



Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo A. Podestá"
Repositorio Institucional

Efecto de la prolongación del proestro en la fertilidad de los programas de IATF

Año
2017

Autor
Menchaca, A.

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Menchaca, A., [et al.] (2017). *Efecto de la prolongación del proestro en la fertilidad de los programas de IATF*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional

Efecto de la prolongación del proestro en la fertilidad de los programas de IATF

A. Menchaca¹, R. Núñez-Olivera¹, C. García-Pintos¹, F. Cuadro¹, D. Bosolasco, F. Fabini², S. Dutra², J.J. de la Mata³, G. Bó^{4,5}.

¹Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay.

²Actividad Privada, Uruguay.

³Actividad Privada y Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, Argentina.

⁴Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina.

⁵Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Córdoba, Argentina.

Introducción

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) consiste en aplicar diversas estrategias farmacológicas que logran controlar la fisiología ovárica para inducir y sincronizar la ovulación y así poder inseminar las hembras sin la necesidad de detectar el estro. Los protocolos actualmente utilizados surgen luego de la incorporación de la ultrasonografía en el estudio de la dinámica folicular a fines de los años 1980. Esto permitió demostrar de manera inequívoca en varias especies que el desarrollo de los folículos antrales mayores a 3 mm ocurre bajo un patrón de ondas de crecimiento y regresión. A partir del mejor conocimiento de este fenómeno fue que los protocolos para IATF han ido perfeccionándose. Este desarrollo a los largo de los años se podría resumir en diferentes etapas. En los años 1990 los estudios estuvieron focalizados en lograr un adecuado recambio folicular utilizando progesterona, estradiol o GnRH, para evitar la presencia de un folículo persistente y asegurar la ovulación de un folículo relativamente nuevo y con un ovocito saludable. Posteriormente se avanzó con diferentes alternativas para inducir la ovulación luego de retirar el dispositivo con progesterona, primero con benzoato de estradiol o GnRH y luego simplificando la técnica con el uso de cipionato de estradiol. Hoy podemos decir que la ovulación ocurre de manera sincrónica en prácticamente la totalidad del rodeo, y que por lo tanto la tasa de ovulación, la calidad del ovocito y la tasa de fertilización serían aceptables. Sin embargo, la tasa de preñez a los 30 días de la IATF continúa siendo cercana al 50% en promedio, lo que indica que existen otros factores que afectarían el establecimiento de la gestación. En estos últimos años estamos focalizados en estudiar estrategias preovulatorias para mejorar las condiciones postovulatorias a nivel luteal y del medio ambiente uterino, con el objetivo de favorecer el desarrollo embrionario y mejorar el reconocimiento materno de la gestación.

En esta revisión, se resumen una serie de experimentos que hemos realizado con este último objetivo, particularmente mediante la prolongación del período en el que el folículo ovulatorio crece en ausencia de progesterona, es decir, en el intervalo comprendido desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación. A estos tratamientos los llamamos protocolos de proestro prolongado.

Breve reseña sobre los protocolos a base de progesterona y estradiol

Los protocolos para IATF requieren la administración de progesterona durante 7 u 8 días y actualmente existen en el mercado diferentes dispositivos intravaginales que contienen dicha hormona. El desarrollo de estos dispositivos de silicona representó en su momento un avance importante en el control de la fisiología ovárica, ya que la administración de progesterona debe hacerse por varios días y es absolutamente necesaria en la inducción de la ovulación en vacas en anestro (Rathbone *et al.*, 2001). El tratamiento más utilizado actualmente consiste en 2 mg de benzoato de estradiol (EB) administrado por vía intramuscular (im) al colocar el dispositivo, momento definido como el Día 0 del protocolo. En el Día 7 u 8 se retira el dispositivo asociado a una dosis luteolítica de prostaglandina F_{2α} (PGF) junto con 0,5 a 1 mg de EB im. Se recomienda el uso de gonadotrofina coriónica equina (eCG) al retirar el dispositivo, principalmente en hembras en anestro o pobre condición corporal. La IATF se realiza entre las 48 y 56 h luego de retirado el dispositivo (Menchaca *et al.*, 2013).

El motivo de utilizar estradiol al inicio del tratamiento junto con progesterona es inducir la atresia del folículo dominante y el recambio folicular (Bó *et al.*, 1995a), evitando así la formación de un folículo persistente que está asociado a una menor fertilidad (Adams., 1999). Este tratamiento induce la emergencia de una nueva onda folicular 3 a 4 días más tarde (Bó *et al.*, 1995b) y entonces al momento de la remoción del dispositivo al Día 7 u 8, estará presente un folículo relativamente nuevo y con un ovocito viable, lo que ocurre de manera sincrónica en más del 90% de las vacas. Esta sincronía permite que las vacas alcancen el desarrollo folicular ovulatorio en un período muy similar en todo el rodeo. La administración de una dosis de cipionato de estradiol (ECP) al finalizar el tratamiento permite inducir y sincronizar aún más el pico de LH y la ovulación (Colazo *et al.*, 2003). De esta manera es posible realizar la inseminación sin necesidad de detectar el estro (Bó *et al.*, 2002).

En general, existen básicamente dos tipos de protocolos para IATF utilizados actualmente en bovinos: aquellos basados en estradiol y progesterona y los basados en análogos de la GnRH y progesterona. La preferencia por uno de estos protocolos por parte de los profesionales está relacionada con la disponibilidad de estos fármacos en cada país. Por ejemplo, los protocolos basados en estradiol se utilizan en América del Sur y en los rodeos de carne en Australia, mientras que los protocolos basados en GnRH tienden a utilizarse más en Norteamérica, Europa y Nueva Zelanda, donde el estradiol no está disponible. Los cambios en el criterio de las agencias reguladoras en la aprobación o no de productos farmacológicos para la reproducción, que a menudo ocurren por condiciones impuestas por el mercado europeo de carne y leche sin un fundamento científico claro, llevan a que algunos productos ingresen o se retiren del mercado, y esto conduce a la necesidad de estudiar alternativas para todos los casos.

La mayoría de los tratamientos aplicados en los países de América del Sur requieren la administración de eCG en el momento del retiro del dispositivo con progesterona (Bó *et al.*, 2002, 2013; Baruselli *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2013). Probablemente, el efecto más importante de la eCG es la estimulación del crecimiento del folículo dominante y el consiguiente aumento de la tasa de ovulación, lo que hemos demostrado en vacas Hereford en anestro posparto y en baja condición corporal (Bó *et al.*, 2013). Además, el tratamiento con eCG aumentó las concentraciones de progesterona circulante en la fase luteal subsiguiente, lo que estuvo asociado con un mayor diámetro del cuerpo lúteo (Baruselli *et*

al., 2012; Núñez-Olivera *et al.*, 2014). En un estudio que realizamos en vacas Hereford en anestro posparto (Núñez-Olivera *et al.*, 2014), también encontramos que las vacas que no recibieron eCG al retiro del dispositivo tuvieron una incidencia importante de CLs de regresión prematura luego del tratamiento para IATF, lo que impide el establecimiento de la gestación. El tratamiento con eCG disminuyó esta incidencia y favoreció el desarrollo de un CL más competente luego de la ovulación. Este es un efecto importante a considerar cuando trabajamos con vacas con cría en anestro.

Por otra parte, se ha demostrado que la tasa de preñez se incrementa a medida que aumenta el tamaño del folículo ovulatorio (Sá Filho *et al.*, 2010). El uso de eCG también indujo la ovulación de folículos más grandes o con una mayor tasa de crecimiento, lo que podría favorecer una mayor producción endógena de estradiol afectando positivamente la programación del endometrio uterino. En otros estudios, también fue demostrado que el tratamiento con eCG modificó la actividad mitocondrial y el número de células luteales grandes (Rigoglio *et al.*, 2013), y aumentó la expresión de las enzimas esteroideogénicas (P450_{scc}, 3 β -HSD, y StAR) en el CL recién formado (Fátima *et al.*, 2013). Todos estos hallazgos en conjunto, muestran diferentes ventajas con el uso de eCG.

En trabajos previos, hemos reportado que la incidencia de vacas en anestro a los 60 o 90 días posparto es alta. En un relevamiento que realizamos sobre un total de 21.329 vacas y vaquillonas manejadas en condiciones de cría típicas de Uruguay (Menchaca y Chiflet, 2005; Menchaca *et al.*, 2013), encontramos que las vacas con cría con más de un parto, en un 80% en promedio se encuentran en anestro al iniciar un protocolo de IATF. Esta situación fue aún más crítica en vacas de segundo entore o primíparas. En vaquillonas de 2 años destinadas a ingresar al servicio, si bien la situación es más favorable alcanzando un 65% de ciclicidad en promedio, el porcentaje de anestro sigue siendo considerable lo que se traduce en una menor tasa de preñez en estas hembras y un atraso en la fecha de parición en el siguiente año, condicionando el desempeño reproductivo en el resto de la vida de la vaca. Por este motivo, los tratamientos para IATF aplicados en estas condiciones deben considerar que la mayoría de las vacas están en anestro, y en este sentido el uso de eCG debe ser considerado para evitar fracasos con la técnica.

Tratamientos con progesterona y GnRH

El protocolo convencional normalmente utilizado en Norteamérica consiste en el uso de progesterona y GnRH, principalmente debido a la ausencia de estradiol en el mercado de EEUU y Canadá. En estos países, los protocolos que se desarrollaron para vacas lecheras (Pursley *et al.*, 1995) son ampliamente utilizados en rodeos de carne (Geary *et al.*, 2001; Day, 2015). El tratamiento más difundido consiste en la administración de GnRH al momento de colocar el dispositivo con progesterona para inducir la liberación de LH y la ovulación del folículo dominante si hubiese uno presente, con la aparición de una nueva onda folicular aproximadamente 1,5 a 2 días más tarde. El dispositivo se retira 7 días más tarde junto con la administración de una dosis de PGF para inducir la regresión del CL; posteriormente se administra una segunda dosis de GnRH en el momento de la IATF (aproximadamente 60 horas más tarde) para sincronizar la ovulación. Este tratamiento es conocido como protocolo Co-Synch. El protocolo Co-synch con progesterona surge como una serie de mejoras realizadas sobre el protocolo Ovsynch, desarrollado algunos años antes por Pursley y Wiltbank para vacas lecheras (Pursley *et al.*, 1995). La adición de progesterona resuelve algunas debilidades de los protocolos previos (Lamb *et al.*, 2001) y el hecho de administrar la GnRH al mismo momento que la inseminación simplifica los tratamientos

previos. Sin embargo, los protocolos con GnRH siguen mostrando algunos problemas frente a los protocolos con estradiol. Algunos estudios han demostrado que el porcentaje de vaquillonas que ovulan a la primera dosis de GnRH es del 26% al 56% (Martinez *et al.*, 1999; Colazo and Ambrose, 2011) con reportes tan bajos como del 15% al 37% en presencia de altas concentraciones de progesterona (Colazo *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2010). En vacas de carne la tasa de ovulación es cercana al 60% (Small *et al.*, 2009), pero la emergencia de una nueva onda folicular se sincroniza sólo cuando el tratamiento induce la ovulación del folículo dominante (Martinez *et al.*, 1999). Si la primera GnRH no induce la ovulación y la emergencia de una nueva onda, la ovulación después de la segunda GnRH puede resultar en una mala sincronización (Martinez *et al.*, 2002) resultando en una muy baja tasa de preñez (Martinez *et al.*, 2009). Por este motivo, la adición de un dispositivo de liberación de progesterona a un protocolo basado en GnRH de 7 días ha mejorado la tasa de preñez en vaquillonas (Martinez *et al.*, 2002; 2009) y en vacas de carne cíclicas (Lamb *et al.*, 2001). Los protocolos con GnRH tampoco se han utilizado con el éxito deseado en vacas de carne en anestro posparto (Diskin *et al.*, 2002), que es una situación frecuente en rodeos manejados en sistemas pastoriles (Baruselli *et al.*, 2004). También en estos casos, la inserción de un dispositivo con progesterona mejoró significativamente la tasa de preñez en vacas con cría y en anestro (Lamb *et al.*, 2001) y más recientemente la adición de eCG al momento de la remoción del dispositivo con progesterona mejoro aún más la preñez en las vacas en anestro posparto (Randi et al., 2017).

Protocolos con proestro prolongado

Los protocolos con progesterona y estradiol descritos anteriormente permiten una tasa de preñez cercana al 50-55% en promedio (Bó et al., 2013). Esto puede considerarse un buen resultado si tenemos en cuenta que las vacas están en anestro, con cría al pie y con 60 días posparto, se inseminan todas en un solo día, y sin la necesidad de detectar el estro. Sin embargo, se cuestiona normalmente qué ocurre con la otra mitad del rodeo que no resulta preñado. Para mejorar este resultado, es necesario una vez más comprender los mecanismos más fundamentales o fisiológicos que determinan dicha respuesta. Con los tratamientos descritos, en diversos experimentos se ha demostrado que casi la totalidad de las hembras ovulan en el momento preciso (Bó *et al.*, 1995) y, por lo tanto, la inseminación en estos programas de IATF se realiza en el momento adecuado (algunas horas antes de la ovulación). Asociado con esto, en otros estudios se ha demostrado que cuando la inseminación se realiza correctamente en una vaca en estro, la tasa de fertilización en bovinos de carne es cercana al 90% (Diskin and Sreenan, 1980). Sin embargo, es interesante el hecho que prácticamente la mitad de las vacas no están preñadas cuando se realiza el diagnóstico de gestación a los 30 días.

En bovinos de carne y leche está demostrado que existe una alta incidencia de muerte embrionaria durante las primeras tres semanas luego de la fertilización. Si bien en este período el embrión es responsable de su propia sobrevivencia ya que debe inducir el reconocimiento materno de la gestación mediante una adecuada señalización, el pasaje de los primeros estadios embrionarios hasta la etapa de concepto depende exclusivamente de las secreciones oviductales y uterinas (Binelli *et al.*, 2017). Este proceso de secreción secuencial a lo largo de los primeros días luego de la fertilización es programado por la exposición a los estrógenos durante la fase folicular (proestro/estro), y a la acción de la progesterona durante la fase luteal temprana. Tanto la producción de estrógenos como la de progesterona es determinada por el desarrollo folicular preovulatorio, justamente durante la

fase folicular (Binelli *et al.*, 2017). En este período -que para simplificar la terminología es nombrado como proestro- un buen desarrollo del folículo preovulatorio determina una mayor producción de estrógenos, y también el tamaño y la actividad del cuerpo lúteo subsiguiente. A su vez, la producción de estrógenos en este período preovulatorio programa la presencia de receptores de progesterona a nivel endometrial, necesarios para que dicha hormona ejerza su acción sobre las secreciones (histotrofo) y el ambiente uterino durante el desarrollo embrionario. Por todo esto, las condiciones preovulatorias afectarán la actividad luteal, el ambiente uterino y el desarrollo embrionario temprano, y de esta manera pueden determinar el éxito o el fracaso en el establecimiento de la gestación.

La importancia de un proestro prolongado derivó de una serie de estudios que evaluaron la influencia de la madurez folicular sobre la fecundidad en el ganado vacuno (Day, 2015; Bridges *et al.*, 2008). Aunque primero se planteó la hipótesis de que en protocolos que utilizaban GnRH como inductor de la ovulación el diámetro folicular era un fuerte indicador de fertilidad, el análisis acumulado de varios estudios ha demostrado que el predictor más consistente de preñez en vacas *Bos taurus* fue la duración del proestro, en lugar del diámetro del folículo (Day, 2015). Para confirmar esta idea, en un experimento en el que las vacas fueron inducidas a ovular un folículo con un diámetro similar entre ellas, la tasa de preñez fue mayor en las que recibieron GnRH 2,25 días después de la administración de PGF (71%) comparado con las que recibieron GnRH 1,25 días después de PGF (10%, $P < 0,01$; Bridges *et al.*, 2010). De manera similar, Binelli y colaboradores han trabajado en un modelo experimental en el que indujeron un proestro largo vs. un proestro corto, colocando un dispositivo con progesterona por 7,5 u 8 días, y administrando GnRH a las 48 o 36 horas luego del retiro, respectivamente. Con este modelo, han demostrado que las vacas con el proestro largo tienen un folículo más grande que induce un cuerpo lúteo de mayor tamaño, con mayor producción de progesterona y mayor tasa de preñez (Binelli *et al.*, 2017).

En un estudio reciente utilizando estradiol exógeno (ECP o EB vs. control), las concentraciones más altas de estradiol en el período preovulatorio inducidas por el tratamiento, también se relacionaron a menores pérdidas embrionarias en el período entre el reconocimiento materno de la gestación y la implantación (Madsen *et al.*, 2015). Resultados similares hemos obtenido con la administración de ECP al retirar el dispositivo (Bosolasco *et al.*, no publicado), con resultados favorables en la funcionalidad uterina que indicarían que el estradiol no solo mejora la tasa de ovulación o mejora la sincronía de la misma, sino que también prepara al endometrio para un mejor desempeño.

Estos conceptos son relativamente nuevos y por lo tanto no habían sido considerados en el diseño de los protocolos previos para IATF. Normalmente en una fase folicular espontánea de la vaca, el intervalo entre la luteólisis y la ovulación es de unos 4 días aproximadamente. Sin embargo, en los protocolos de IATF el intervalo entre el retiro del dispositivo con progesterona y la ovulación es bastante menor, aproximadamente de unos 3 días (Bó *et al.*, 2007). Esta menor duración del proestro ocurre porque el folículo preovulatorio ya ha alcanzado un buen desarrollo al retirar el dispositivo al día 7 u 8, y principalmente porque la administración de ECP al retiro del dispositivo (o EB 24 h más tarde) inducen el pico de LH y la ovulación en un intervalo más corto de lo que ocurriría de manera espontánea.

Teniendo en cuenta estos conceptos más recientes, es que se ha propuesto prolongar el proestro en los protocolos para IATF y entonces han surgido nuevas estrategias.

Protocolo Co-Synch de 5 días

El protocolo Co-Synch de 5 días es un tratamiento basado en GnRH que ha ganado espacio recientemente entre los profesionales y productores de Norteamérica, con tasas de preñez más alta que las obtenidas con los métodos más tradicionales de Co-Synch de 7 días (Day, 2015). La base fisiológica de este tratamiento fue reducir el tiempo de inserción del dispositivo de progesterona para evitar los efectos adversos de los folículos persistentes sobre la fertilidad de las vacas que no ovulaban a la primera GnRH, y a la vez prolongar el período de proestro permitiendo altos niveles endógenos de estrógenos. Utilizando este protocolo, el efecto benéfico del proestro prolongado se ha asociado con concentraciones más altas de estradiol circulante antes de la ovulación y mayores concentraciones de progesterona en la fase luteal subsiguiente, especialmente en aquellas vacas que no ovulan después de la primera GnRH (Bridges *et al.*, 2014). Las vacas tratadas con el Co-Synch de 7 días que no ovularon después de la primera GnRH tuvieron una reducción marginal en el diámetro del folículo ovulatorio dominante y una reducción sustancial de las concentraciones de estradiol preovulatorias y de progesterona en la fase luteal comparadas con las que sí ovularon después de la primera GnRH. Por el contrario, en las vacas tratadas con el protocolo Co-Synch de 5 días, las características endocrinas y foliculares fueron similares entre vacas que ovularon o no ovularon a la primera GnRH (Bridges *et al.*, 2014). En un trabajo previo compararon un protocolo Co-Synch de 7 días más un dispositivo de progesterona con IATF a las 60 horas y un protocolo Co-Synch de 5 días más un dispositivo de progesterona con IATF a las 72 horas en vacas de carne con cría (Bridges *et al.*, 2008). En ese estudio, la tasa de preñez fue 10,5 puntos más alta con el protocolo Co-Synch de 5 días (70,4%) que con el Co-Synch de 7 días (59,9%; $n = 616$ Angus; $P < 0,01$). Resultados similares fueron reportados recientemente, es decir, una tasa de preñez significativamente más alta en vacas tratadas con el Co-Synch de 5 días que en las tratadas con el Co-Synch de 7 días (Whittier *et al.*, 2013).

Algunos resultados muestran que debido a un intervalo más corto entre la primera GnRH y la inducción de la luteólisis en el protocolo Co-Synch de 5 días, una sola administración de PGF no sería eficaz para inducir la luteólisis en vacas de carne (Souto *et al.*, 2009). Por este motivo, al menos en vacas serían necesarias dos dosis de PGF para inducir una regresión completa del cuerpo lúteo inducido por la primera dosis de GnRH (tasa de preñez: una dosis de PGF, 53,1%; dos dosis de PGF, 69,0% (Kasimanickam *et al.*, 2009). A partir de estos resultados, los estudios posteriores de diversos laboratorios investigaron como modificar la administración de PGF en este protocolo de 5 días. A pesar de que una reducción en el intervalo entre las dos dosis de PGF de 12 a 2 horas produjo resultados similares en un estudio (Cruppe *et al.*, 2010), más recientemente se reportó una reducción en la tasa de preñez cuando el intervalo entre las dos dosis de PGF fue inferior a 6 horas (Peel *et al.*, 2012). En otro reporte de campo sobre 2.465 vacas con cría que recibieron IATF luego del Co-synch de 5 días (Bridges *et al.*, 2012), la tasa de preñez fue mayor ($P < 0,05$) en vacas que recibieron PGF con 8 horas de diferencia (55%) que en aquellas que recibieron solo una dosis de PGF (48%; $P < 0,05$). En otro grupo experimental donde las vacas recibieron dos dosis de PGF al mismo tiempo, la tasa de preñez fue intermedia (51%) sin diferencias significativas con los otros dos grupos. Los autores sugieren que en el protocolo Co-Synch de 5 días se requieren dos dosis de PGF, y los resultados parecen ser similares aun cuando ambas dosis se administraron juntas al momento del retiro del dispositivo con progesterona.

En un estudio realizado en Argentina (Huguenine *et al.*, 2013), se comparó el protocolo Co-Synch de 5 días con el protocolo basado en estradiol y progesterona aplicado en vacas con cría, donde 801 estaban en anestro y 183 estaban ciclando. Las vacas en el grupo Co-

Synch de 5 días se trataron como se describió anteriormente con dos PGF administradas al retirar el dispositivo de progesterona y la mitad de las vacas también recibieron 400 UI de eCG (Ecegon, Biogenesis-Bagó, Argentina). Las vacas que recibieron el protocolo con estradiol fueron tratadas con 2 mg de EB al colocar dispositivo con progesterona (Cronipres 1 g, Biogenesis-Bagó, Argentina) el Día 0, y recibieron una dosis de PGF, 400 UI de eCG y 1 mg de ECP al retirar el dispositivo al Día 8. Las vacas recibieron una IATF a las 52 a 56 horas después del retiro del dispositivo en el grupo con estradiol y a las 72 horas después del retiro del dispositivo en los grupos Co-Synch de 5 días. Aunque no se observaron diferencias en la tasa de preñez en las vacas ciclando, en las vacas en anestro la tasa de preñez fue mayor en los dos grupos que recibieron eCG. Determinando al evaluar todo el rodeo en su conjunto, el resultado fue más favorable para estos dos grupos (Co-Synch de 5 días: 46,3%, 120/259; convencional: 54,5%, 151/277) que para las tratadas con Co-Synch de 5 días sin eCG (26,8%, 71/265; $P < 0,05$).

El protocolo Co-Synch de 5 días también ha sido bien estudiado en vaquillonas (Day, 2015), donde se ha tratado de responder a tres preguntas: (1) la necesidad de la primera dosis de GnRH en el momento de la inserción del dispositivo de progesterona, considerando que el porcentaje de vaquillonas que ovulan a la primera GnRH es muy bajo (Colazo and Ambrose, 2011); (2) la necesidad de administrar una o dos dosis de PGF en el momento de la eliminación del dispositivo de progesterona (solo si se administra GnRH al colocar el dispositivo); y (3) el tiempo óptimo para realizar la IATF.

Con respecto a la necesidad de administrar GnRH al colocar el dispositivo con progesterona, varios autores encontraron que la tasa de preñez no difirió cuando las vaquillonas de leche recibieron o no la primera dosis de GnRH (Colazo and Ambrose, 2011; Lima *et al.*, 2011). Resultados similares fueron obtenidos en vaquillonas de carne por Cruppe *et al.* (2014). No obstante, más adelante se resumen otros trabajos con algunos resultados opuestos a estos, donde se asocia la administración de GnRH al colocar el dispositivo y la administración de una o dos dosis de PGF al retirarlo.

En relación a la dosis simple o doble de PGF, en aquellos casos en los que sí se administró GnRH al iniciar el tratamiento, Rabaglino *et al.* (2010) no encontraron diferencias en la tasa de preñez cuando se comparó una o dos dosis de PGF. Sin embargo, Peterson *et al.* (2011) encontraron que el resultado tendió a ser mayor cuando se administró dos dosis de PGF con 6 horas de diferencia. Sumado a esto, en otro estudio se encontró una mayor tasa de preñez en vaquillonas de leche cuando se administraron dos dosis de PGF con un intervalo de 24 horas desde la extracción del dispositivo (Lima *et al.*, 2013), pero solo cuando habían recibido GnRH al insertar el dispositivo. Estos autores recomiendan administrar la dosis de GnRH al colocar el dispositivo y administrar la doble dosis de PGF en vaquillonas de leche. Recientemente, Kasimanickam *et al.* (2014) realizaron un estudio con un gran número de vaquillonas de carne ($n = 1.018$) y de leche ($n = 1.137$) sincronizadas con el protocolo Co-Synch de 5 días para determinar si es necesaria la primera dosis de GnRH en el momento de la inserción del dispositivo y si es necesaria una segunda dosis de PGF al retirar el dispositivo. La administración de GnRH al colocar el dispositivo mejoró significativamente la tasa de preñez en vaquillas de carne, pero no en vaquillonas de leche. Por su parte, la administración de una o dos PGF en la remoción del dispositivo no tuvo efecto significativo sobre la tasa de preñez ni en las vaquillonas de carne ni en las de leche.

Acerca del mejor momento para realizar la IATF (siempre acompañada por una dosis de GnRH), Kasimanickam et al. (2012) reportaron que las vaquillonas de carne inseminadas a las 56 horas en un protocolo Co-Synch de 5 días tenían, en promedio, una tasa de preñez 10,3% superior a las inseminadas a las 72 horas. En el mismo sentido, Day (2015) sugiere que con el protocolo Co-Synch de 5 días el momento óptimo de inseminación en vaquillonas es entre 56 y 66 horas después del retiro del dispositivo.

En resumen, aunque la necesidad de administrar GnRH en el momento de la inserción del dispositivo con progesterona en vaquillonas aún no está clara, en caso de hacerlo quizás sea necesario una segunda dosis de PGF. Los resultados continúan siendo contradictorios y dependerían en gran medida del porcentaje de vaquillonas que ovulan a la primera dosis de GnRH. Con respecto al momento de la inseminación, el tiempo óptimo para la IATF en vaquillonas de carne sería entre las 56 y 66 horas después del retiro del dispositivo.

Protocolo J-Synch

Recientemente hemos realizado una serie de experimentos para incorporar todos estos conceptos sobre la prolongación del proestro en un nuevo protocolo denominado J-Synch. Buena parte de estos resultados los hemos publicado en el *International Congress on Animal Reproduction* (Bó et al., 2016) y en diversas publicaciones de otros congresos o revistas regionales. Este nuevo protocolo surge como alternativa al protocolo convencional con estradiol, siguiendo la misma idea del protocolo Co-Synch de 5 días para prolongar el proestro (de la Mata y Bó, 2012). En estos años hemos evaluado este protocolo en varios experimentos en Uruguay y Argentina. Presentamos aquí los resultados de diferentes estudios realizados con más de 15.000 hembras, siendo este protocolo desde el año 2014 el tratamiento que aplicamos con mayor frecuencia en programas comerciales de IATF realizado por nuestro grupo en Uruguay.

Debido a que los tratamientos convencionales más utilizados en Sudamérica están basados en estradiol, la idea detrás de este nuevo protocolo J-Synch fue mantener la administración de 2 mg de EB en la inserción del dispositivo que lleva a la atresia folicular y a la aparición de una nueva onda folicular de 2 a 5 días más tarde en el 90% de los casos, tanto en vacas como en vaquillonas (Bó et al., 2002). A su vez, debido a que el estradiol no induce la ovulación del folículo dominante ni la formación de un nuevo CL (accesorio), este nuevo protocolo no requiere una doble administración de PGF al retirar el dispositivo (con una dosis es suficiente para inducir la regresión del CL que ya estaba presente). Por lo tanto, el uso de estradiol sería más eficaz y más simple que el de GnRH utilizado en el protocolo Co-Synch de 5 días, y sumado a esto, el menor costo del estradiol frente a la GnRH es un argumento adicional para avanzar con esta idea.

En un primer experimento realizado en Argentina se utilizaron 28 vaquillonas cruza Angus de 16 y 17 meses de edad que fueron divididas en dos grupos experimentales (de la Mata y Bó, 2012). Las vaquillonas del grupo J-Synch ($n = 14$) recibieron 2 mg de EB y un dispositivo intravaginal con 0,6 g de progesterona (Emefur 0,6 g, Merial Argentina SA) durante 6 días, mientras que el resto de las hembras ($n = 14$) fueron tratadas con el Co-Synch de 5 días usando el mismo dispositivo de progesterona e iniciando el tratamiento un día más tarde. Todas las vaquillonas recibieron 150 μ g de D-cloprostenol (Emefur, Merial) al retirar el dispositivo, y recibieron GnRH junto con la IATF a las 72 horas más tarde. Todas las vaquillonas fueron examinadas por ultrasonografía para monitorear el desarrollo folicular y la ovulación. La tasa de ovulación a la primera GnRH en vaquillonas en el Co-Synch de 5

días fue del 50% (7/14) y una nueva onda folicular surgió $1,6 \pm 0,2$ días después. Las vaquillonas que no ovularon a la primera GnRH tuvieron una nueva onda folicular que emergió entre 1 y 4,5 días después de la GnRH. Por su parte y a diferencia de esto, el 91,6% (11/12; $P < 0,05$) de las vaquillonas del grupo J-Synch presentaron atresia folicular y una nueva onda emergió entre los 2 a 5 días después de la administración de EB. El intervalo desde el tratamiento hasta la aparición de una nueva onda folicular fue más corto ($P < 0,05$) en las vaquillonas tratadas con GnRH ($2,1 \pm 1,0$ días) que en las tratadas con EB ($3,7 \pm 0,9$ días). Por el contrario, la tasa de ovulación (91,6% vs. 92,8%), el diámetro del folículo ovulatorio ($11,7 \pm 0,2$ mm vs. $12,0 \pm 0,5$ mm), el intervalo entre la PGF a la ovulación ($97,1 \pm 17,4$ horas vs. $95,1 \pm 12,5$ horas), y la tasa de preñez (50,0% vs 57,1%) no difirió entre los grupos.

Protocolo J-Synch vs. protocolo convencional en vaquillonas

Si bien los resultados iniciales fueron alentadores comparando el protocolo J-Synch con el Co-Synch de 5 días, considerando que el protocolo convencional más probado y utilizado en todo Sudamérica es el tratamiento de 7 u 8 días con progesterona y estradiol, es contra este protocolo que se debe comparar cualquier nueva propuesta. Por este motivo, en una serie de experimentos se comparó la tasa de preñez en vaquillonas que recibieron el protocolo J-Synch vs. el protocolo convencional.

Los primeros resultados se pueden resumir en dos experimentos realizados en las estaciones de invierno y primavera en La Pampa, Argentina (de la Mata *et al.*, 2015). Las vaquillonas en el grupo J-Synch recibieron IATF junto con la administración de GnRH (72 horas después del retiro del dispositivo de progesterona), mientras que las del grupo convencional recibieron IATF entre las 52 a 56 horas después del retiro del dispositivo. El primer experimento se realizó durante el invierno con vaquillonas en baja condición corporal (4 a 6 en la escala 1 a 9) al inicio del tratamiento, que además perdieron un punto en promedio durante los 30 días luego de la IATF debido a las condiciones de sequía que se dieron en ese invierno en la zona donde se realizó el experimento. Los resultados fueron decepcionantes, las vaquillonas con J-Synch se preñaron menos que con el protocolo convencional (37,8%, 104/275 vs. 49,3%, 138/280, respectivamente; $P < 0,05$). Considerando que estos resultados habían sido obtenidos en condiciones que no son las recomendables para aplicar esta tecnología, durante la primavera siguiente se realizaron algunos trabajos adicionales en vaquillonas con buena condición corporal (6 a 7 puntos) y ganando peso después del inicio del tratamiento. Este experimento se realizó en cuatro localidades que incluían 583 vaquillonas cruce Angus y Hereford. La tasa de preñez obtenida en este experimento sumando todas las réplicas favorecieron al protocolo J-Synch comparado al protocolo convencional, aunque no alcanzaron diferencias significativas (59,7%, 175/293 vs. 53,1%, 154/290, respectivamente; $P = 0,12$). Estos 6,6 puntos porcentuales de diferencia si bien no fueron significativos, alentaron la ejecución de nuevos experimentos que realizamos en Uruguay en un mayor número de animales, en condiciones climáticas normales, y siempre con el uso de eCG administrado al momento de retirar el dispositivo.

Bajo estas condiciones, en un estudio comparamos la tasa de preñez obtenida con ambos protocolos en un total de 2.349 vaquillonas ubicadas en 5 establecimientos del norte de Uruguay. Todas las vaquillonas fueron clasificadas por condición corporal y por actividad ovárica mediante ecografía al iniciar el tratamiento. El porcentaje de vaquillonas con cuerpo lúteo al iniciar el tratamiento fue de 39 a 87% en las diferentes réplicas. Para cada réplica, el

Día 0 en la mañana se colocaba el dispositivo junto a una dosis de 2 mg de EB a la mitad del rodeo y en la tarde a la otra mitad (las vaquillonas en la que se iniciaba el tratamiento en la mañana se asignaban al protocolo convencional y las de la tarde al protocolo J-Synch). Todas volvían al mismo campo para continuar con el mismo manejo y al Día 6 a última hora de la tarde se traía todo el rodeo y se retiraba el dispositivo a las vaquillonas del protocolo J-Synch junto con una dosis de PGF y 300 UI de eCG. Al día siguiente en la mañana (Día 7) se retiraba el dispositivo en las vaquillonas del protocolo convencional junto con el mismo tratamiento de PGF y eCG, y además se administraba 0,5 mg de ECP. Las vaquillonas continuaban todas en el mismo potrero con el mismo manejo y el Día 9 en la mañana temprano se iniciaba la IATF, la mitad de cada grupo se inseminaba en la mañana y la mitad en la tarde, quedando balanceados los grupos por los toros utilizados, la partida de semen de cada toro, y por el inseminador (dos inseminadores por cada lote). De esta manera, las vaquillonas del grupo J-Synch ($n = 1.125$) fue dividido en dos para recibir la IATF próximo a las 60 horas o a las 72 horas, mientras que el grupo convencional ($n = 1.124$) se inseminó la mitad próximo a las 48 horas y la otra mitad a las 56 horas. Todos los productos farmacológicos fueron los mismos, utilizando dispositivos de 0,5 g, 300 UI de eCG, 100 µg de acetato de gonadorelina, y 500 µg de cloprostenol (todos los productos elaborados por Syntex/Zoetis, Argentina). Es importante tener en cuenta que para comparar ambos protocolos hay que evitar diferencias en el manejo, alimentación, disponibilidad de agua y sombra, además de diferencias entre toros, partidas de semen e inseminadores. Sólo así, aplicando el método científico y de manera correcta, y haciéndolo en un buen número de animales es posible alcanzar conclusiones robustas sobre tasa de preñez en experimentos de campo. Todos los experimentos presentados a continuación han sido realizados con esta metodología de trabajo. Los datos se analizaron mediante modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) de Infostat. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 1. El protocolo J-Synch permitió aumentar la tasa de preñez en promedio 5,4 puntos porcentuales comparado con el protocolo convencional (56,1% 631/1.125 vs. 50,7% 620/1.124, respectivamente; $P < 0,05$), siendo esta diferencia para cada replica entre 2,4 y 9,1 puntos porcentuales a favor del protocolo J-Synch. Para este protocolo no hubo diferencias entre la IATF a las 60 horas vs. 72 horas, lo que permitiría mantener una amplia ventana de inseminación durante todo el Día 9, e inseminar 400 a 500 vacas por día al igual que con el protocolo convencional.

Tabla 1. Tasa de preñez obtenida con el protocolo J-Synch vs. el protocolo convencional para IATF en vaquillonas.

		Protocolo J-Synch	Protocolo convencional	P
Réplica I ($n=150$) 87% con CL	IATF AM	53,8% (21/39)	54,1% (20/37)	NS
	IATF PM	52,9% (18/34)	47,5% (19/40)	NS
Réplica II ($n=420$) 54% con CL	IATF AM	71,8% (79/110)	66,0% (68/103)	NS
	IATF PM	59,6% (59/99)	54,6% (59/108)	NS
Réplica III ($n=396$) 86% con CL	IATF AM	55,4% (56/101)	52,5% (51/97)	NS
	IATF PM	54,1% (53/98)	45,0% (45/100)	NS
Réplica IV ($n=540$) 59% con CL	IATF AM	55,6% (80/144)	48,5% (65/134)	NS
	IATF PM	53,3% (65/122)	41,4% (58/140)	0,055
Réplica V ($n=843$)	IATF AM	51,3% (99/193)	50,8% (120/236)	NS

39% con CL	IATF PM	54,6% (101/185)	50,2% (115/229)	NS
Total =2.349	IATF AM	57,1% (335/587)	53,4% (324/607)	NS
	IATF PM	55,0% (296/538)	48,0% (296/617)	0,05
	<i>P</i>	NS	0,06	

¿Por qué J-Synch mejora la tasa de preñez?

Este resultado a favor del protocolo J-Synch en las vaquillonas, nos llevó a plantearnos nuevos experimentos tanto para comprender mejor la causa de esta mejora, así como para proponer nuevas ideas con el objetivo de mejorar dicho tratamiento. Diseñamos un estudio para comparar la dinámica folicular, la actividad luteal y la funcionalidad uterina en vaquillonas de carne tratadas con el protocolo J-Synch vs. el protocolo convencional de 7 días con estradiol (de la Mata *et al.*, en redacción). El experimento se realizó en el Dpto. de Florida en Uruguay utilizando 48 vaquillonas cruce Hereford y Angus de dos años de edad y ciclando. Las vaquillonas del grupo convencional ($n = 24$) recibieron un dispositivo de progesterona (0,5 g, DIB, Zoetis, Buenos Aires, Argentina) y 2 mg de EB (Gonadiol, Zoetis) el Día 0, asociado a 500 μ g de cloprostenol (PGF, Ciclase DL, Zoetis) y 0,5 mg de ECP (Cipiosyn, Zoetis) en el momento del retiro del DIB al Día 7. Las vaquillonas del grupo J-Synch ($n = 24$) recibieron el dispositivo DIB 0,5 g y 2 mg de EB en el Día 0, así como 500 μ g de cloprostenol en el retiro del DIB que se hizo al Día 6, y recibieron 100 μ g de acetato de gonadorelina (GnRH, Gonasyn GDR, Zoetis) 72 horas más tarde (Día 9). Las vaquillonas del grupo convencional ovularon $65,0 \pm 13,7$ horas después del retiro del dispositivo, mientras que las del grupo J-Synch ovularon $93,7 \pm 12,9$ después del retiro del DIB ($P < 0,05$). Con este resultado demostramos que la duración del proestro efectivamente es más prolongado con el protocolo J-Synch (28,7 horas de diferencia). Esto nos conduce a la hipótesis de que el folículo ovulatorio al crecer en ausencia de progesterona por más tiempo produzca más estradiol que en el protocolo convencional. Esta idea además es sustentada por el hecho de que la tasa de crecimiento de este folículo desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación fue mayor en el protocolo J-Synch que en el convencional ($1,3 \pm 0,4$ vs. $1,0 \pm 0,4$ mm/día, respectivamente; $P < 0,06$). Cuando determinamos las concentraciones de estradiol en sangre no encontramos diferencias entre ambos protocolos, lo que podría interpretarse como que el folículo ovulatorio del protocolo J-Synch fue capaz de producir estradiol suficiente para alcanzar niveles en sangre similares a los inducidos por la administración exógena de ECP en el protocolo convencional. Todo esto nos lleva a sugerir que el folículo ovulatorio en el protocolo con proestro prolongado produce más estrógeno y por más tiempo que en el protocolo convencional, lo que debería ser confirmado en futuros estudios. En suma, al prolongar el proestro estamos favoreciendo el desarrollo del folículo ovulatorio en ausencia de progesterona lo que podría mejorar ciertas condiciones preovulatorias. Además de esto, este efecto sobre el folículo ovulatorio quizás también podría tener cierto beneficio sobre la actividad luteal y la programación uterina luego de la ovulación como ha sido propuesto previamente (Binelli *et al.*, 2017).

En este experimento también evaluamos la actividad luteal y el ambiente uterino luego de la ovulación. Las concentraciones séricas de progesterona fueron más altas ($4,7 \pm 0,2$ vs.

3,9 ± 0,1 ng/ml; $P < 0,05$) y el cuerpo lúteo fue mayor (398,7 ± 10,0 vs. 357,3 ± 10 mm³; $P < 0,05$) en los días 7 a 12 después de la ovulación en las vaquillonas del grupo J-Synch comparadas con en el grupo convencional, respectivamente. En este mismo estudio, realizamos biopsias endometriales a los 6 días luego de la ovulación y evaluamos la presencia y la expresión génica de receptores de progesterona, estradiol e IGF1. Los resultados mostraron una menor expresión de transcritos de receptores de progesterona ($P < 0,05$), lo que asociado a una mayor concentración sérica de esta hormona estaría indicando una *downregulation* más acelerada que en el protocolo convencional. Estos estudios realizados mediante *real time* PCR e inmunohistoquímica reflejarían un adelanto en la programación endometrial, lo que en general está asociado a una mejor funcionalidad uterina.

Estos resultados en su conjunto explicarían, al menos en parte, la mejor tasa de preñez obtenida en los experimentos previos con el protocolo J-Synch (de la Mata *et al.*, en redacción). En suma, la información muestra que este protocolo aumenta el intervalo entre el retiro del dispositivo y la ovulación, lo que estuvo asociado a una mayor tasa de crecimiento del folículo ovulatorio, a un mayor tamaño del cuerpo lúteo con concentraciones séricas de progesterona más elevadas, y con un ambiente uterino mejor programado para recibir el embrión.

Uso de eCG en el protocolo J-Synch

En los siguientes experimentos evaluamos el uso de eCG al retirar el dispositivo en el protocolo J-Synch. Para esto realizamos dos experimentos, en uno estudiamos si la adición de eCG mejora la tasa de preñez, y en el siguiente evaluamos el efecto de la eCG a nivel ovárico mediante ultrasonografía y determinaciones hormonales, y a nivel uterino mediante Real-Time PCR e inmunohistoquímica de biopsias endometriales. La publicación de estos resultados está en proceso de redacción (Núñez-Olivera *en redacción*).

Para evaluar la tasa de preñez se realizaron 6 réplicas sobre un total de 2.598 vaquillonas de razas británicas ubicadas en diferentes establecimientos de Uruguay. En cada réplica las vaquillonas fueron evaluadas por condición corporal y actividad ovárica al iniciar el tratamiento (47 a 72% de vaquillonas con cuerpo lúteo), y todas recibieron el protocolo J-Synch tal como se describió en los experimentos anteriores utilizando dispositivos de 0,5 g de progesterona (DIB 0,5, Syntex/Zoetis, Argentina). Al retirar el dispositivo la mitad de cada lote recibió 300 UI de eCG (Novormon, Syntex/Zoetis, Argentina). Para ambos grupos la IATF fue realizada a las 60 o a las 72 horas de retirar el dispositivo y los resultados se muestran en la Tabla 2. La tasa de preñez fue significativamente mayor en las vaquillonas que recibieron eCG (57,1%, 739/1.295) vs. las que no recibieron eCG (53,1%, 692/1.303; $P < 0,05$). Cuando se administró esta hormona no hubo diferencias entre las que recibieron la IATF a las 60 o a las 72 horas, permitiendo una amplia ventana de inseminación para trabajar a gran escala. Si bien la magnitud de esta diferencia no fue muy grande (4 puntos porcentuales en promedio), la misma se mantuvo tanto en las vaquillonas que tenían un cuerpo lúteo como las que estaban en anestro al iniciar el tratamiento ($P = NS$).

Tabla 2. Tasa de preñez obtenida con el protocolo J-Synch en vaquillonas asociado o no con 300 UI de eCG al retirar el dispositivo con progesterona.

		Con eCG	Sin eCG	P
Réplica I (n=296) 47% con CL	GnRH 60h	52,9% (38/72)	48,6% (36/74)	NS
	GnRH 72h	42,9% (33/77)	26,0% (19/73)	0,05
Réplica II (n=307) 48% con CL	GnRH 60h	49,3% (36/73)	47,6% (39/82)	NS
	GnRH 72h	51,3% (41/80)	44,4% (32/72)	NS
Réplica III (n=175) 54% con CL	GnRH 60h	70,5% (31/44)	66,0% (31/47)	NS
	GnRH 72h	76,3% (29/38)	54,3% (25/46)	NS
Réplica IV (n=209) 45% con CL	GnRH 60h	50,0% (26/52)	63,0% (34/54)	NS
	GnRH 72h	53,8% (28/52)	51,0% (26/51)	NS
Réplica V (n=444) 71% con CL	GnRH 60h	60,7% (65/107)	61,1% (69/113)	NS
	GnRH 72h	67,3% (76/113)	62,2% (69/111)	NS
Réplica VI (n=1.167) 72% con CL	GnRH 60h	59,7% (172/288)	56,0% (172/307)	NS
	GnRH 72h	54,8% (164/299)	51,3% (140/273)	NS
Total n=2.598	GnRH 60h	57,9% (368/636)	56,3% (381/677)	NS
	GnRH 72h	56,3% (371/659)	49,7% (311/626)	0,018
<i>P</i>		NS	0,017	

En un siguiente estudio, considerando los resultados recién presentados y además que previamente habíamos encontrado varios efectos favorables a nivel ovárico con la eCG en el protocolo convencional (Núñez-Olivera *et al.*, 2014), evaluamos su uso en el protocolo J-Synch combinándolo con un proestro más corto o más prolongado. Para esto realizamos un experimento en Florida, Uruguay, utilizando 46 vaquillonas Hereford y Angus de dos años en anestro. Las vaquillonas recibieron el protocolo J-Synch y la mitad de ellas recibieron 300 UI de eCG (Novormon, Syntex/Zoetis, Argentina) al retirar el dispositivo, la mitad de cada grupo recibió una dosis de GnRH a las 48 horas y la otra mitad a las 72 horas del retiro. Las diferencias más claras entre los diferentes tratamientos en este experimento se encontraron en el momento de la ovulación y en las concentraciones séricas de estradiol. El intervalo desde el retiro del dispositivo a la ovulación no estuvo afectado por el uso de eCG, pero sí por la administración de GnRH a las 48 vs. a las 72 horas ($81,1 \pm 6,5$ vs. $91,6 \pm 4,1$, respectivamente; $P < 0,05$). Para evaluar las concentraciones séricas de estradiol los datos fueron normalizados al momento de la ovulación, y hubo un efecto significativo del tratamiento con eCG, así como del tratamiento con GnRH a las 48 vs. a las 72 horas (sin interacción). Por una parte, el tratamiento con eCG prolongó la curva de estradiol en la etapa final del desarrollo folicular siendo más alta al momento de la ovulación. Por otra parte, aquellas hembras que recibieron GnRH a las 72 horas tuvieron más tiempo para que el folículo ovulatorio se desarrolle y los niveles de estradiol fueron mayores por más tiempo que cuando la GnRH se administró a las 48 horas. Las vaquillonas que mostraron concentraciones más altas y por mayor tiempo, fueron aquellas que recibieron eCG y la GnRH se administró a las 72 horas. En resumen, estos resultados muestran cierto beneficio de prolongar el proestro y administrar eCG sobre las concentraciones preovulatorias de estradiol, que podrían explicar los mejores resultados obtenidos sobre la tasa de preñez.

Momento de IATF y proestro largo vs. corto

Para avanzar sobre los resultados del experimento previo utilizando J-Synch, nos planteamos estudiar en un mayor número de vaquillonas el efecto de administrar la GnRH (siempre junto con la IATF) a las 48, 60 o 72 horas de retirado el dispositivo. Esto nos permitiría conocer con precisión el mejor momento para la IATF utilizando este protocolo, además de confirmar el beneficio de prolongar el proestro. El estudio se realizó en dos predios ubicados en Rocha y en Florida, Uruguay, utilizando 911 vaquillonas Angus y cruce Hereford de dos años. En este experimento todas las vaquillonas recibieron el protocolo J-Synch con dispositivos de 0,5 g junto con 300 UI de eCG al retirar el dispositivo (Syntex/Zoetis, Argentina). En este momento, las vaquillonas fueron divididas en tres grupos experimentales para recibir IATF/GnRH a las 48, 60 o 72 horas luego del retiro del dispositivo. En este experimento, además de la metodología descrita para los experimentos previos, colocamos pintura en la base de la cola al momento del retiro del dispositivo para identificar cuales hembras manifestaban estro al momento de la IATF, y además realizamos una ecografía de ovario al momento de la IATF/GnRH para determinar el diámetro del folículo preovulatorio. Los tres grupos fueron inseminados con los mismos toros y las mismas partidas de semen asignadas de manera balanceada. El diámetro del folículo ovulatorio aumentó en la medida que se prolongó la duración del proestro ($P < 0,05$). Asimismo, el porcentaje de vaquillonas en estro tendió a ser mayor cuando la IATF se realizó a las 72 horas ($P < 0,1$). La tasa de preñez también se vio favorecida con el proestro prolongado, alcanzando diferencias significativas en las vaquillonas cíclicas donde fue mayor con la IATF/GnRH a las 72 horas vs. 48 horas (77% $n = 173$ vs. 68% $n = 158$, respectivamente; $P < 0,05$). En general, los resultados para la IATF/GnRH a las 60 horas fueron intermedios. En este experimento también encontramos que un 10,7% de las vaquillonas habían ovulado cuando la IATF se realizó a las 72 horas, mientras que solo un 1,7% lo habían hecho cuando la IATF se realizó a las 48 horas. En resumen, estos resultados confirman que es mejor prolongar el proestro y realizar la IATF más cerca de las 72 horas que de las 48 horas, principalmente en vaquillonas cíclicas que poseen un cuerpo lúteo al colocar el dispositivo.

Uso de pintura con J-Synch

Considerando los resultados previos, se planteó la hipótesis que las vaquillonas que muestran estro más tarde deberían ser inseminadas a las 72 horas, pero aquellas que manifiestan estro más temprano quizás se podría adelantar la inseminación sin afectar la tasa de preñez. Para esto se debería identificar aquellas hembras que manifiestan estro anticipadamente. Para responder a esta pregunta se utilizaron 1.283 vaquillonas cruce Angus y Hereford en tres réplicas realizadas en tres establecimientos ubicados en los Dptos. de Tacuarembó, Paysandú y Salto en Uruguay. Todas las vaquillonas recibieron el mismo protocolo J-Synch descrito anteriormente utilizando dispositivos de 0,5 g de progesterona y 300 UI de eCG. Al retirar el dispositivo se pintaron las vaquillonas en la base de la cola para registrar cuales manifestaban estro al momento de la IATF. La mitad del rodeo recibió IATF/GnRH a las 60 horas y la otra mitad a las 72 horas luego del retiro del dispositivo, independientemente del estado de la pintura. De esta manera en ambos momentos de IATF se inseminaron vaquillonas que habían manifestado o no estro. A las 60 horas se chequeó la pintura en todas las vaquillonas y en un 79% de ellas (1.014/1.283) se encontraba alterada; la tasa de preñez fue mayor en las que habían presentado estro que en las que no lo habían hecho (53,6%, 542/1.012 vs. 45,0%, 122/271, respectivamente; $P < 0,05$). La tasa de preñez

en las vaquillonas que estaban en estro a las 60 horas fue similar cuando la IATF/GnRH se realizó a las 60 o a las 72 horas. Sin embargo, en las que no habían manifestado estro a las 60 horas, la tasa de preñez fue mayor cuando la IATF/GnRH se realizó a las 72 horas. La implicancia práctica que tiene este resultado es que cuando existen lotes numerosos se podría retirar el dispositivo en la tarde del Día 6, evaluar la pintura a las 60 horas en todo el rodeo (Día 9 AM), y comenzar en la mañana a inseminar las vaquillonas con pintura alterada y dejar para inseminar a la tarde (a las 72 horas) aquellas que no manifiestan estro. Este manejo lo hemos implementado como rutina en nuestra práctica cuando realizamos programas comerciales a gran escala.

¿Es necesario el uso de GnRH?

A partir de los resultados encontrados en los experimentos previos donde en general se observaba un 75 o 85% de las vaquillonas con la pintura alterada a las 60 horas, se propuso evaluar la necesidad de administrar la dosis de GnRH al momento de la IATF. Para esto se realizó un experimento con 1.879 vaquillonas Angus en cuatro réplicas en dos establecimientos de Rivera y en Rocha, Uruguay. Al igual que en los experimentos previos todas las vaquillonas recibieron el protocolo J-Synch utilizando un dispositivo de 0,5 g de progesterona y 300 UI eCG al retirar el dispositivo (Syntex/Zoetis, Argentina). El dispositivo se retiró el Día 6 en la tarde y se evaluó la pintura a las 60 horas más tarde (en la mañana del Día 9). Todas las vaquillonas con la pintura alterada a las 60 horas (85%; 1.594/1.879) recibieron IATF en ese momento, pero solo se administró GnRH a la mitad de ellas ($n = 802$) mientras que el resto se inseminó sin aplicar el inductor de la ovulación ($n = 792$). Las vaquillonas que sin manifestación de estro a las 60 horas, recibieron una dosis de GnRH a las 72 horas junto con la IATF. La tasa de preñez en las vaquillonas que manifestaron estro fue similar entre las que recibieron o no GnRH (56,2% 451/802; vs. 58,6% 464/792, respectivamente). La tasa de preñez en las vaquillonas que no mostraron estro y que recibieron la IATF/GnRH a las 72 horas fue 40,4% (115/285). Estos resultados en las vaquillonas que manifestaron estro tienen implicancias prácticas interesantes, ya que en la medida que se utilice pintura para detectar el estro se podría disminuir el costo del tratamiento omitiendo el uso de la GnRH.

J-Synch en vacas

La mayor parte de los experimentos con el protocolo J-Synch fueron realizados en vaquillonas y existe poca información con vacas en anestro posparto. Recientemente se han realizado una serie de experimentos en vacas con cría al pie en Argentina cuyos datos están siendo procesados y analizados. En Uruguay realizamos una serie de estudios en vacas en anestro con destete precoz utilizando el protocolo J-Synch. Las preguntas a responder fueron: ¿a qué hora es conveniente realizar la IATF? ¿es necesario utilizar pintura? y en ese caso ¿podría omitirse la administración de GnRH? Se realizó un experimento en 10 réplicas sobre un total de 1.900 vacas con 60 a 90 días posparto, donde todas las vacas fueron separadas definitivamente de sus terneros entre uno a cinco días antes de iniciar el tratamiento. El protocolo fue el mismo que el descrito para vaquillonas, utilizando un dispositivo de 0,5 g de progesterona junto con una dosis de 2 mg de EB al Día 0 en la tarde, una dosis de PGF y eCG (400 UI en vacas, Novormon) al Día 6 en la tarde al retirar el dispositivo, y la IATF al Día 9 durante todo el día (entre las 60 y 72 horas del retiro del dispositivo). Todos los productos fueron elaborados por Syntex, Argentina. Todas las vacas fueron pintadas en la base de la cola al retirar el dispositivo y la pintura fue chequeada a las

60 horas más tarde. La mitad de las vacas que manifestaron estro recibieron una IATF a las 60 h y la otra mitad a las 72 h, y a su vez la mitad de los animales en cada hora de IATF recibió GnRH y la otra mitad no recibió ningún inductor de la ovulación. Las vacas que no manifestaron estro a las 60 horas, también se dividieron en dos grupos para recibir la IATF a las 60 o a las 72 horas, pero en este caso siempre con una dosis de GnRH junto con la inseminación. El 80% (1.515/1.900) de las vacas tenían la pintura borrada a las 60 horas indicando que ya habían manifestado estro; en estas vacas no hubo diferencia entre las que recibieron IATF a las 60 o las 72 horas (66,0%, 529/802 vs. 63,0%, 450/714, respectivamente). En estas hembras en estro tampoco hubo diferencias significativas entre las que recibieron o no recibieron GnRH (66,0%, 499/756 vs. 63,0%, 479/760, respectivamente). Por otra parte, en las que no presentaban estro a las 60 horas tampoco hubo diferencia en la tasa de preñez cuando recibieron la IATF/GnRH a las 60 o a las 72 h (53,9% 112/208, vs. 55,1% 97/176, respectivamente). La única diferencia encontrada en la tasa de preñez en este experimento, independientemente de la hora de IATF y de la administración o no de GnRH, fue entre las que habían manifestado estro (64,6% 979/1.516) y las que no habían manifestado estro a las 60 horas (54,4% 209/384). Estos resultados indican que en vacas con destete precoz es posible aplicar el protocolo J-Synch y obtener resultados aceptables (62,5% en este caso) y realizar la IATF entre las 60 y 72 horas con resultados similares entre ambos momentos de inseminación. Asimismo, si se utiliza pintura al retirar el dispositivo es posible evitar el uso de GnRH al momento de la IATF en aquellas vacas que manifestaron estro.

J-Synch en receptoras de embriones

Se realizaron una serie de experimentos en Uruguay sobre 4.606 receptoras que fueron transferidas con embriones producidos *in vitro* (PIV) para evaluar algunos efectos del protocolo J-Synch que aún no estaban completamente claros. Además de avanzar en la comprensión del efecto del proestro prolongado sobre el establecimiento de la gestación, desde el punto de vista práctico interesaba conocer si este protocolo podría ser utilizado en programas de transferencia de embriones *in vitro* a gran escala. En una serie de cuatro experimentos realizados en varias réplicas cada uno, se utilizaron embriones Holstein producidos por fertilización *in vitro* (FIV) con semen sexado (hembra) que fueron transferidos en receptoras cruce Hereford o Angus. Parte de estos resultados fueron publicados en forma preliminar en el *International Congress on Animal Reproduction* (Menchaca *et al.*, 2016), agregando luego algunas réplicas pendientes. Todos los productos fueron elaborados por Syntex (Argentina) y se utilizaron las mismas dosis que las descritas para los experimentos anteriores.

En el primer experimento el objetivo fue determinar si el efecto favorable del protocolo J-Synch frente al protocolo convencional encontrado previamente con IATF, se mantendría en receptoras colocando embriones de otro origen. Así se quitaría el efecto del tratamiento sobre el ovocito, sobre el transporte espermático y la fecundación, o sobre el desarrollo embrionario temprano. Dado que evaluar el efecto del tratamiento sobre la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario temprano implica cierta dificultad, se avanzó con este otro abordaje donde se utilizaron embriones producidos *in vitro* que fueron transferidos en receptoras que recibieron ambos tratamientos de sincronización. Así se evaluó el efecto del tratamiento sobre el factor materno postovulatorio. Se transfirieron 945 embriones en 5 réplicas. Todas las hembras recibieron en el Día 0 un dispositivo intravaginal 0,5 g de progesterona (DIB 0.5, Syntex, Argentina) más 2 mg de EB i.m. (Syntex). En las vacas que

recibieron el protocolo convencional con progesterona + ECP ($n = 481$), se retiró el DIB al Día 7 por la mañana y se administró 500 μg de cloprostenol (Ciclase DL, Syntex), 400 UI de eCG (Novormon, Syntex) y 0,5 mg de ECP. En las vacas que recibieron el protocolo J-Synch ($n = 464$), el DIB se retiró el Día 6 por la mañana y se administró la misma dosis de cloprostenol y eCG que en el otro grupo, mientras que como inductor de la ovulación se utilizó una dosis de GnRH (100 μg de acetato de gonadorelina, Gonasyn Gdr, Syntex) a las 72 h luego del retiro del dispositivo. La transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) se realizó al Día 16 y 17, utilizando blastocistos producidos por FIV con semen sexado. El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía a los 60 días después de la FIV. Al igual que en los otros experimentos los datos se analizaron mediante MLGM. La tasa de concepción fue 8,4 puntos porcentuales más alta en el protocolo J-Synch (49,3%, 229/464) que en el protocolo convencional (40,9%, 197/481, $P < 0,05$), y esta diferencia se mantuvo en todas las réplicas en un rango que fue de 4 a 14 puntos porcentuales a favor de este protocolo. No se encontró ningún efecto significativo para el día de la transferencia de embriones (TETF en el Día 16: 45,9%, 249/543, TETF en el Día 17: 44,3%, 178/402, $P = \text{NS}$). En conclusión, el protocolo J-Synch permitió mejores resultados en la tasa de concepción que el protocolo convencional, siendo un tratamiento eficaz para aplicar en programas comerciales. Este resultado sugiere que el efecto favorable del proestro prolongado encontrado en los experimentos previos, podría estar más vinculado a un factor materno postovulatorio que a un efecto sobre la calidad del ovocito.

Luego de obtener estos resultados se realizó otro experimento utilizando únicamente el protocolo J-Synch manteniendo el proestro prolongado, pero comparando el uso de GnRH o EB como inductor de la ovulación. Se utilizaron 1.143 receptoras cruce Hereford y Angus en siete réplicas que recibieron el mismo protocolo J-Synch descrito en el experimento previo, considerando el Día 0 como el momento en que se colocó el dispositivo y se administró el EB. En este experimento la mitad de las receptoras fue tratada con GnRH a las 72 horas del retiro del dispositivo ($n = 568$) y la otra mitad recibió 1,0 mg de EB a las 60 horas ($n = 575$). La TETF se realizó al Día 16 y 17 utilizando embriones en estadios de blastocisto (principalmente expandidos) y el diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía a los 60 días después de la FIV. Se transfirieron 1.011 embriones con una tasa de aprovechamiento (receptoras transferidas/sincronizadas) que no fue significativamente diferente entre las receptoras tratadas con GnRH o EB (87,1% 495/568 vs. 89,7% 516/575, respectivamente; $P = \text{NS}$). La tasa de concepción (receptoras preñadas/transferidas) mostró una diferencia a favor del grupo con GnRH vs. con EB (60,0%, 297/495 vs. 53,9%, 278/516, respectivamente; $P = 0,049$), si bien la tasa de preñez (receptoras preñadas/sincronizadas) fue similar entre ambos tratamientos (52,3%, 297/568 vs. 48,3%, 278/575, respectivamente; $P = \text{NS}$). En conclusión, con el uso de GnRH a las 72 horas se logra una alta tasa de concepción superior al uso de EB a las 60 horas, que en este caso fue del 60% lo que es muy alta si consideramos que se utilizaron embriones PIV con semen sexado y transferidos a tiempo fijo.

En un tercer experimento se evaluaron dos momentos diferentes para administrar la GnRH con el protocolo J-Synch (60 horas vs. 72 horas luego del retiro del dispositivo). En este caso la diferencia en la duración del proestro sería solamente de 12 horas, pero en términos prácticos se podría contar con dos horarios para administrar la GnRH. Se utilizaron 1.077 receptoras en seis réplicas y todas fueron sincronizadas con el protocolo J-Synch tal como fue descrito en los experimentos previos, considerando el Día 0 como el momento en que se colocó el dispositivo y se administró el EB. Luego de retirar el dispositivo, la mitad

de las receptoras fue tratadas con una dosis de GnRH a las 60 horas ($n = 541$) y la otra mitad a las 72 horas ($n = 536$). En el Día 16 o 17, 918 receptoras recibieron una TETF con embriones Holstein PIV con semen sexado. No se encontraron diferencias en la tasa de concepción entre el grupo con GnRH a las 72 vs. a las 60 horas (50,4% 235/466 vs. 47,8% 216/452, respectivamente; $P = \text{NS}$). Tampoco hubo diferencias en la tasa de preñez, aunque la GnRH a las 72 h mantuvo algunos puntos porcentuales por encima del grupo tratado a las 60 horas (43,8% 235/536 vs. 39,9% 216/541, $P = \text{NS}$). Los resultados indican que es posible administrar la GnRH como inductor de la ovulación a las 60 o 72 horas luego de retirar el dispositivo obteniendo resultados similares.

Finalmente en otro experimento se evaluó la necesidad o no de administrar GnRH como inductor de la ovulación luego del protocolo J-Synch. El diseño experimental fue muy similar a los anteriores utilizando 1.441 receptoras en siete réplicas tratadas con el mismo protocolo descrito en los experimentos previos, considerando el Día 0 como el momento en que se colocó el dispositivo y se administró el EB. En este experimento la mitad de las receptoras recibió GnRH a las 72 h luego de retirar el dispositivo ($n = 733$) y la otra mitad ($n = 708$) no recibió ningún inductor de la ovulación dejando que el proestro se extendiera aún más hasta que la ovulación ocurriera de manera espontánea. Al igual que en los experimentos previos, en el Día 16 o 17 las receptoras recibieron una TETF con embriones Holstein PIV con semen sexado y el diagnóstico de gestación se realizó próximo a los 60 días luego de la FIV. De manera interesante, la tasa de concepción tendió a ser mayor en aquellas receptoras que no recibieron GnRH ocurriendo la ovulación de manera espontánea (con GnRH 50,1% 340/679; sin GnRH 55,3% 348/629; $P = 0,057$). Sin embargo, la tasa de aprovechamiento fue en el sentido opuesto siendo mayor en las receptoras tratadas con GnRH que en las que no recibieron el inductor de la ovulación (92,6% 679/733 vs. 88,8% 629/708, respectivamente; $P < 0,05$). Estos resultados sugieren que si bien la duración de un proestro espontáneo (sin inductor de la ovulación) puede favorecer la fertilidad, la administración de un inductor de la ovulación puede aumentar la proporción de vacas que ovulan optimizando así el uso de las mismas.

En conclusión, con estos resultados demostramos que el protocolo J-Synch puede ser utilizado con éxito en programas de TETF a gran escala con embriones PIV con semen sexado. Los diferentes experimentos muestran que en la medida que se prolonga la duración del proestro de la receptora, se mejora la tasa de concepción. Sumado a esto, los resultados sugieren que el efecto favorable del proestro prolongado estaría probablemente más vinculado al componente materno postovulatorio que a un efecto sobre el ovocito o sobre la fecundación.

Conclusiones

En conclusión, hemos evaluado el efecto de la prolongación del período de proestro mediante el protocolo J-Synch (que acorta el tratamiento con progesterona y sustituye estradiol por GnRH al momento de la IATF). Este protocolo se inicia con 2 mg de EB al colocar el dispositivo con progesterona que se mantiene por 6 días y se asocia a una dosis de PGF al retirar el dispositivo. Este protocolo aumenta la tasa de preñez comparado con el protocolo convencional de 7 u 8 días con estradiol, más aún cuando se utiliza eCG al retirar el dispositivo. El horario recomendable para la IATF/GnRH es a las 72 horas luego de retirar el dispositivo. Para ampliar el momento de IATF y poder trabajar a gran escala, es posible realizar el chequeo del estro por única vez a las 60 horas mediante el uso de pintura en la

base de la cola, y así poder inseminar en ese momento aquellas hembras en estro. En este esquema, aquellas vaquillonas que aún no están en estro a las 60 horas es recomendable que reciban la IATF/GnRH a las 72 horas. Sumado a esto, el uso de pintura para realizar un único chequeo al momento de la inseminación permite ahorrarnos la administración de GnRH en aquellas vaquillonas o vacas que se encuentran en estro a la IATF. También hemos encontrado resultados favorables con el uso de este protocolo en receptoras con TETF de embriones producidos *in vitro*.

Estos resultados han sido obtenidos en diversos estudios sobre más de 15 mil animales. Sin embargo, este protocolo J-Synch aún debe ser evaluado en vacas con cría al pie. Si bien los resultados también han sido buenos en vacas *Bos taurus* de carne con destete precoz realizado a los 60-90 días posparto, es necesario validarlo en condiciones más críticas como vacas de carne con amamantamiento permanente y vacas lecheras. Actualmente nos encontramos evaluando este protocolo en programas de IATF bajo dichas condiciones. Resultados promisorios también hemos obtenido con el uso de semen sexado asociado a este protocolo y los primeros datos están presentados en este mismo Congreso (Bó *et al.*, 2017).

Referencias

- Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:17–32.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:479–86.
- Baruselli PS, Sá Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim* 2012;47(Suppl 4):134–41.
- Binelli M, Pugliesi G, de Oliveira Santana Batista E, Martins T, Lopes E, Sponchiado M, Gonella-Diaza A, Oliveira M, Rodrigues França M, de Oliveira Cardoso B, Piffero Mello B, Souza Gomes N, Latorraca L, Cuellar Cuadros F. Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte. *Rev Bras Reprod Anim* 2017;41:121-129.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 39: 193-204.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995b;43:31–40.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53–72.
- Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Maraña, D., Baruselli, P.S. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64: 223-236
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim Reprod* 2013;10:137–42.
- Bó G.A., de la Mata J.J., Baruselli P.S., Menchaca A. 2016. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86:388-396.

- Bridges GA, Ahola JK, Brauner C, Cruppe LH, Currin JC, Day ML, et al. Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F2a in the five-day CO-Synch β controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *J Anim Sci* 2012;90:4814–22.
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 2008;69:843–51.
- Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML. Influence of length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci* 2010;117:208–15.
- Bridges GA, Mussard ML, Helser LA, Day ML. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch β CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology* 2014;81:632–8.
- Colazo M.G., Kastelic J.P. and Mapletoft R.J. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855-865.
- Colazo MG, Davis H, Rutledge MD, Kastelic JP, Martinez MF, Small JA, et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Domest Anim Endocrinol* 2008;34:109–17.
- Colazo MG, Ambrose DJ. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology* 2011;76:578–88.
- Cruppe LH, Maquivar M, Jinks EM, Fogle GE, Mussard ML, Pires AV, et al. The influence of two doses of PGF2a given at 2 or 12 hour intervals on luteolysis and pregnancy rate to timed AI with the 5-d CO-Synch β CIDR program. *J Anim Sci* 2010;88(Suppl 2):767 (abstract).
- Cruppe LH, Day ML, Abreu FM, Kruse S, Lake SL, Biehl MV, et al. The requirement of GnRH at the beginning of the five-day CO-Synch β controlled internal drug release protocol in beef heifers. *J Anim Sci* 2014;92:4198–203.
- Day ML. State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim Reprod* 2015;12:473–8.
- de la Mata JJ, Bó GA. Estrus synchronization and ovulation using protocols with estradiol benzoate and GnRH and reduced periods of insertion of a progesterone releasing device in beef heifers. *Taurus* 2012;55:17–23.
- de la Mata JJ, Menchaca A, Bó GA. Treatment with estradiol and progesterone that pronged the proestrus. In: Caccia M, Bó GA, editors. *Proceedings XI International Symposium on Animal Reproduction*. Córdoba, Argentina: Institute of Animal Reproduction Cordoba (IRAC); 2015. p. 143–58.
- de la Mata JJ, Ré M, Bó GA. Combination of estrus detection and fixed-time artificial insemination in beef heifers following a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reprod Fertil Dev* 2015;27:96 (abstract).
- Dias FCF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ, Adams GP, Singh J. Progesterone concentration, estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers. *Domest Anim Endocrinol* 2010;39:155–62.
- Diskin, MG and Sreenan, JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fert.* 1980; 59: 463-468.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23: 211–28.

- Fátima LA, Baruselli PS, Gimenes LU, Binelli M, Rennó FP, Murphy BD, et al. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:998–1011.
- Geary TW, Whittier JC, Hallford DM, MacNeil MD. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-synch protocols. *J Anim Sci* 2001;79:1–4.
- Huguenine E, Peracchia S, Benitez R, Martini H, Cledou G, Bó GA, et al. Effect of the utilization of 5-day CO-Synch protocols combined or not with eCG in suckled cows in postpartum anoestrus. In: Caccia M, Bó GA, editors. *Proceedings X Symposium on Animal Reproduction*. 2013. Córdoba, Argentina: Institute of Animal Reproduction
- Kasimanickam R, Day ML, Rudolph JS, Hall JB, Whittier WD. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology* 2009;71:762–7.
- Kasimanickam R, Asay M, Firth P, Whittier WD, Hall JB. Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef heifers synchronized with fiveday Co-Synch controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology* 2012;77:1624–31.
- Kasimanickam R, Firth P, Schuenemann GM, Whitlock BK, Gay JM, Moore DA, et al. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2a in a 5-day progesterone-based CO-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology* 2014;81:797–804.
- Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2a for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 2001;79:2253–9.
- Lima FS, Ayres H, Favoreto MG, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, et al. Effects of gonadotropin releasing hormone at initiation of the 5-d timed artificial insemination (AI) program and timing of induction of ovulation relative to AI on ovarian dynamics and fertility of dairy heifers. *J Dairy Sci* 2011;94:4997–5004.
- Lima FS, Ribeiro ES, Bisinotto RS, Greco LF, Martinez N, Amstalden M, et al. Hormonal manipulations in the 5-day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J Dairy Sci* 2013;96:1–12.
- Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Anim Reprod Sci* 2015;158:96–103.
- Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 1999;57:23–33.
- Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook RB, Olson WO, Mapletoft RJ. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 2002;57: 1049–59.
- Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of a progesterone-releasing device (CIDR) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *J Anim Sci* 2009;80:1746–51.
- Menchaca A, Chifflet N. Caracterización de la actividad ovárica al inicio del servicio en rodeos de cría en Uruguay. *Memorias de las XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay*, 2005.
- Menchaca A, Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Cuadro F. Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. *Semin Actual Técnica Cría Vacuna INIA* 2013;208:229–46.

- Menchaca A, Dutra S, Carrau JM, Sapriza F, Bo GA. Improvements of the new J-Synch protocol used for fixed time embryo transfer (FTET) in beef cattle recipients transferred with in vitro produced embryos. Proceedings of the ICAR 2016, Tours, France, pp 506.
- Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Bó GA, Piaggio J, Menchaca A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol-based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2014;146:111–6.
- Peel RK, Seabrook JL, Seidel Jr GE, Whittier JC, Grove AV, Ahola JK. Effect of 2, 4, and 5-hour interval between 2 prostaglandin F2a injections administered with the 5-d CO-Synch þ CIDR protocol on pregnancy rates in beef cows. *Prof Anim Sci* 2012;28:623–7.
- Peterson C, Alkar A, Smith S, Kerr S, Hall JB, Moore D, et al. Effects of one versus two doses of prostaglandin F2alpha on AI pregnancy rates in a 5-day progesterone-based, CO-Synch protocol in crossbred beef heifers. *Theriogenology* 2011;75:1536–42.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology* 1995;44: 915–23.
- Rabaglino MB, Risco C, Thatcher MJ, Kim IH, Santos JE, Thatcher WW. Application of one injection of prostaglandin F2alpha in the five-day Co-SynchþCIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *J Dairy Sci* 2010;93:1050-1058.
- Randi F. An integrated approach to improving the reproductive efficiency of seasonal calving beef cow herds in Ireland. Ph.D. Thesis. University College Dublin, 14 February 2017; 171 p.
- Rathbone, M.J., Kinder, J.E., Fike, K., Kojima, F., Clopton, D., Ogle, C.R., Bunt, C.R. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev* 50: 277-320.
- Rigoglio NN, Fátima LA, Hanassaka JY, Pinto GL, Machado ASD, Gimenes LU, et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 2013;79:673–9.
- Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JE, Perry GA, Baruselli PS. 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.
- Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRHbased, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 2009;71:698–706.
- Souto LA, Maquivar M, Mussard ML, Bridges GA, Grum DE, Day ML. Fertility and luteal regression with 5-d CIDR synchronization programs in postpartum beef cows using differing luteolytic treatments. *J Anim Sci* 2009;87(Suppl 2):372 (abstract).
- Whittier WD, Currin JF, Schramm H, Holland S, Kasimanickam RK. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch þ CIDR or 7-day CO-Synch þ CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology* 2013;80:963–969.