris DG. Embryonic and fetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim.*, 2008. 43 (supl 2), 260-267.
- Dransfield MBG, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 1998. 81:1874-1882.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1989. 72, 68-78.
- Hawk HW. Hormonal control of changes in the direction of uterine contractions in the estrous ewe. *Biol. Reprod.*, 1975. 12, 423-430.
- Hiers E, Barthle C, Dahms V, Portillo G, Bridges G, Rae D, Thacher W, Yelich J. Synchronization of *Bos Indicus* x *Bos Taurus* cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F2 α in combination with megestrol acetate. *J. Anim. Sci.*, 2003. 81, 830-835.
- InfoStat. *InfoStat/Profesional, versión 2007. Grupo InfoStat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina (2007).*
- Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, MacNeil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, Geary TW. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J Anim Sci*, 2013. 91:1176-1185.
- Kasteic JP, Mapletoft RJ. Ovarian Follicular responses in dairy cows treated with GnRH and cloprostenol. *Can Vet J.* 1998. 39 (2) 107-9.
- Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 α for ovulation

- control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci*, 2001. 79:2253-2259.
- Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 2004. 81, 209-223.
 - Lucy M.C., 2004. The use of treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture based management systems. *Anim Reprod Sci.*, 82-83, 495-512.
 - Mapletoft RJ, Colazo MG, Martinez MF, Kastelic JP. Ésteres de estrógenos para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. V Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2003. (págs. 55-67). Córdoba, Argentina.
 - Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed time AI in beef heifers. *J. Animal Sci.*, 2002. 80, 1746-1751.
 - Nebel RL, Jobst SM, Dransfield MB, Bailey TL. Use of radio frequency data communication system, HeatWatch®, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 1987. 80, 179-197.
 - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Revised edition, National Academic of Sciences. Washington, DC, Estados Unidos, 2001.
 - Pereira MH, Rodrigues AD, Martins T, Oliveira WV, Silveira PS, Wiltbank MC, Vasconcelos JL. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/ progesterone-based protocol. *J. Dairy Sci.*, 2013. 96, 6904-6914.
 - Pereira MHC, Wiltbank MC, Barbosa LFSP, Costa Jr WM, Carvalho MP, Vasconcelos JLM. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. *J. Dairy Sci*, 2015. 98, 947-959.
 - Pereira MHC, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J. Dairy Sci.*, 2016. 99, 2237-2247.
 - Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, Macneil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. animal Sci.*, 2007. 85, 684-689.
 - Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2014. 48, 15-20.
 - Pursley JR, Silcox RW, Wiltbank MC. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1998. 81, 2139-2144.
 - Ribadu AY, Nakada K, Tanaka Y, Moriyoshi M, Zhang WC, Nakao T. Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. *J Vet Med Sci*, 1999. 61, 979-981.
 - Rodríguez Hernández T, Espinoza J, Verde O. Efecto del momento de inseminación artificial, masaje clitorico, temperatura rectal y otros factores sobre la preñez en bovinos. *Zootécnia. Tropical*. 1995. 13:129.
 - Sá Filho M, Crespilho A, Santos JE, Perry G, Baruselli P. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010. 120, 23-30.
 - Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, 2011b. 76, 455-463.
 - Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JRG, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli OS. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, 2012. 78, 510-516.
 - Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil*, 1999. 115, 15-21.
 - Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2002. 85, 2831-2842.
 - Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvao KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 2004. 82-83:513-535.
 - Santos J.E.P., H.M. Rutigliano and M.F. Sa Filho. 2009. Risk Factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *An. Reprod. Sci.* 110:207-221.
 - Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, 2002a. 85, 2813-2822.
 - Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, 2002b. 85, 2803-2812.
 - Souza AH, Gumen A, Silva EPB, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ, Wiltbank MC. Supplementation with Estradiol-17 β before the last Gonadotropin-Releasing Hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2007b. 90, 4623-4634.
 - Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araujo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI

- protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 2009. 72, 10-21.
- Stahringer RC, Vispo PE, Prieto PN, Fogliatti G. Evaluación del pintado en a base de la cola en protocolos de IATF en vacas Bradford pluríparas. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2011. (pág. 335). Córdoba, Argentina.
 - Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopez FL, Pancarci SM, Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 2001. 55, 75-90.
 - Tschopp JC, Bó GA. Momento de inseminación y expresión de celos en vacas lecheras sincronizadas con dispositivos con progesterona y estradiol. XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2015. (págs. 209-233). Córdoba, Argentina.
 - Uslenghi G, Gonzales Chavez S, Cabodevila J, Callejas S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 2014. 145, 1-7.
 - Uslenghi G. Factores que afectan la eficiencia reproductiva en bovinos para carne inseminados a tiempo fijo: sal de estradiol, sincronización de la ovulación y calidad seminal. Tandil, Buenos Aires, Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A. 2016. 105 pp.
 - Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Meneghetti M, Dias CC, SaFilho OG, Peres RFG, Rodrigues ADP, Wiltbank MC. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.*, 2013. 10, 206-214.
 - Vynckier L, Debackere M, De Kruijff A, Coryn M. Plasma estradiol-17 β concentration in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate – a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol Theriogenology*, 1990. 13, 36-42.
 - Walsh RB, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2007. 90:315-324.
 - Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.*, 2002. 85, 244-251.
 - Wiltbank MC, Fricke PM, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther OJ. Mechanisms that prevent and produced dooble ovulations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2000. 83, 1-10.
 - Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R. Physiological clasification of anovulatory condition in cattle. *Theriogenology*. 2002. 57:21-52.
 - Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 2006. 65, 17-29.
 - Wiltbank MC, Souza A, Carvalho P, Bender R, Nascimento A. Como mejorar la fertilidad a la IATF mediante la manipulación de las concentraciones de progesterona circulante en el ganado lechero. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 77-90). Córdoba, Argentina. 2013.