

## PROGRAMAS DE IATF EN GANADO BOVINO LECHERO

Gabriel A. Bó<sup>12</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC),

Paraje Pozo del Tigre, Gral. Paz (5145), Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Villa María, Córdoba, Argentina

E-mail: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

### Resumen

Las intervenciones hormonales han sido utilizadas para aumentar la probabilidad de detección de celo e inseminación y para aumentar las tasas de preñez en animales lecheros en diferentes sistemas de manejo. Esta revisión tratará los principios básicos de la intervención hormonal y presentará ejemplos que ilustran la metodología. Las hormonas utilizadas para controlar el ciclo estral, imitan las hormonas reproductivas que se encuentran en la vaca normal. La mayoría de los sistemas de sincronización de celo emplea un método para controlar el desarrollo de la onda folicular, promoviendo la ovulación en vacas en anestro, haciendo que regrese el cuerpo lúteo en vacas cíclicas y sincronizando el celo y la ovulación al final del tratamiento. En los tambos se utiliza una gran variedad de sistemas reproductivos. Numerosos estudios en sistemas pastoriles y en sistemas intensivos han demostrado los beneficios netos de la sincronización sistemática de todo el rodeo. Los beneficios de un sistema de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) aumentan en condiciones de bajas tasas de detección de celo y de concepción. Por eso la aceptación de estos programas en USA y México, por ejemplo, es bastante alta y está creciendo significativamente en los países Sudamérica. La menor aceptación inicial los programas de IATF en sistemas pastoriles de Australia y Nueva Zelandia está cambiando gradualmente, debido a que la aparente alta tasa de detección de celos que tenían estos sistemas está en franca caída debido al incremento del número de vacas que están sufriendo los tambos y la imposibilidad de utilizar benzoato de estradiol para estimular la expresión de celos y la ovulación en las vacas en anestro tratadas con dispositivos con progesterona como el CIDR. Sin importar el sistema de producción, muchas vacas deben ser re-inseminadas por no resultar preñadas a la primera inseminación. La presencia de vacas que no están preñadas y que no vuelven a entrar en celo presenta un serio desafío para los productores, tanto con sistemas pastoriles como intensivos. El diagnóstico temprano de preñez mediante ultrasonografía y una segunda IATF son cruciales reducir los efectos de negativos de la no observación de celos en las vacas vacías después del primer servicio. Por último, los programas recomendados continúan siendo estudiados por muchos investigadores en el mundo. Indudablemente mantenerse informado y bien asesorado es la clave del éxito.

**Palabras claves:** semen, inseminación, bovino, sincronización

### Introducción

Las vacas lecheras son manejadas de manera distinta en el mundo. Los sistemas pastoriles (generalmente en Nueva Zelanda, Australia, algunos países de la Unión Europea y Sudamérica) suelen mantener un patrón de parición estacional. Las vacas que no mantienen un intervalo de parición anual suelen ser descartadas como no preñadas o inducidas al parto antes de término. Otra alternativa es servir a esas vacas en el siguiente periodo de servicio, en rodeos con dos estaciones de servicios, comunes en Australia y también utilizados en Argentina. Las vacas que se encuentran en sistemas estabulados (algunos países de la Unión Europea, Norteamérica, México, Chile y Brasil) y en sistemas mixtos (como los de Argentina), no necesitan un patrón de parición estacional y se trata de mantener un intervalo entre partos cercano a los 12-13 meses.

Teóricamente, mantener un intervalo de parición de 1 año para vacas muy productoras de leche puede resultar perjudicial porque las vacas tendrían que ser secadas cuando la producción de leche es todavía rentable. Sin embargo, mantener un intervalo entre partos de 12-13 meses se ha transformado en una utopía, debido a que en los últimos años se ha observado una constante caída de los índices reproductivos en las vacas lecheras (Lucy, 2001; Wiltbank *et al.*, 2006). Esto está relacionado con un decaimiento en la fertilidad propia de las vacas lecheras de los tambos en todo el mundo y por la escasa eficiencia en la detección de celos (Thatcher *et al.*, 2006).

La tasa de preñez en un tambo es el producto de la tasa de detección de celos por la tasa de concepción. La tasa de detección de celos es la relación entre los animales detectados en celo y el total de los que efectivamente están disponibles para ser inseminados. La tasa de concepción es el porcentaje de preñez obtenido sobre las que se sirvieron. Esto significa que la relación es factorial y si tuviéramos una eficiencia de detección de celos del 50 % y de concepción del 50 %, el porcentaje de preñez sería del 25% ( $50\% \times 50\% = 25\%$ ). Lamentablemente los datos de tasas de preñez están debajo del 25 % de tasa de preñez cada 21 días (Capitaine Funes *et al.*, 2003; 2007).

Una solución inmediata a la disminución de fertilidad en rodeos lecheros incluye el uso de intervención hormonal. Se ha desarrollado una serie de tratamientos hormonales para controlar el momento de la primera IA y las inseminaciones posteriores en vacas no preñadas y para el tratamiento de vacas en anestro. El objetivo de este trabajo es revisar la metodología básica que se utiliza para mejorar el desempeño reproductivo en animales lecheros manejado con diferentes sistemas de producción.

### **Sistemas de sincronización del celo y de la ovulación**

#### **Control de la actividad luteal mediante el uso de agentes luteolíticos**

Desde su utilización comercial como hormona interviniente en la lisis del cuerpo lúteo, sigue siendo la prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF) la hormona más utilizada en el mundo para sincronizar el celo en vacas de carne y leche. La respuesta a la administración de la PGF será diferente en los distintos estadios del ciclo estral (Momont y Seguin, 1984). Del día 1 al 5 no se observa respuesta dado que se ha producido la ovulación y el cuerpo lúteo está en desarrollo. En los días 6 y 7, la respuesta es parcial, se está llegando al final del desarrollo del cuerpo lúteo. Entre los días 8 y 17, el cuerpo lúteo está desarrollado y es sensible al efecto luteolítico de la PGF y, por último, entre los días 18 a 21, el cuerpo lúteo ya se encuentra en regresión y el animal entrará en celo aunque no inyectemos la PGF.

En función de los conocimientos de la respuesta luteal a la PGF, se diseñaron diferentes protocolos para agrupar o sincronizar los celos. De esta manera se desarrolló un protocolo de sincronización de celos (*Target Breeding*<sup>™</sup> o Reproducción Controlada) basado en un intervalo de 14 días entre las inyecciones de PGF (Ferguson y Galligan, 1983). Este protocolo se basa en tres administraciones de PGF, aplicando la primera de ellas 14 días previos al comienzo del servicio (dosis inicial). La segunda PGF (primera dosis de servicio), determina el comienzo de la detección de celo e IA. Luego de la última administración, se detecta celo e IA durante 3 días y a las 80 horas se realiza una IATF a toda hembra no detectada en celo (Nebel y Jobst, 1998). Actualmente se ha decidido alterar levemente este protocolo, obviando la utilización de la IATF debido a la baja fertilidad que se obtiene y se recomienda, como alternativa para las vacas que no fueron vistas en celo utilizar los protocolos de IATF que se describen más adelante en este artículo (revisado en Bó *et al.*, 2007).

#### **Control de la dinámica folicular y de la ovulación mediante el uso de la GnRH en combinación con PGF**

Diferentes hormonas pueden ser utilizadas para controlar la dinámica folicular, de manera que el folículo ovulatorio que se obtenga luego de implementar un tratamiento para controlar el ciclo estral provenga de un folículo joven, es decir originado en una reciente onda de crecimiento folicular. Como fue mencionado, los diferentes esquemas que utilizan a la PGF para sincronizar los celos, no controlan la dinámica folicular. En consecuencia, se recurrió al uso de la GnRH asociada a PGF para controlar la dinámica folicular, la actividad luteal y generar nuevos protocolos para controlar el ciclo estral.

La utilización de la GnRH para manipular el desarrollo folicular fue reportada originalmente por MacMillan y Thatcher (1991) y se basa en la inducción de un pico de LH y consecuentemente en la ovulación de un folículo dominante. Si la GnRH resulta en ovulación, se formará un cuerpo lúteo accesorio y a su vez comenzará una nueva onda de crecimiento folicular 2 ó 3 días después (Twagiramungu *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1999). Esto luego derivó en el desarrollo del protocolo llamado Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995). El tratamiento consiste en la administración de un análogo de la GnRH (para sincronizar el desarrollo folicular), seguido de una inyección de PGF 7 días después (para inducir la luteólisis), una inyección de GnRH 48 a 56 h después de la PGF (para sincronizar la ovulación) e IATF a las 15 h de la segunda GnRH.

Los porcentajes de preñez obtenidos con el protocolo Ovsynch en vacas lecheras varían entre 30% a 55%. Los resultados de preñez han sido similares a los obtenidos con inseminaciones realizadas a las 12 h de observado el celo (Burke *et al.*, 1996; De la Sota *et al.*, 1998; Pursley *et al.*, 1995, 1997; Stevenson *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 2001, 2006) y por esta razón es el protocolo más utilizado en USA para la inseminación de vacas en lactancia (Caravielo *et al.*, 2006).

A pesar que el tratamiento Ovsynch en vacas lecheras resultó en tasas comparables a las que se obtenían a celo detectado, se observó que la respuesta al tratamiento estaba ligada principalmente a la efectividad de la primera GnRH en inducir la ovulación del folículo dominante (Vasconcelos *et al.*, 1999). Para evitar la variabilidad en la respuesta se desarrolló un protocolo llamado Presynch en el cual los animales reciben una inyección de PGF 12 días antes de iniciar el protocolo Ovsynch o dos inyecciones cada 14 días, siendo la segunda de éstas administrada 12 días antes del inicio del protocolo (Moreira *et al.*, 2001). En general se ha encontrado una mejoría en la fertilidad de vacas en lactancia de 12 % a 14 % con este protocolo (Moreira *et al.*, 2001; Thatcher *et al.*, 2006). También se ha alterado el intervalo entre la PGF y la segunda GnRH y actualmente se sugiere administrar la GnRH a las 56 h de la PGF y realizar la IATF 12 a 15 h después.

#### Tratamientos utilizando dispositivos intravaginales con progesterona

Actualmente, existen varios dispositivos intravaginales con progesterona en el mercado internacional. Desde que se crearon estos dispositivos se han desarrollado protocolos de 7 u 8 días de duración. El tratamiento va a variar en las distintas regiones del mundo de acuerdo a la disponibilidad de los fármacos. Por ejemplo el tratamiento más utilizado en Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda (NZ hasta el año 2007) consiste en administrar 2 mg de EB al momento de la inserción del dispositivo (Día 0), remover el dispositivo en el Día 7 u 8 y administrar PGF. Veinticuatro horas después se administra 1 mg de EB para sincronizar la ovulación y la IATF se realiza a las 54-56 horas pos-remoción. Estos protocolos han sido utilizados por productores lecheros en diversas partes del mundo con porcentajes de preñez que oscilan entre el 35 y 55 %, encontrándose muy influenciado por la condición corporal, los días de lactancia y la producción de las vacas.

En las regiones del mundo donde los estrógenos no están autorizados como Norteamérica y Europa (desde Agosto del 2007 Nueva Zelanda) se utilizan los dispositivos con progesterona en asociación con el protocolo Ovsynch para mejorar la fertilidad de las vacas que todavía no han comenzado a ciclar al comienzo del período de servicio (llamadas vacas en anestro anovulatorio). El anestro es un problema común en los sistemas de producción lechera. Aproximadamente el 20 a 40 % de las vacas en sistemas de producción pastoril se encuentran en anestro al comienzo de la temporada de servicio (Rhodes *et al.*, 2003). En un estudio de vacas en los Estados Unidos, se encontró que el 28 % de las vacas primíparas y el 15 % de las multíparas no habían ovulado a los 60 días posparto (Gumen *et al.*, 2003). En el Reino Unido, el 11 % de las vacas no había ovulado a los 44 días posparto (Lamming and Darwash, 1998).

En un trabajo realizado por Pursley *et al.* (2001) los índices de concepción en vacas tratadas con Ovsynch + un dispositivo con progesterona fueron superiores a la de aquellas tratadas con Ovsynch (41 % vs. 51 %; n=634). Es interesante mencionar, que no hubo diferencias en los índices de concepción entre Ovsynch y el Ovsynch + progesterona en vacas que estaban ciclando. Sin embargo, los dispositivos con progesterona aumentaron notablemente los índices de preñez en vacas que no estaban ciclando (34,7 % vs. 55,2 %; n=182). Por lo tanto, la inclusión de un dispositivo con progesterona puede aumentar la fertilidad en vacas de leche en lactancia que no están ciclando.

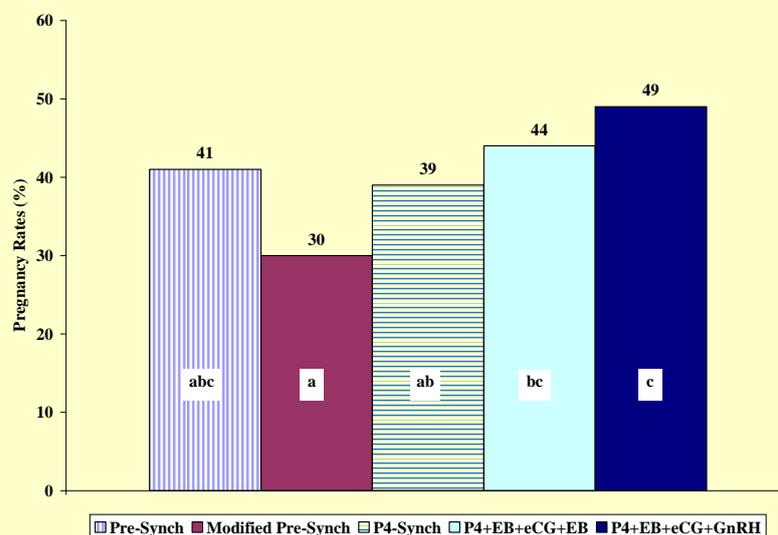
Se realizó un trabajo con el objetivo de evaluar el tratamiento con dispositivos con progesterona en combinación con GnRH para sincronizar vacas en lactancia (Veneranda *et al.*, 2006). Se utilizaron 400 vacas Holando Argentino pertenecientes a Los Lazos SA, en las localidades de Totoras, Sta. Fe y El Fortín, Córdoba. Los animales utilizados tenían una CC promedio de  $3,0 \pm 0,25$  (Escala 1-5), con  $58,0 \pm 11,6$  días en leche y una producción promedio de  $31,1 \pm 6,6$  litros diarios. Las vacas fueron distribuidas al azar y en función de los datos anteriormente descriptos en 4 grupos de tratamiento en un diseño 2x2 factorial. La mitad de las vacas recibieron un dispositivo con progesterona (DIB, 1 g de progesterona, Syntex SA) por 7 días, junto con la aplicación de una dosis de GnRH en el momento de colocado el dispositivo y una segunda dosis a las 48 h de retirado el dispositivo. Se aplicó una dosis de PGF cuando se sacó el dispositivo y las vacas fueron IATF a las 60 h de retirado el dispositivo. La otra mitad de los animales recibieron un DIB por 8 días combinado con 2 mg de EB en el momento de la inserción. Se aplicó una dosis de PGF en el momento del retirado el dispositivo y 1 mg de EB 24 h más tarde. Todos los animales fueron IATF a las 60 h retirado el DIB. Cada grupo (P4+EB o P4+GnRH) fue subdividido para recibir o no 400 UI de eCG (Novormon, Syntex, Argentina) en el momento de retirado el dispositivo. Los diagnósticos de preñez se realizaron por palpación rectal entre los 45 y 50 días pos-IATF. Los porcentajes de preñez fueron comparados por regresión logística. Se obtuvo un mayor porcentaje de preñez en las vacas tratadas con eCG y EB que en las no tratadas con EB (44,9 vs 30,0 %, respectivamente) y los tratamientos con GnRH no difirieron significativamente (GnRH 37,0% y GnRH+eCG 30,0 %).

A partir de la obtención de estos resultados, realizamos un segundo experimento con el objetivo de determinar si la diferencia numérica encontrada en los tratamientos P4+EB+eCG y P4+GnRH (sin eCG) se mantenía. Como objetivo secundario de este segundo experimento se compararon las tasas de preñez obtenidas con un dispositivo intravaginal DIB y un CIDR (Pfizer, Salud

Animal, 1,9 g de progesterona). En este experimento se utilizaron 200 vacas Holstein en lactancia, de características similares a las del experimento anterior. Se utilizó un diseño 2x2 factorial. Inicialmente las vacas se dividieron al azar en dos grupos de tratamiento (EB+eCG o GnRH) y las vacas fueron IATF a las 60 h de retirado el dispositivo y el diagnóstico de preñez se realizó a los 50 días de la IATF por palpación rectal. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez ( $P=0,4$ ) entre las vacas en la que se utilizó un DIB (51 %) o CIDR (42 %), a su vez las tasas de preñez no difirieron ( $P=0,18$ ) entre las vacas tratadas con EB+eCG (52,0 %) o GnRH. (41,0 %). Sin embargo si sumamos los datos de los dos experimentos las tasas de preñez en las vacas del tratamiento utilizando EB+eCG es significativamente mayor.

Debido a que el tratamiento de pre-sincronización ha mostrado un incremento en la tasa de preñez de los protocolos Ovsynch (Moreira *et al.*, 2001), Se diseñó un experimento para comparar las tasas de preñez en vacas tratadas con un programa pre-synch modificado con los tratamientos evaluados en los trabajos anteriores (P4+EB+eCG y P4- synch) (Veneranda *et al.*, 2008). Se utilizaron 500 vacas del mismo establecimiento que los estudios anteriores. Los animales utilizados estaban entre 30 y 51 d postparto (cuando se le aplicó el tratamiento con PGF al grupo pre-synch), con una producción de leche promedio de  $29,5 \pm 7,0$  Kg diaria (rango de 13,0 a 46,0 Kg) y una CC entre 2,5 y 3 de escala 1-5. Las vacas se agruparon por los días postparto y se asignaron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento. El grupo Pre-synch recibió PGF 28 y 14 días antes de la inserción del dispositivo DIB y 50  $\mu$ g de Lecirelina (GnRH) i.m. (Día 0). El Día 7 se removió el dispositivo y se aplicó PGF. El día 9, todas las vacas recibieron un segundo tratamiento con GnRH y fueron IATF 16 h más tarde (60 de retirado el dispositivo). Los animales del grupo pre-synch+P4 fueron tratados de manera similar excepto que recibieron el dispositivo durante 7 días anteriores a la segunda inyección de PGF, y no tenían el dispositivo cuando se inyectó la primera GnRH. Las vacas en el grupo P4-Synch fueron tratadas como las del grupo pre-synch pero no recibieron las dos dosis de PGF 28 y 14 días antes. Las vacas de los dos últimos grupos recibieron un DIB y 2 mg de EB el Día 0. El Día 8, se removió el dispositivo y se inyectó PGF y 400 UI eCG IM. Las vacas del grupo P4+EB+eCG+EB recibieron 1 mg de EB el día 9, mientras que las del grupo P4+EB+eCG+GnRH recibieron GnRH el día 10. Todas las vacas fueron IATF 60 h de removido el dispositivo. El diagnóstico de preñez se realizó a los 50 días de la IATF por palpación rectal y los datos fueron analizados por regresión logística.

Como muestra la Figura 1, los dos grupos tratados con P4, EB y eCG tuvieron las mayores tasas de preñez y el grupo en el cual el dispositivo fue insertado antes de las segunda PGF (Pre-synch+P4) tuvo la menor tasa de preñez. Las tasas de preñez de los otros grupos fueron intermedias y no tuvieron diferencias con los extremos.



**Figura 1.** Tasas de preñez de vacas en lactancia tratadas con diferentes protocolos de IATF. Los porcentajes con letras diferentes tienen diferencia significativa ( $P<0,05$ )

Los resultados de estos experimentos sugieren que la adición de eCG incrementaría las tasas de preñez con IATF en vacas lecheras en ordeño en sistemas mixtos. Cuando se toman los tres experimentos juntos, las tasas de preñez son significativamente mayores ( $P<0,008$ ) en el tratamiento P4+EB+eCG (145/298; 48,7 %) que en el tratamiento Pre-synch (117/298; 39,3 %). A la inversa, eCG no incrementó las tasas de preñez en las vacas que recibieron GnRH en el momento de inserción del dispositivo con progesterona, esto probablemente se deba a las diferentes dinámicas foliculares entre vacas

tratadas con EB y las tratadas con GnRH. Es necesario realizar estudios para investigar el intervalo más apropiado entre la administración de GnRH y el tratamiento con eCG en vacas lecheras en lactancia.

Además de los resultados observados en los sistemas mixtos de Argentina, el tratamiento de vacas lecheras con eCG junto con dispositivos con progesterona y EB ha sido también estudiado en un sistema de producción intensivo en Brasil y en sistemas estacionales de Argentina y Nueva Zelanda. El objetivo del estudio realizado en Brasil fue evaluar los efectos de la eCG y ciproionato de estradiol (ECP) sobre el pico de la LH y la tasa de concepción en vacas Holstein de alta producción sincronizadas con protocolos para IATF (Souza *et al.*, 2009). Las vacas estaban produciendo  $36.2 \pm 0.4$  Kg/día con  $151,6 \pm 3.5$  días en lactancia. El mismo tratamiento hormonal fue utilizado en 22 tambos (intensivos). El Día 0, todas las vacas recibieron 2 mg de EB (Estrogin, Farmavet, Brasil) y un dispositivo de progesterona (CIDR, Pfizer Animal Health, Brasil). El Día 8, se removieron los CIDR y se inyectó PGF (Lutalyse, Pfizer Animal Health, Brasil). Las vacas fueron aleatoriamente asignadas a 1 de los 4 grupos de tratamientos. Grupo 1: eCG (400 UI; Folligon, Intervet, Brasil) + ECP (1 mg) el Día 8; Grupo 2: eCG el día 8 + GnRH (Fertagyl, Intervet, Brasil) a las 48 h; Grupo 3: ECP (1 mg) el Día 8 y Grupo 4: GnRH a las 48 h. En la fase I (n=31), se realizó ultrasonografía cada 12 hs y se tomaron muestras de sangre cada 4 hs desde las 30 h a las 60 h de removido el CIDR. En la fase II, un estudio a campo (n=782) fue realizado con los mismos tratamientos hormonales. Todas las vacas fueron inseminadas 56 a 58 luego de remover el CIDR. Se realizó el diagnóstico de preñez 30 a 40 días después de IATF mediante ultrasonografía. A pesar del uso de diferentes drogas para inducir la ovulación al final de los tratamientos hormonales (EPC vs GnRH), no hubo diferencias en las características del pico preovulatorio de LH entre los grupos experimentales (media  $43,5 \pm 1,5$  h de removido el CIDR). Las tasas de preñez en el Grupo 1 (29,1%), Grupo 3 (30,9%) y Grupo 4 (28,9%) no difirieron. En contraste, las vacas del Grupo 2 tuvieron una mayor tasa de preñez (33,8%) que las del Grupo 4 ( $P=0,02$ ). Además, las diferencias en las tasas de preñez fueron más evidentes entre las vacas con la menor CC ( $<2,75$ ); éstas fueron mayores en las vacas tratadas con eCG (44,4%) que en las no tratadas con eCG (6,1%;  $P<0,05$ ). Por el contrario, las tasas de preñez no difirieron en las vacas con  $CC >2,75$  y tratadas (32,1%) o no tratadas (33,5%) con eCG. Estos resultados sugieren que la eCG incrementa la tasa de preñez en vacas de alta producción, especialmente en aquellas con baja CC.

Otro experimento fue realizado en un tambo, con partos estacionados en Argentina (Mian, 2007). Se utilizaron vacas (n=81) Holstein y Holstein x Jersey con una CC de  $2,7 \pm 0,3$  (escala 1 a 5), produciendo  $21,8 \pm 5,1$  kg de leche y  $132,8 \pm 86,2$  días en lactancia. Se formaron grupos según días en lactancia y se asignaron aleatoriamente a 1 de los 2 grupos de tratamientos. El Día 0, las vacas recibieron un DIB y 2 mg de EB i.m. El día 8, se removieron los DIB; se inyectó PGF y se subdividieron los grupos para recibir 400 UI eCG o no ser tratadas en ese momento. El Día 9, todas las vacas recibieron 1 mg de EB y fueron IATF 54 a 56 h luego de removido el dispositivo. Con el fin de hacer el diagnóstico de preñez, las vacas se examinaron 35 d después de la IATF con ultrasonografía. La tasa de preñez fue significativamente mayor en las vacas tratadas con eCG (21/46, 45,6 %) que en las no tratadas con eCG (8/35, 22,8%;  $P<0,05$ ).

Finalmente, se diseñó un experimento en Nueva Zelanda para comparar la respuesta reproductiva de vacas lecheras en un sistema pastoril con partos estacionados (Bryan *et al.*, 2010). Las vacas estaban en anestro anovulatorio, diagnosticado por palpación rectal. Se asignaron dos tratamientos. Se realizó el experimento en 6 tambos comerciales. Se les pinto la cola a todas las vacas por 3 semanas y fueron seleccionadas aquellas que no manifestaron comportamiento de celo con ausencia de CL determinada por palpación rectal 7 días antes del estipulado para comenzar con la aplicación (PSM). Todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal con 1,56 g de progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health) por 8 d, y 2 mg de EB en ese mismo momento (Día 0) y 1 mg de EB 24 h después de remover el dispositivo (Día 9). Aproximadamente la mitad de las vacas fueron asignadas, aleatoriamente, para recibir 400 UI de eCG (Pregnecol, Bioniche Animal Health) el día de la remoción del dispositivo (Día 8). Todas las vacas fueron observadas y fueron IA 12 h después del celo, las que no manifestaron celo fueron IATF a las 36 h de la dosis de EB (60 hs de removido el dispositivo). Los resultados considerados fueron tasa de concepción en las primeras 48 h, y tasa de preñez a los 7 y 28 días. Las vacas tratadas con eCG fueron las que mejor concibieron en las primeras 48 h (eCG: 48,9%; n = 432 vs No eCG: 43,1 %; n = 420;  $P = 0,059$ ); y tuvieron una mayor tasa de preñez a los 7 días de finalizado el tratamiento (eCG: 47,3 %; n = 488 vs No eCG: 41,7%; n = 503;  $P = 0,073$ ). El efecto de la eCG fue mayor en vacas con más de 5 años de edad, dado que las mismas tuvieron significativamente más posibilidad de concebir dentro de 48 h ( $P = 0,003$ ; RR 1,52; 95% CI: 1,15 a 2,01) o dentro de 7 días ( $P = 0,002$ ; RR 1,44; 95% CI: 1,42 a 1,82). Además, las vacas mayores a 5 años tratadas con eCG tuvieron significativamente más probabilidad de estar preñadas a las 4 semanas ( $P = 0,02$ ; RR 1,21; 95% CI: 1,03 a 1,43). Se concluyó que agregar 400 UI de eCG el día 8 al régimen estándar de progesterona y EB, incrementa la probabilidad de preñez dentro de 48 h y 7 días, especialmente en vacas con más de 5 años de edad. Este experimento es particularmente importante en tambos con servicio estacionado, donde es esencial que las vacas conciban dentro de los primeros 90 días postparto, para lograr el objetivo de un ternero anual. Las tasas de anestro en algunos rodeos pueden llegar a ser altas y un incremento del 5 % en la tasa de concepción, adicionando eCG, es de mucha importancia.

**Tratamientos con eCG en programas Ovsynch en rodeos lecheros estacionales**

Como se mencionó anteriormente, en varios países el uso de esteroides de estradiol en combinación con dispositivos de liberación de progesterona ha sido el tratamiento de elección para sincronizar el estro en vacas de carne y leche, especialmente en anestro posparto. Sin embargo, su uso se ha restringido recientemente en países como USA, Nueva Zelanda y la Unión Europea. Esta restricción ha creado un serio dilema y la necesidad de desarrollar tratamientos que no impliquen el uso de esteroides de estradiol.

La opción más obvia fue evaluar el uso de los programas de sincronización con GnRH, con o sin la adición de un dispositivo liberador de progesterona, para el tratamiento del anestro posparto. En un estudio reciente, la proporción de vacas lecheras en anestro que concibió a un programa Ovsynch fue significativamente menor a la obtenida en un programa Ovsynch combinado con la inserción de un dispositivo liberador de progesterona entre la primera inyección de GnRH y en el momento de la PGF (33,9 % vs 45,7 %, respectivamente; McDougall 2008). Sin embargo, esta diferencia inicial no se mantuvo después que las vacas no preñadas a la primera IA retornaron al celo, ya que no se encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez en 21 días y 42 días de comenzado el servicio.

Se realizó un trabajo para evaluar el efecto de la adición de eCG a los programas de sincronización con GnRH en vacas en anestro anovulatorio (Bryan *et al.*, 2009). Vacas de quince establecimientos lecheros de Nueva Zelanda (n = 1991) fueron seleccionadas para su inclusión en base a no haber presentado celo por 7 días antes del comienzo del servicio (PSM) y con diagnóstico de anestro anovulatorio mediante la palpación rectal en el comienzo del experimento. Las vacas fueron incluidas para el tratamiento de acuerdo con el protocolo del ensayo (2 x 2 factorial). En el Día 0, todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal Cue-Mate y una inyección de 100 µg gonadorelina (1 ml Ovurelin, Bomac Laboratories, Nueva Zelanda) y fueron asignadas al azar para que el dispositivo fuera retirado y se inyectaran 500 µg de cloprostenol (Ovuprost, Bomac) en los Días 6 ó 7. Dentro de cada grupo las vacas fueron nuevamente subdivididas para recibir 400 UI de eCG (Pregnenol) o no recibir eCG (control). Todas las vacas fueron inseminadas 12 horas después de la observación del celo y las que no se detectaron en celo, recibieron una segunda inyección de gonadorelina entre 52 y 70 h después de la remoción del dispositivo Cue-Mate y fueron IATF a las 72 horas después de sacar el dispositivo. Los parámetros considerados fueron el porcentaje de vacas preñadas en los primeros 7 y 28 días de la estación servicio y los días a la concepción. No hubo diferencias significativas entre los programas 6 ó 7 días y no hubo interacción entre la duración del tratamiento y el tratamiento con eCG. Sin embargo, la inclusión de la eCG en ambos grupos aumentó significativamente la tasa de preñez a los 7 (P = 0,046) y 28 días de la estación de servicio (P = 0,008) y disminuyó significativamente la mediana de días a la concepción (P = 0,005). En general, el tratamiento con eCG aumentó la tasa de preñez a los 28 días de servicio del 50,4 % a 56,2 %. Estos resultados confirman que la adición de eCG en protocolos de sincronización para las vacas en anestro tiene un valor significativo para conseguir más vacas preñadas al inicio de la temporada de servicio.

Más recientemente, se ha utilizado eCG en un rebaño estacional en Australia. Bajo las condiciones de Australia, el protocolo GPG (Ovsynch) ha resultado en tasas de concepción del 25-40 %, que se considera bajo por muchos productores y veterinarios. Se ha demostrado que el tamaño del folículo influye en las tasas de preñez y la supervivencia de los embriones (Gumen *et al.*, 2003, Vasconcelos *et al.*, 2001). Bello *et al.* (2006) demostraron que el tamaño del folículo en el momento de la segunda GnRH en un programa de GPG era un predictor significativo de la probabilidad de preñez 35 días después de la IA. Los mecanismos por los cuales la eCG podría aumentar la fertilidad en un programa de GPG incluyen el aumento del tamaño del folículo ovulatorio y de la capacidad de ovular después de la segunda GnRH. Beggs y Kelly (2010) plantearon la hipótesis que la adición de eCG a un programa estándar de GPG podría mejorar las tasas de preñez de una forma rentable cuando se utiliza para sincronizar todo el rebaño de vacas lecheras al comienzo de la estación de servicios. Todas las vacas que parieron más de 30 días antes del comienzo de la IA se incluyeron en el estudio (n = 508). Las vacas se dividieron en grupo control (n = 255) y tratamiento (n = 253). Todas las vacas recibieron 100 µg de GnRH en el Día 0, PGF en el Día 7, 100 µg de GnRH el Día 9. Las vacas fueron inseminadas siguiendo la regla AM / PM si se observaban en celo y los que no se observaron en celo fueron IATF por la mañana el Día 10 (12 h después de la segunda GnRH) y fueron inseminadas en ese momento. Las vacas del grupo de tratamiento recibieron 400 UI de eCG (Pregnenol) en el momento de la inyección de PGF en el Día 7. En el momento de la primera inyección de GnRH, las vacas fueron clasificadas, en las que se encontraban ciclando o en anestro sobre la base de la pintura en la cola (no por palpación rectal). Las tasas de preñez fueron determinadas por ultrasonido, tanto entre las 7 y 14 semanas después de la IATF. El tratamiento con eCG tendió a aumentar la tasa de preñez (P=0,11) al primer servicio (28,2 % vs 34,8 %, n = 508) y este efecto fue significativo (P <0,05) en vacas de más de 5 años de edad (18,7 % vs 33,8 % n = 140). Sin embargo hubo un aumento estadísticamente significativo de la preñez a los 25 días de haberse comenzado el servicio en un 28% (41,2 % a 52,6 %) y a las 6 semanas del comienzo del servicio en casi el 25 % (47,5 % a 58,9 %). Este estudio es importante,

ya que también demostró un aumento significativo la tasa de preñez a las 6 semanas de haberse comenzado el servicio en un 19% (55,1 % a 65,8 %, n = 233) debido al uso de eCG en vacas que estaban en ciclando en el momento del tratamiento.

Parece que la eCG tuvo un efecto positivo no sólo sobre la tasa de concepción al primer servicio, pero también en la tasa de retorno de las vacas que no concibieron a la primera inseminación. Esto resultó en un aumento del número de vacas preñadas para el Día 25 de comenzado el servicio. También parece que las vacas más viejas y las vacas que estaban con un menor período post-parto pueden recibir un mayor beneficio por el uso de la eCG, un hallazgo reportado previamente por Bryan *et al.* (2010). Aunque puede haber beneficios, los resultados de este estudio piloto deben ser interpretados con precaución. Se debe comprobar todavía si la adición de un dispositivo liberador de progesterona en el presente protocolo permite tener un beneficio adicional, especialmente en las vacas que no ciclan o que están en el periodo post-parto temprano.

#### **Aplicación de eCG en programas Ovsynch en rodeos lecheros de parición continua**

Se realizaron dos experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de eCG en protocolos Ovsynch con dispositivos con progesterona sobre la dinámica folicular y luteal y las tasas de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia. En el experimento 1, se utilizaron 40 vacas Holando Argentino con  $65,0 \pm 3,6$  días en lactancia, una condición corporal de  $2,9 \pm 0,1$  (escala del 1 al 5) y produciendo  $32,3 \pm 3,1$  litros de leche. En el Día 0, todas las vacas recibieron un dispositivo Cue-Mate más 0.05 mg de Lecirelina (GnRH, Biosin-OV, Biotay, Argentina). En el Día 6 se dividieron las vacas en dos grupos, a las cuales se les extrajo el Cue-Mate y aplicó 0.15 mg de D (+) cloprostenol (PGF, Bioprost-D, Biotay) en ese mismo momento (Grupo 6 días) o 24 h después (Grupo 7 días). A su vez, cada grupo fue subdividido (2 x 2 factorial) para recibir o no recibir 400 UI de eCG (Pregnenol) en el momento de la remoción del Cue-Mate. Todas las vacas recibieron una segunda GnRH a las 56 h del retiro del Cue-Mate. Las vacas fueron examinadas diariamente desde el Día 0 al día de la aplicación de la segunda GnRH por ultrasonografía transrectal para determinar la tasa ovulatoria a la primera GnRH. Luego se hizo ultrasonografía cada 8 h para determinar las características del folículo preovulatorio. Se tomaron muestras de sangre con heparina para la determinación de progesterona por RIA (DPC Diagnostics Corp., USA). En Día 0, 32/40 de las vacas se encontraban con un CL. La ovulación a la primera GnRH fue de 75 % (30/40), sin diferencias entre los grupos ( $P=0,45$ ). Tampoco hubo diferencias entre las vacas tratadas o no con eCG en las características del folículo ovulatorio ( $17,1 \pm 0,4$  mm vs  $16,2 \pm 0,5$  mm;  $P>0,14$ ) y la fase luteal ( $7,6 \pm 0,5$  vs  $7,1 \pm 0,5$  ng/mL de progesterona;  $P>0,6$ ). En el experimento 2, se utilizaron 453 vacas en lactancia del mismo establecimiento de las utilizadas en el experimento 1. Las vacas fueron ubicadas al azar en los mismos grupos de tratamiento. Todas las IATF fueron realizadas a las 72 h de la remoción del Cue-Mate y la tasa de preñez fue diagnosticada por ultrasonografía a los 30-45 días de la IATF. En este caso las vacas sincronizadas con el tratamiento de 7 días se preñaron más (86/227; 38 %) que las sincronizadas por el tratamiento de 6 días (61/226; 27 %;  $P<0,01$ ). Sin embargo no hubo diferencias entre las vacas tratadas con eCG (75/227; 33 %) y las no tratadas con eCG (72/226; 32 %;  $P>0,8$ ). Los resultados de este trabajo no mostraron efectos significativos de la adición de eCG en un protocolo Ovsynch con dispositivos con progesterona en vacas Holando Argentino cíclicas y con una mayor producción de leche que las vacas utilizadas en los rodeos estacionales en Australia y Nueva Zelandia.

#### **Re-sincronización de los celos y ovulaciones**

Todos los programas de sincronización de la ovulación descriptos hasta este momento en esta revisión requieren la detección de celos para que los animales puedan ser re-inseminados, sin embargo como es sabido, existe una gran cantidad de animales que no son detectados en celo lo cual disminuye las tasas de preñez finales obtenidas por la implementación de estos protocolos. Frike *et al.* (2003) evaluaron un programa de re-sincronización (GnRH en el día 0; PGF en el día 7 y GnRH+IATF en el día 9) que se inició el día 19, 26 o 33 días luego del primer servicio IATF de animales tratados con Presynch/Ovsynch. Esto se implementó para inducir una segunda IATF para las vacas vacías a la primera IATF. A pesar de que la administración de GnRH a las vacas preñadas a los 19 días luego de la IATF no pareció inducir pérdida embrionaria iatrogénica, la iniciación de re-sincronización a los 19 días luego de la primer IATF resultó en tasas de preñez inferiores (23 %) comparadas con los tratamientos de re-sincronización iniciados el día 26 (34 %) o 33 (38 %). Lo importante aquí es que todas las vacas vacías a la primera IA son re-inseminadas en un período corto de tiempo.

Alternativamente se pueden utilizar protocolos que incluyen la re-utilización de un dispositivo con progesterona entre los Días 13 a 21 después de la primera IATF, con la administración de 1 mg de EB en el momento de la inserción y 24 h después de la remoción y detección de celo e IA (Capitaine Funes *et al.*, 2007, Cavalieri *et al.*, 2006). Estos protocolos son muy efectivos con una buena detección de celos pero si esta es mala deben utilizarse otros protocolos de re-IATF. Un protocolo evaluado recientemente consiste en la inserción de un dispositivo con progesterona de segundo uso en el Día 16 pos IATF y una dosis de GnRH en el Día 21, momento en el que se retira el dispositivo En el Día 28 se realiza ultrasonografía para diagnóstico de preñez y las vacías reciben una dosis de PGF. Luego se administra GnRH nuevamente a las 48 o 56 h de la PGF y se realiza la segunda

IATF a las 12 a 15 h de la GnRH. El protocolo se puede repetir nuevamente a los 16 días pos 2da IATF con un dispositivo de 3er uso. Si el veterinario y productor no encuentran con confianza de hacer una ecografía a los 28 y prefieren hacerla a los 30 días por ejemplo, hay que postergar la remoción del dispositivo y la administración de la primera GnRH al Día 23 y después respetar los mismos intervalos entre el resto de las hormonas. Es decir, se debe mantener un intervalo de siete días entre la primera GnRH y la PGF.

#### **Utilización de los programas reproductivos sistemáticos por los productores de distintas partes del Mundo.**

Los sistemas de producción varían internacionalmente debido a las diferencias de entornos físicos, razas, mano de obra, economía, infraestructura disponible y el entorno regulador. Estas diferencias afectan el desempeño reproductivo actual, la economía de las tecnologías reproductivas y sus futuros requisitos para la tecnología reproductiva. La economía de los sistemas pastoriles depende del patrón de parición y de la proporción de descartes involuntarios (es decir, no preñadas). El manejo reproductivo en sistemas pastoriles se ha concentrado en asegurar patrones de parición óptimos. La inducción de la lactancia (a través de la inducción del aborto o parto) y el tratamiento agresivo del anestro son estrategias características de manejo en rodeos pastoriles. Sin embargo, los productores Neozelandeses deberán enfrentar el desafío de ser más eficientes en preñar las vacas lo más rápido posible, debido a que en un futuro cercano no podrán inducir más los abortos o partos, salvo que sea por causas estrictamente médicas, con el debido reporte veterinario. Por otro lado, el creciente aumento de número de vacas en los tambos (ya hay tambos de 2000 y 3000 vacas en Nueva Zelandia) y el aumento de la producción de leche de las vacas hace que la tasa de detección de celos se afecte mucho.

Con respecto a los tratamientos que se utilizan dependen de la disponibilidad y aprobación. Por ejemplo, el benzoato de estradiol se utilizaba activamente en NZ hasta el 2007 y no está registrado en la Unión Europea ni en USA. En Nueva Zelandia y Australia se han utilizado dispositivos intravaginales que liberan progesterona en vacas en lactancia durante más de 15 años, pero los dispositivos fueron aprobados recientemente para ganado de leche en los Estados Unidos. Además, existen diferencias en los precios entre los mercados, con lo cual se altera la relación costo-beneficio. Además, las preocupaciones de los consumidores sobre las intervenciones hormonales para el manejo reproductivo aumentan y presionan a los políticos para reducir su uso en animales de producción.

En Australia, la intervención hormonal parece depender de las condiciones económicas y estacionales (Cavaliere *et al.*, 2006). Mientras el rodeo nacional aumentaba se impuso una prima para vacas preñadas y muchos productores utilizaron tratamientos de sincronización. La sequía y la reducción de los precios de la leche llevaron posteriormente a una reducción de la cantidad de animales lecheros y los niveles de intervención hormonal. La tendencia en Australia durante esos años fue simplificar las áreas relacionadas con la reproducción y reducir el gasto. Esto significa que se utilizaban más los programas de PGF (especialmente desde la distribución de la PGF genérica que es menos costosa) y que una mayor intervención hormonal quedaba restringida a vacas que se les había diagnosticado una anormalidad (como anestro o enfermedad de ovario quístico). Actualmente las cosas pueden llegar a cambiar ya que el precio de la leche ha aumentado considerablemente. La tendencia a la PGF no es tan evidente en Nueva Zelandia pero coincide con Australia en que sólo se tratan las vacas anormales (generalmente en anestro anovulatorio). El uso de dispositivos de progesterona es más común en Nueva Zelandia donde se prefiere un sistema de producción estacional y el costo de las demoras en las preñeces es alto. Australia también es gran usuario de dispositivos de progesterona, pero las vacas australianas que no quedan preñadas son "mantenidas" hasta el periodo de servicio siguiente o se las descarta del rodeo.

Los problemas reproductivos son algo diferentes en los rodeos estabulados de USA, Canadá y México. La expresión y detección de celo son grandes problemas. Además, la tasa de concepción después de la IA puede ser de sólo 30-40 %. El efecto neto de bajos índices de inseminación y bajas tasas de concepción son bajas tasas de preñez. Esto ha tenido como consecuencia una alta tasa de adopción de los protocolos de IATF sistemática (Ovsynch, Pre-Synch y Ovsynch con dispositivos con progesterona), especialmente en USA y México donde los tambos son mas grandes (hay de más de 12000 vacas en ordeño en el norte de México). Sin embargo, muchas veces los productores asumen cuestiones erróneas con respecto a la tecnología de IATF. Muchos productores compran la tecnología creyendo que están comprando una herramienta para mejorar la fertilidad. Suelen estar equivocados ya que los resultados son similares a lo que podrían haber esperado con una buena detección de celo. Por el contrario los productores inteligentes reconocen que no compran un sistema para mejorar la fertilidad. Están comprando un sistema que asegura resultados parejos y que permite la asignación productiva de los escasos recursos aptos. La intervención hormonal podría mejorar los resultados por poder implementarse cuando escasea la mano de obra o cuando no es posible dedicar el tiempo necesario para la detección de celo. Estas cuestiones, especialmente el tema de la mano obra, es un tema recurrente en la mayoría de los países del mundo desarrollado, donde los nativos de esos países no desean trabajar en las

actividades agropecuarias y dejan esos trabajos para inmigrantes (legales o ilegales) que muchas veces no tienen experiencia alguna con las actividades pecuarias y tienen claras dificultades de comunicación por no conocer el idioma.

### Conclusiones

Una mayor producción de leche en vacas modernas ha llevado a tasas reducidas de concepción y a una mayor demanda de nuevas herramientas para el manejo de la reproducción. En el futuro, los programas de manejo reproductivo deberán adaptarse a cada establecimiento. La tendencia es que los rodeos sean cada vez más grandes, la mano de obra menos capacitada y los márgenes de ganancia más pequeños. Por lo tanto la necesidad de capacitación y tecnificación será crítica para tener éxito. La investigación del control hormonal del ciclo estral y, específicamente, los patrones de ondas foliculares ha mejorado la base de conocimiento para el desarrollo de los programas de sincronización y posibilitado una estrecha sincronía entre el celo y la ovulación. Probablemente, la evolución de los programas recomendados continúe mientras aumenta el conocimiento básico y se vislumbran nuevos enfoques. Indudablemente mantenerse informado y bien asesorado es la clave del éxito.

### Referencia Bibliográfica

- Beggs, D.S., Kelly, J.C. 2010. Pilot Trial - The effect of eCG given as part of an Ovsynch protocol in a whole herd synchrony program on a seasonal calving herd in Victoria. *The Australian Cattle Veterinarian*, 14-26.
- Bello, N., Steibel, J., Pursley, J. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 89:3413-342.
- Bó, G.A., Cutaia, L.E., Souza, A.H., Baruselli, P.S. 2007. Systematic Reproductive Management in Dairy Herds. *New Zealand Veterinary Association (NZVA) Conference 2007*, Dairy Cattle Conference, Christchurch, New Zealand (disponible on line en SciQuest), p. 155-168.
- Bryan, M.A., Bó, G.A., Emslie, R., Mapletoft, R.J. 2009. Efecto del tratamiento con eCG en vacas lecheras en anestro tratadas con protocolos con GnRH y dispositivos con progesterona por 6 o 7 días. *En: VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba, Argentina (Ed. D. Moreno and G.A. Bó) Instituto de Reproducción Animal Córdoba, CD.
- Bryan, M.A., Bó, G.A., Heuer, C., Emslie, F.R. 2010. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronized AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 126-131.
- Burke, J.M., De la Sota R.L., Risco, C.A., Staples, C.R., Schmitt, E.J-P., Thatcher, W.W. 1996. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 8: 1385-1394.
- Capitaine Funes, A., Vater, A., Acosta, N. 2003. Análisis reproductivo de rodeos lecheros usuarios del Dairy Comp 305. *Taurus* 17: 14-28.
- Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Fricke, P.M., Wiltbank, M.C., Florent, M.J., Cook, N.B. 2006. Survey of management practices related to the reproductive performance of dairy cattle on large commercial farms in the United States. *J. Dairy Sci.* 89: 4723-4735.
- Cavaliere, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L.A., Shepard, R.W., Macmillan, K.L. 2006. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65: 45-64.
- De la Sota, R.L., Risco, C., Moreira, F., Thatcher, W.W. 1998. Efficacy of a timed insemination program in lactating dairy cows during summer heat stress. *Theriogenology* 49: 761-770.
- Eicker, S., Stewart, S., Rapnicki, P. 2000. Dairy Herd Reproductive Records. *ABS Technical service Symposium*, Madison, WI. USA.
- Ferguson, J.D., Galligan, D.R. 1983. Prostaglandin synchronization programs in Dairy Herds. Part I, *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 15: 646-655.
- Fricke, P.M., Caraviello, D.Z., Wiegler, K.A., Welle, M.C. 2003. Fertility in dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J. Dairy Sci.* 86: 3941-3950.
- Gumen, A.J., Guenther, M., Wiltbank, M.C. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 3184-3194.
- Lamming, G.E., Darwash, A.O. 1998. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 175-190.
- Lucy, M.C. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will it End? *J. Dairy Sci.* 84: 1277-1293.
- Lucy, M.C., McDougall, S. Nation, D.P. 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.
- Macmillan, K.L., Henderson, H.V. 1984. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin F<sub>2</sub>α to estrus as a method of studying patterns of follicle development during diestrous in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 6: 245-254.

- Macmillan, K.L., Peterson, A.J. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 1-25.
- Macmillan, K.L., Burke, C.R. 1996. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 307-320.
- Macmillan, K.L., Taufa, V.K., Day, A.M. 1997. Manipulating ovaries follicle wave patterns can partially synchronise returns to service and increases the pregnancy rate to second insemination. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 57: 237.
- Macmillan, K.L., Colson, D.D., Eagles, V.M. 1999. Modifications to improve whole herd synchrony programs in seasonal dairy herds. *Proc. Australian Assoc. of Cattle Vets*, p. 121-129.
- McDougall, S. 2008. Effects of treatment of 'not-detected in oestrus' cows with gonadotrophin releasing hormone, prostaglandin and progesterone. *Proc. of the Society of Dairy Cattle Vets*, New Zealand, p. 35-50.
- Momont, H.W., Seguin, B.E. 1984. Influence of the day of estrous cycle on response to PGF<sub>2</sub> $\alpha$  products: Implications for AI programs for dairy cattle. *10th International Congress on Animal Reproduction* 3: 336.
- Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C.A., Mattos, R., Lopes, F., Thatcher, W.W. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 1646-1659.
- Nebel, R.L., Jobst, S.M. 1998. Evaluation of Systematic Breeding Programs for Lactating Dairy Cows: A Review. *J. Dairy Sci.* 81: 1169-1174.
- Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- Pursley, J.R., Kosorok, M.R., Wiltbank, M.C. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronized ovulation. *J. Dairy Sci.* 80: 301-306.
- Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A., Anderson, L.L. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80: 295-300.
- Pursley, J.R., Fricke, P.M., Garverick, H.A., Kesler, D.J., Ottobre, J.S., Stevenson, J.S., Wiltbank M.C. 2001. NC-113 Regional Research Project. Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. Midwest Branch *ADSA 2001 Meeting*, Des Moines, IA; 63.
- Rhodes, F.M., McDougall, S., Burke, C.R., Verkerk, G.A., Macmillan, K.L. 2003. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrus interval. *J. Dairy Sci.* 86: 1876-1894.
- Souza, A.H., Viechnieski, S., Lima, F.A., Silva, F.F., Araujo, R., Bó, G.A., Wiltbank, M.C., Baruselli, P.S. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72: 10-21.
- Stevenson, J.S., Kobayashi, Y., Thompson, K.E. 1999. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *J. Dairy Sci.* 82: 506-515.
- Stevenson, J.S., Pursley, J.R., Garverick, H.A., Fricke, P.M., Kesler, D.J., Ottobre, J.S., Wiltbank, M.C. 2006. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J. Dairy Sci.* 89: 2567-2578.
- Thatcher, W.W., Moreira, F., Santos, J.E.P., Mattos, R.C., Lopez, F.L., Pancarci, S.M., Risco, C.A. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55: 75-90.
- Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R., Santos, J.E.P. 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65: 30-44.
- Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Rosa, G.J., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52: 1067-1078.
- Vasconcelos, J.L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., Wiltbank, M.C. 2001 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56:307-314.
- Veneranda, G., Filippi, L., Racca, D., Romero, G., Balla, E., Cutaia, L., Bo, G.A. 2006. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and different fixed-time AI protocols. *Reprod. Fertil. Dev.* 18:118.
- Veneranda, G., Filippi, L., Racca, D., Cutaia, L., Bó, G.A. 2008. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 91.
- Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S., Gumen, A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65: 17-29.
- Wiltbank, M.C., Gumen, A., Sartori, R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.