



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS SOBRE EL FOLÍCULO
OVULATORIO PARA MEJORAR LA TASA DE PREÑEZ EN
VAQUILLONAS DE CARNE**

Richard Núñez Olivera

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS SOBRE EL FOLÍCULO
OVULATORIO PARA MEJORAR LA TASA DE PREÑEZ EN
VAQUILLONAS DE CARNE**

Richard Núñez Olivera

Alejo Menchaca

Director

DMV, MSc., PhD

Gabriel A. Bó

Co-director

DMV, MSc., PhD

2021



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

TRIBUNAL EXAMINADOR DE DEFENSA DE TESIS

Marcelo Bertolini

DVM, MSc, PhD

Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Gustavo Gastal

DVM, MSc, PhD

Plataforma de Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

Jorge Gil

DVM, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria, CENUR Litoral Norte, UdelaR, Paysandú, Uruguay.

Presentación formal académica

21.XII.21

Fundación IRAUy

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



ACTA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Producción Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Plataforma zoom, 21 de diciembre de 2021 – 14:00 hs

TRIBUNAL: Jorge Gil, Gustavo Gastal, Marcelo Bertolini

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3794707-1	Nuñez Olivera, Richard	SSS	12

FUNDAMENTACIÓN

La tesis presenta un volumen importante de información científicamente convalidada por publicaciones en revistas internacionales arbitradas de alto impacto; el contenido es original para un tema de interés científico. La integración y secuencia de los 5 experimentos es correcta u conforman una excelente tesis, con una completa revisión bibliográfica adecuada a la temática. La presentación fue muy clara, con hipótesis y objetivos muy bien planteados. El diseño y la metodología son adecuados para la hipótesis, los resultados obtenidos responden los objetivos y las conclusiones tienen coherencia con el problema planteado. Durante la defensa el doctorando demuestra solidez y claridad conceptual con el trabajo, respondiendo con detalles a las preguntas del tribunal. El tiempo empleado fue adecuado con el volumen de información. El tribunal entiende que reúne todos los requisitos para un excelente.

TRIBUNAL

FIRMA

Jorge Gil

Gustavo Gastal

Marcelo Bertolini

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

*Apri la tua mente a quel ch'io ti paleso e trattenerlo entro; ch  la scienza non   fatta, senza
ritenzione di ci  che   stato capito.*

Dante Alighieri

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos de esta Tesis fueron realizados en establecimientos comerciales ubicados en diferentes departamentos de Uruguay. Los experimentos fueron financiados por distintos proyectos de investigación; por un lado, con el convenio entre el Laboratorio Syntex Uruguay, el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (Fundación IRAUy) y la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (FUNDACIBA) y, por otro lado, con el Proyecto Fondo María Viñas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, PR_FMV_3_2016_1_125451). Durante los primeros años de ejecución he usufructuado una beca de Doctorado otorgada por la ANII (POS_NAC_2015_1_110188).

Quiero agradecer de manera especial a:

Alejo Menchaca, por la dirección, supervisión, compartir sus conocimientos, colaboración e incentivo para la realización de esta Tesis.

Gabriel Bó, por la supervisión, compartir sus conocimientos, entusiasmo y ayuda en distintos momentos de la realización de esta Tesis.

Ana Meikle, por su colaboración de manera desinteresada y ayuda en distintos momentos de la realización de esta Tesis.

Mis compañeros del IRAUy (a los que están y a los que ya han seguido otros rumbos), Teresa de Castro, Marcela Vilariño, Andrea Pinczak, Camila García Pintos, Natalibeth Barrera, Camilinhã, Amanda y Juliana Brochado, Romina Artagaveytia, Rosalía Morales, Marcela Souza, Pedro Claudino dos Santos Neto, Federico Cuadro, Robert Wijma, Diego Bosolasco, Guido Kuffo Lara y Javier de la Mata quienes han colaborado en mayor o menor medida con esta serie de experimentos.

Al Laboratorio de Técnicas Nucleares / Endocrinología y Metabolismo Animal, y en especial a Victoria de Brun, Andrea Fernández, Gretel Ruprechter, Paula Pessina, Claudia Menezes e Isabel Sartore, con quienes he compartido varias jornadas procesando y analizando todas las muestras.

Federico Rubio, propietario de Syntex Uruguay y de los establecimientos Loma Azul, San Sebastián y El Rincón por facilitar los animales, las instalaciones, el personal de campo y principalmente por su buena disposición para apoyar y promover este proyecto.

Diego Rubio, director de Syntex Uruguay, por facilitar la ejecución y por su buena disposición para apoyar y promover este proyecto.

Ignacio Videla Dorna (quien ya ha partido), Lucas Cutaia y Tomás Díaz por el apoyo brindado desde Syntex Argentina.

Reynaldo Bonino y Andrés Peñagaricano responsables de los establecimientos Loma Azul, San Sebastián y El Rincón, por colaborar y participar de manera desinteresada en los trabajos de campo realizados.

Antonio Ortíz y su familia: Sandra, Ana y Marcos; personal del establecimiento San Sebastián por brindar la calidez en las largas estadias durante los experimentos.

Fernando Fabini, responsable del establecimiento El Valentino, por colaborar, participar de manera desinteresada y facilitar la ejecución en los trabajos de campo realizados.

Mi familia y amigos por estar siempre presentes y por su apoyo incondicional que me animan a seguir en esta evolución constante.

A todos aquellos que colaboraron de diferentes maneras y en la medida de sus posibilidades a la realización de esta Tesis, a ellos un sincero Muchas gracias.

DEDICATORIA

Esta Tesis está dedicada a mi hijo Lorenzo Renato y a mi esposa Ana Cecilia, quienes con su amor, paciencia, esfuerzo, comprensión y motivación me han permitido llegar a cumplir un sueño más, gracias por todo el apoyo.

También está a dedicada al resto de mi familia (a los que están y a los que ya partieron), mis padres Ramón y Gloria, por ser ejemplo de superación, constancia, humildad, forjar a ser mejores personas, apoyo y guía a través de las batallas de esta vida. A mis hermanos Raúl, Nancy y Lorena y a mis sobrinos Ana Clara, Celeste, Gonzalo, Santiago, Ignacio, Esmeralda, Mateo, Juan Bautista y Fernanda por formar una casi perfecta gran familia. Pilar fundamental en la vida de muchos seres humanos.

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

Esta Tesis reúne información generada en una serie de cinco experimentos que dieron lugar a tres publicaciones en forma de *Full Papers* en revistas internacionales de alto impacto. En el manuscrito central de la Tesis se presentan los aspectos más destacados de cada publicación. Las versiones completas de los artículos se anexan al final y aparecen citadas en el texto de acuerdo con el siguiente orden.

- I. Is prostaglandin $F_{2\alpha}$ administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based treatment for FTAI an effective strategy in *Bos taurus* heifers? Núñez–Olivera R., Cuadro F., Menchaca A. (2019). *Animal Reproduction Science* 210, 106201.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106201>

- II. Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed–time. Núñez–Olivera R., Cuadro F., Bosolasco D., de Brun V., de la Mata J., Brochado C., Meikle A., Bó G.A., Menchaca A. (2020). *Theriogenology* 151: 16–27.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.031>

- III. Association between length of proestrus, follicular size, estrus behavior, and pregnancy rate in beef heifers subjected to fixed–time artificial insemination. Núñez–Olivera R., Bó G.A., Menchaca A. (2022). *Theriogenology* 181: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.028>

La siguiente publicación fue realizada durante el transcurso del Doctorado, si bien pertenece a una continuación de los trabajos realizados para la Maestría sirvió como antecedentes en cierta medida para uno de los trabajos del Doctorado.

- IV. Equine chorionic gonadotropin administration after insemination affects luteal function and pregnancy establishment in postpartum anestrous beef cows. Núñez–Olivera R., de Castro T., Bó G.A., Piaggio J., Menchaca A. (2018). *Domestic Animal Endocrinology* 62: 24–31.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.08.003>

RESUMEN

El objetivo de esta tesis es determinar el efecto de diferentes estrategias hormonales sobre la actividad ovárica preovulatoria, la producción de progesterona y funcionalidad uterina luego de la ovulación, así como la tasa de preñez en vaquillonas de carne. Se realizaron 5 experimentos en vacas nulíparas cruce Angus de dos años. En los Experimentos I y II se determinó el efecto a nivel ovárico de la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al inicio y al final de un tratamiento de sincronización de la ovulación, y el efecto de este tratamiento sobre la tasa de preñez. Los resultados mostraron que la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al colocar el dispositivo reduce las concentraciones de progesterona durante el tratamiento con el dispositivo intravaginal, aumenta el tamaño del folículo ovulatorio y reduce el intervalo entre el retiro del dispositivo y la ovulación. Sin embargo, la tasa de preñez no fue diferente entre ambos tratamientos, concluyendo que puede administrarse una dosis única de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al finalizar un protocolo con progesterona sin afectar la tasa de preñez con IATF. En los Experimentos III y IV, se determinó el efecto de la administración de eCG al final de un protocolo para IATF con diferente duración del intervalo entre el retiro del dispositivo con progesterona y la administración de GnRH como inductor de la ovulación (intervalo definido como proestro en el protocolo J-Synch). Las vaquillonas fueron sometidas a un proestro corto (48 h) vs. un proestro prolongado (72 h) donde se evaluó la respuesta ovárica preovulatoria, la funcionalidad uterina subsiguiente y la tasa de preñez. La administración de GnRH a las 48 h vs. a las 72 h de retirado el dispositivo con progesterona adelantó la ovulación. Las concentraciones de progesterona luego de la ovulación fueron mayores cuando se administró GnRH a las 72 h de retirado el dispositivo. El tratamiento con eCG si bien no afectó el desarrollo folicular preovulatorio, se asoció con una mayor presencia de receptores de progesterona en el epitelio luminal en aquellas vaquillonas que recibieron GnRH a las 72 h. Además, la administración de eCG al final del tratamiento con proestro prolongado mejoró la tasa de preñez luego de la IATF. Estos resultados sugieren que extender la longitud del proestro aumenta la exposición uterina al estradiol endógeno producido por el folículo ovulatorio y que puede afectar la funcionalidad uterina. En el Experimento V, se determinó la relación entre la duración del proestro, el diámetro del folículo preovulatorio y la tasa de preñez utilizando el protocolo J-Synch. Las vaquillonas recibieron una dosis de GnRH a las 48, 60 o 72 h luego de retirado el dispositivo con progesterona. En la medida que se prolongó la duración del proestro, el diámetro del folículo preovulatorio aumentó y el porcentaje de vaquillonas en celo tendió a ser mayor cuando la IATF se realizó a las 72 h de retirado el dispositivo. La tasa de preñez también se vio favorecida con el proestro prolongado, con diferencias significativas para aquellas vaquillonas con presencia de cuerpo lúteo al inicio del tratamiento. Estos resultados confirman los beneficios de prolongar el proestro a 72 h, aumentando la respuesta ovárica, la expresión del estro y la tasa de preñez. En suma, los resultados de estos 5 experimentos soportan la hipótesis de que la implementación de alternativas farmacológicas y la prolongación del proestro mejoran las condiciones

ovulatorias; y el ambiente uterino post-ovulatorio, mejora con la prolongación del proestro. La administración de eCG al final de un tratamiento de 6 días con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) mejora la tasa de preñez. La combinación de estas estrategias favorece la función luteal y el ambiente uterino post-ovulatorio, e incrementa la tasa de preñez final en vaquillonas de carne *Bos taurus*.

Palabras clave: *ovulación, reconocimiento materno de la gestación, reproducción, bovinos.*

SUMMARY

This thesis work aimed to determine the effect of different hormonal strategies on preovulatory ovarian activity, progesterone production and uterine functionality after ovulation, as well as the pregnancy rate in beef heifers. Five experiments were conducted to accomplish these objectives on two-year-old Angus cross nulliparous cows. In Experiments I and II, the effect at the ovarian level of the administration of PGF_{2α} at the beginning and at the end of an ovulation synchronization treatment, and the effect of this treatment on the pregnancy rate were determined. The results showed that the administration of PGF_{2α} at device placement reduces progesterone concentrations during treatment with the intravaginal device, increases the size of the ovulatory follicle, and reduces the interval between device removal and ovulation. However, the pregnancy rate was not different between the two treatments, concluding that a single dose of PGF_{2α} can be administered at the end of a protocol with progesterone without affecting the pregnancy rate for FTAI. In Experiments III and IV, the effect of the administration of eCG at the end of a protocol was determined with different duration of the interval between progesterone device removal and the administration of GnRH as an ovulation inducer (interval defined as proestrus in the J-Synch protocol). Heifers received a short proestrus (48 h) *vs.* a prolonged proestrus (72 h) and the preovulatory ovarian response, subsequent uterine functionality, and pregnancy rate were evaluated. Administration of GnRH at 48 h *vs.* 72 h after progesterone device removal advanced ovulation. Post-ovulation progesterone concentrations were higher when GnRH was administered at 72 h after device removal. Although treatment with eCG did not affect preovulatory follicular development, it was associated with a greater presence of progesterone receptors in the luminal epithelium in those heifers that received GnRH at 72 h. Furthermore, eCG administration at the end of the prolonged proestrus treatment improved the pregnancy rate after FTAI. These results suggest that extending the proestrus length increases uterine exposure to endogenous estradiol produced by the preovulatory follicle and may affect uterine functionality. In Experiment V, the relationship between the length of proestrus, diameter of the preovulatory follicle and pregnancy rate was determined using the J-Synch protocol. Heifers received a dose of GnRH at 48, 60, or 72 h after progesterone device removal. As the duration of proestrus was prolonged, the diameter of the preovulatory follicle increased and the percentage of heifers in estrous tended to be higher when the FTAI was performed at 72 h after device removal. The pregnancy rate was also favored with prolonged proestrus, with significant differences for those heifers with the presence of a corpus luteum at the beginning of treatment. These results confirm the benefits of prolonging proestrus to 72 h, increasing ovarian response, estrus expression, and pregnancy rate. In summary, results of these five experiments support the hypothesis that the implementation of pharmacological alternatives and the prolongation of the proestrus improve ovulatory conditions, and the post-ovulatory uterine environment improves with the prolongation of the proestrus. Administration of eCG at the end of a 6-day treatment with progesterone

and estradiol (J-Synch protocol) improves pregnancy rate. The combination of these strategies favors luteal function and the post-ovulatory uterine environment and increases the final pregnancy rate in *Bos taurus* beef heifers.

Keywords: *ovulation, maternal recognition of pregnancy, reproduction, cattle.*

TABLA DE CONTENIDO

Índice	Página
Capítulo 1	1
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA	5
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
Capítulo 2	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
METODOLOGÍA GENERAL	9
Animales e instalaciones	9
Ultrasonografía	9
Determinación de la condición corporal	10
Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales ..	11
Obtención de biopsias uterinas	12
Aislamiento y purificación de ARN, transcripción inversa y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	12
Inmunohistoquímica	14

Análisis de imágenes	15
Análisis estadístico	15
ESTRATÉGIA DE INVESTIGACIÓN	18
Experimento I	19
Experimento II	21
Experimento III	23
Experimento IV	25
Experimento V	27
Capítulo 3	29
RESULTADOS	29
Experimento I (publicación I)	
Efecto de la progesterona sobre la funcionalidad del cuerpo lúteo y las características del folículo ovulatorio	29
Experimento II (publicación I)	
Efecto de la progesterona inducida con PGF_{2α} al inicio del tratamiento sobre la tasa de preñez	32
Experimento III (publicación II)	
Efecto de la eCG en un tratamiento con proestro prolongado (protocolo J-Synch) sobre las características del folículo ovulatorio y la funcionalidad del cuerpo lúteo	34
Experimento IV (publicación II)	
Efecto de la prolongación del proestro sobre la tasa de preñez	45

Experimento V (publicación III)

Asociación entre el proestro prolongado, el diámetro folicular y la tasa de preñez46

Capítulo 453

DISCUSIÓN53

CONCLUSIONES63

Implicancias prácticas64

BIBLIOGRAFÍA65

ANEXO I

Is prostaglandin F_{2α} administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based treatment for FTAI an effective strategy in *Bos taurus* heifers? Núñez-Olivera R., Cuadro F., Menchaca A. (2019). *Animal Reproduction Science* 210, 106201.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106201>

ANEXO II

Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time. Núñez-Olivera R., Cuadro F., Bosolasco D., de Brun V., de la Mata J., Brochado C., Meikle A., Bó G.A., Menchaca A. (2020). *Theriogenology* 151: 16–27.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.031>

ANEXO III

Association between length of proestrus, follicular size, estrus behavior, and pregnancy rate in beef heifers subjected to fixed-time artificial insemination. Núñez-Olivera R., Bó G.A., Menchaca A. (2022). *Theriogenology* 181: 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.028>

ANEXO IV

Equine chorionic gonadotropin administration after insemination affects luteal function and pregnancy establishment in postpartum anestrous beef cows. Núñez-Olivera R., de Castro T., Bó G.A., Piaggio J., Menchaca A. (2018). *Domestic Animal Endocrinology* 62: 24–31.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.08.003>

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
2.1. Secuencias de cebadores, tamaños de amplicones esperados y eficiencia de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para los receptores de progesterona (PGR), receptor de estrógeno α (ESR1), proteína ribosómica L19 (RPL19), hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa (HPRT) y β -actina (BACT).....	14
3.1.1. Efecto de la administración de prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (grupo 2-PG) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (grupo 1-PG) en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL (promedio \pm SEM).....	30
3.2.1. Tasa de preñez obtenida luego de la administración de prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (grupo 2-PG) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (grupo 1-PG) en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL. Los resultados para vaquillonas de 2 años se resumen en el panel superior y para vaquillonas de 14 de meses en el panel inferior.	33
3.3.1. Efecto de la administración de eCG al inicio del proestro (<i>i.e.</i> : al momento del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona) combinada con la administración de GnRH a las 48 h o a las 72 h luego del retiro del dispositivo sobre el desarrollo del folículo ovulatorio en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.....	35

3.4.1. Tasa de preñez obtenida con la administración de eCG al inicio del proestro (<i>i.e.</i> : al momento del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona) en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch), y con GnRH / IATF a las 60 h o a las 72 h luego del retiro del dispositivo en vaquillonas de carne. Los efectos principales se resumen en el panel superior, y de acuerdo con la interacción ($P < 0,05$) los efectos simples se encuentran en el panel inferior.	45
3.5.1. Efecto de diferentes longitudes de proestro sobre el tamaño del folículo preovulatorio, la expresión del estro y la tasa de preñez en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.	46
3.5.2. Probabilidad de preñez para diferentes longitudes de proestro en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.	49
3.5.3. Interacción entre diferentes longitudes de proestro, presencia de cuerpo lúteo (CL) y expresión del estro sobre la tasa de preñez después de un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
2.1. Diseño experimental para el Experimento I. PGF _{2α} : prostaglandina F _{2α} , cloprostenol sódico 500 µg (dosis total), EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, ECP: cipionato de estradiol 0,5 mg, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, US: ultrasonografía ovárica, h: horas.	20
2.2. Diseño experimental para el Experimento II. PGF _{2α} : prostaglandina F _{2α} , cloprostenol sódico 500 µg (dosis total), EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, ECP: cipionato de estradiol 0,5 mg, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, h: horas, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.	22
2.3. Diseño experimental para el Experimento III. EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, PGF _{2α} : prostaglandina F _{2α} , cloprostenol sódico 500 µg, h: horas, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, acetato de gonadorelina 100 µg, US: ultrasonografía ovárica.	24
2.4. Diseño experimental para el Experimento IV. EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, PGF _{2α} : prostaglandina F _{2α} , cloprostenol sódico 500 µg, h: horas, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, acetato de gonadorelina 100 µg, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.	26

- 2.5. Diseño experimental para el Experimento V. EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, cloprostenol sódico 500 μg, eCG: gonadotrofina coriónica equina 300 UI, h: horas, Detección de celo: determinada en el momento de la IATF por la eliminación de la pintura en la base cola pintada (> 30%), US: ultrasonografía reproductiva, GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas, acetato de gonadorelina 100 μg, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo. **28**
- 3.1.1. Concentración sérica de progesterona (promedio ± SEM; panel izquierdo) y desarrollo del folículo ovulatorio (panel derecho) luego de la administración de prostaglandina (PG) F_{2α} en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (cuadrados y triángulos negros) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (cuadrados y triángulos blancos), en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL (*Bos taurus*). **30**
- 3.1.2. Concentración sérica de estradiol-17β (promedio ± SEM; panel izquierdo) y tasa de ovulación (vaquillonas ovuladas / tratadas; panel derecho) luego de la administración de prostaglandina (PG) F_{2α} en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (círculos y barras negras) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (círculos y barras blancas), en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL (*Bos taurus*). **31**
- 3.3.1. Distribución de la ovulación luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona en un tratamiento para IATF con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne en anestro. Los datos están expresados como efectos principales (panel izquierdo), para el tratamiento eCG (*P* = NS) y para GnRH (*P* < 0,05); la interacción entre eCG y GnRH no fue significativa (*P* = NS) y por ese motivo los efectos simples se presentan solo de manera descriptiva (panel derecho). **36**

- 3.3.2. Diámetro del folículo dominante luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona en un tratamiento para IATF con progesterona y estradiol (protocolo J–Synch) en vaquillonas de carne en anestro. Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel izquierdo) y para el tratamiento GnRH (panel central), y aunque no se encontró interacción entre eCG y GnRH ($P = NS$) los efectos simples (panel derecho) se presentan solo de manera descriptiva. **36**
- 3.3.3. Concentraciones séricas de estradiol–17 β (lado izquierdo) y de progesterona (lado derecho) luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona en un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J–Synch) para IATF en vaquillonas de carne en anestro. Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel superior) y para el tratamiento GnRH (panel central). Asteriscos en paneles superiores indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Efectos simples (panel inferior) se presentan solo de manera descriptiva. **38**
- 3.3.4. Expresión relativa del ARNm endometrial del receptor de progesterona (PGR). Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel superior), para el tratamiento GnRH (panel central) y para el cuerno contralateral o ipsilateral al cuerpo lúteo (panel inferior), en un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J–Synch) para IATF en vaquillonas de carne en anestro. Las muestras fueron obtenidas al Día 6 luego de la ovulación mediante biopsia de la porción craneal de los cuernos uterinos. No hubo diferencias entre grupos ($P = NS$). **39**
- 3.3.5. Expresión relativa del ARNm endometrial del receptor de estrógenos α (ESR1). Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel superior), para el tratamiento GnRH (panel central) y para el cuerno contralateral o ipsilateral al cuerpo lúteo (panel inferior), en un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J–Synch) para IATF en vaquillonas de carne en anestro. Las muestras fueron obtenidas al Día 6 luego de la ovulación mediante biopsia de la porción craneal de los cuernos uterinos. No hubo diferencias entre grupos ($P = NS$). **40**

- 3.3.6. Localización inmunohistoquímica del receptor de progesterona (PR) en el epitelio luminal (LE), estroma intercaruncular (IS) y epitelio glandular (GE) de los controles negativos (A, B) en el cuerno uterino ipsilateral al CL en el día 6 luego de la ovulación. Las muestras para el tratamiento eCG (C, D) y para GnRH (E, F), respectivamente, se muestran como efectos principales. El control negativo no mostró tinción porque los anticuerpos específicos fueron sustituidos por una IgG no inmunitaria (A, B). No se encontraron diferencias en la intensidad de tinción media o en el área positiva para el PR dentro de cada factor (tratamiento eCG y GnRH). **41**
- 3.3.7. Localización inmunohistoquímica del receptor de estrógenos α (ER α) en el epitelio luminal (LE), estroma intercaruncular (IS) y epitelio glandular (GE) de los controles negativos (A, B) en el cuerno uterino ipsilateral al CL en el día 6 luego de la ovulación. Las muestras para el tratamiento eCG (C, D) y para GnRH (E, F), respectivamente, se muestran como efectos principales. El control negativo no mostró tinción porque los anticuerpos específicos fueron sustituidos por una IgG no inmunitaria (A, B). **42**
- 3.3.8. Área de tinción positiva del receptor de progesterona (PR, panel superior) y del receptor de estrógenos α (ER α , panel inferior) en el epitelio luminal, estroma intercaruncular y epitelio glandular en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Las muestras fueron tomadas al día 6 luego de la ovulación mediante biopsia uterina de la porción craneal del cuerno. Los datos están expresados como promedio \pm SEM, y los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0,05$). **44**
- 3.5.1. Representación descriptiva del efecto de la longitud del proestro (*i.e.*: intervalo desde el retiro del dispositivo con progesterona hasta la GnRH / IATF) sobre el diámetro folicular alcanzado en el momento de la IATF en vaquillonas de carne. El valor modal del diámetro del folículo ovulatorio cambió de 12,0 a 14,0 mm cuando la longitud del proestro se extendió de 48 h a 72 h, con una respuesta cuadrática en las tres diferentes longitudes de proestro ($P < 0,05$). **47**

3.5.2. Probabilidad de expresión del estro (panel izquierdo) y probabilidad de preñez (panel derecho) según el diámetro del folículo de mayor tamaño en el momento de la IATF en vaquillonas para carne sometidas a diferentes longitudes de proestro (<i>i.e.</i> : intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la administración de GnRH / IATF: 48 h, 60 h o 72 h).	48
3.5.3. Tasa de preñez obtenida con diferentes longitudes de proestro (<i>i.e.</i> : intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la GnRH / IATF) en vaquillonas con CL (panel izquierdo) y sin CL (panel derecho) sincronizadas con un tratamiento para IATF con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch). Para vaquillonas con presencia de CL (a vs. b; $P < 0,05$).	50
3.5.4. Tasa de preñez obtenida con diferentes longitudes de proestro (<i>i.e.</i> : intervalo desde el retiro del dispositivo hasta las GnRH / IATF) en vaquillonas que fueron sincronizadas con un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) con expresión del estro (barras grises) y sin expresión del estro (barras blancas) en el momento de la IATF (a vs. b, $P < 0,05$; c vs. d, $P < 0,1$).	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AnualPec	Anuário Estadístico do Mercado Pecuário (Brasil)
CC	condición corporal
CL	cuerpo lúteo
CNEA	Comisión Nacional de Experimentación Animal
CV	coeficiente de variación
d	días
DIEA	Dirección de Estadísticas Agropecuarias (Uruguay)
DIB	dispositivo intravaginal bovino
E2	estradiol-17 β
EB	benzoato de estradiol
eCG	gonadotrofina coriónica equina
ECP	cipionato de estradiol
ER α	receptor de estrógenos α
FAO	Food and Agriculture Organization of the United nations
FSH	hormona folículo estimulante
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
h	horas
IATF	inseminación artificial a tiempo fijo
IFN- τ	Interferón- τ
IGF	factor de crecimiento insulino-símil
IGFBPs	proteínas de unión al IGF
IRAUy	Instituto de Reproducción Animal Uruguay
i.m.	intramuscular
LEMA	Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal
LH	hormona luteinizante
μ	micras
μ g	microgramos
mg	miligramos
MHz	Megahertz
mm	milímetros
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
ng	nanogramos
pmol	picomoles
P4	progesterona
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PR	receptor de progesterona
RIA	radioinmunoanálisis
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Argentina)
SEM	standard error of the mean
UI	unidades internacionales
US	ultrasonografía

INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva de los rodeos de cría está determinada entre otros factores por la tasa de procreo, en los países sudamericanos es considerada baja situándose entre el 60% y 70%, (Anualpec, 2021; Senasa, 2021). En el caso de Uruguay, los sistemas de cría bovina no escapan a esta realidad. De acuerdo con la información oficial recopilada de las últimas décadas, la tasa de procreo promedio no supera el 65% de crías producidas en las hembras que se colocan en servicio cada año (DIEA, 2021). Esta baja eficiencia reproductiva está influenciada también por la escasa actividad ovárica, que en algunos casos no supera el 30% de vacas cíclicas (*i.e.*: con cuerpo lúteo) al inicio de la época de servicios (Menchaca *et al.*, 2013). Para hacer frente a esta situación, varias alternativas han sido propuestas y casi todas están dirigidas a inducir la ovulación mejorando así la tasa de concepción o preñez. Entre ellas se encuentran los tratamientos farmacológicos para sincronizar e inducir la ovulación y realizar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Sin embargo, no siempre se tiene en cuenta que también ocurren pérdidas embrionarias luego del servicio durante la gestación temprana, que, de acuerdo con Diskin and Morris (2008), pueden ser las responsables de la baja tasa de procreo y en consecuencia de buena parte de las mermas económicas de los sistemas de producción bovina. Según el Comité sobre Nomenclatura Reproductiva Bovina (1972), estas pérdidas embrionarias se clasifican en mortalidad embrionaria temprana, cuando ocurren entre la fertilización y el día 24 de gestación, mortalidad embrionaria tardía, cuando suceden entre el día 25 y 45 de gestación, y mortalidad fetal o abortos cuando se producen a partir del día 46 de gestación hasta el parto.

Está demostrado que la tasa de fecundación luego de una inseminación en bovinos es cercana al 90% mientras que la tasa de preñez a los 60 días por lo general no supera el 60 – 65% (Diskin and Morris, 2008; Sartori *et al.*, 2010). Varios estudios en vacas de carne y leche estimaron que la falla en la fertilización y pérdidas embrionarias tempranas estaba en el rango entre 20% y 45%, las pérdidas embrionarias tardías y fetales entre 8% y 17,5%, mientras que los abortos variaron entre 1% y 4% (Humblot, 2001). Esto indica que la mayoría de las pérdidas por mortalidad embrionaria se producen dentro de las primeras tres semanas de gestación similar a lo reportado por otros autores (Inskeep and Dailey, 2005; Diskin and Morris, 2008; Reese *et al.*, 2020; Campanile *et al.*, 2021). Sin embargo, el momento de la pérdida embrionaria temprana no es consistente en todos los estudios. Algunos autores indican que las mayores pérdidas embrionarias se producen dentro de la primera semana posterior a la concepción, mientras que otros sugieren que

se producen dentro de la segunda semana después de la concepción (Sartori *et al.*, 2002; Diskin *et al.*, 2006). Por esta razón, se han hecho modificaciones a la primera clasificación establecida por el Comité sobre Nomenclatura Reproductiva Bovina (1972), considerándose la mortalidad embrionaria muy temprana, cuando ocurre desde la fertilización hasta el día 7 de gestación; la mortalidad embrionaria temprana, cuando ocurre entre el día 7 hasta el día 24 de gestación y la mortalidad embrionaria tardía cuando se produce desde el día 25 hasta el día 45 de gestación (Walsh *et al.*, 2011). Más allá de los matices en la clasificación de dichas pérdidas, existe amplio consenso acerca de que las principales pérdidas se producen durante el período embrionario de la gestación, antes de que puedan ser detectadas mediante ultrasonografía, y que además pueden deberse tanto a la actividad ovárica preovulatoria, como a la calidad embrionaria y/o a la funcionalidad uterina (Wiltbank *et al.*, 2016; Reese *et al.*, 2020; Campanile *et al.*, 2021).

Luego de la fecundación se inicia el desarrollo embrionario, donde el cigoto comienza su división celular, mientras que desciende por el oviducto hasta el útero, proceso que se completa en un período de 4 o 5 días. Cuando llega al útero, lo hace en estado de mórula joven (día 5 aprox.), donde se compacta en una masa esférica de células (día 6 aprox.). Luego comienza a acumular líquido entre sus células formando una cavidad que es el blastocele, para transformarse así en blastocisto (día 7 aprox.). Debido a la polarización celular, un grupo de células pequeñas se ubican en un extremo formando la masa celular embrionaria dando origen al embrión, mientras que, a su vez, las células de mayor tamaño rodean al blastocele formando el trofoblasto, dando origen a las membranas extraembrionarias. El blastocisto amplía gradualmente su cavidad y crece presionando sobre la zona pelúcida hasta su ruptura. Hasta este momento, tiene forma esférica y mide entre 160 y 180 μ . Una vez eclosionado, se alarga y crece rápidamente entre los días 12 a 13 adquiriendo una forma oblonga o tubular de 1,5 a 3 mm de diámetro. En los días 14 a 15 pasa a la forma filamentosa midiendo 1,4 x 10 mm y en el día 18 mide 1,4 x 160 mm. La vesícula blastodérmica o *conceptus*, rodeada en este momento por el trofoectodermo (trofoblasto, ectodermo y mesodermo), toma una posición central en el útero entre los días 17 y 18, contactando las células epiteliales del trofoectodermo con las de la pared uterina, ocupando dos tercios del cuerno uterino. Hacia el día 20, el *conceptus* bovino ocupa todo el cuerno uterino y la implantación del embrión suele ocurrir durante la fase de elongación, entre los días 18 y 22 luego de la fertilización. A diferencia de otras especies, en el bovino no hay una verdadera implantación, solamente se observa una fase de adhesión o de unión, pero no invasión ni erosión permanente de la mucosa uterina (Peippo *et al.*, 2011). El endometrio desarrolla tejido caruncular, que junto con el tejido intercaruncular están involucrados en el proceso de unión.

Desde las primeras divisiones celulares luego de la concepción, el embrión es responsable de garantizar su supervivencia en la medida que envíe las señales adecuadas a su madre para que se establezca la gestación. El desarrollo embrionario temprano y

consecuente reconocimiento materno y mantenimiento de la gestación, depende de la funcionalidad uterina que está principalmente regulada por los estrógenos y la progesterona (Mann and Lamming, 2001). Este reconocimiento materno de la presencia del embrión debe ocurrir antes de la luteólisis. La acción antiluteolítica del embrión se ejerce por medio de varias proteínas que pueden bloquear la síntesis de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), de la mucosa uterina. En rumiantes esto sucede por la acción de una proteína compuesta por 172 aminoácidos, sintetizada por las células trofoblásticas del blastocisto, denominada interferón-tau ($IFN-\tau$), la que es producida antes de iniciarse el período de unión con el endometrio. EL $IFN-\tau$ tiene una acción reguladora sobre la actividad de genes específicos, activando su transcripción y la síntesis de proteínas que actuarían bloqueando específicamente uno o más pasos en la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ y actuando directa o indirectamente sobre los receptores de estrógeno, oxitocina y progesterona. Entre sus funciones, debe informar la presencia del embrión y rescatar al cuerpo lúteo (CL) de la luteólisis, para que éste continúe su actividad durante la gestación. En bovinos esto ocurre entre el día 15 y 17 luego de la ovulación y es considerado como el “período crítico” de la gestación (Binelli *et al.*, 2001).

Por otra parte, diferentes autores asocian las bajas concentraciones de progesterona en el primer mes de gestación a una mayor incidencia de pérdidas embrionarias tempranas (Mann, 2006; Perry, 2007). Estas bajas concentraciones de progesterona resultan en una mayor pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH) durante el diestro, que podrían estimular el crecimiento folicular. Como consecuencia del excesivo crecimiento folicular se producen altas concentraciones de estradiol- 17β durante la fase luteal temprana, que pueden ser perjudiciales para la sobrevivencia del embrión (Bridges *et al.*, 2000; Inskeep, 2004). La actividad del embrión durante el día 16 del ciclo, inhibe la síntesis y liberación de $PGF_{2\alpha}$ por el endometrio, lo que impide la luteólisis y la consiguiente disminución en la producción de progesterona (Mann *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2002). Pero más allá de esta vía de acción de la progesterona, su efecto se vincula de manera estrecha sobre la producción de $IFN-\tau$. Las concentraciones plasmáticas de progesterona en la fase luteal temprana o media, se correlacionan positivamente con la producción de $IFN-\tau$ por el *conceptus*, sugiriendo que altas concentraciones de progesterona proveen un medio más adecuado para el desarrollo del embrión (Kerbler *et al.*, 1997). Por el contrario, concentraciones subóptimas de progesterona producirían un desarrollo más lento del embrión (Mann and Lamming, 1999), una señal de reconocimiento materno de gestación más débil (Walsh *et al.*, 2011) y un mayor porcentaje de pérdidas embrionarias (Bridges *et al.*, 2000; Humblot, 2001; Diskin *et al.*, 2012).

A pesar de la importancia antes mencionada, de las pérdidas embrionarias tempranas, éstas no han sido abordadas en forma profunda. En un trabajo previo, se encontró que folículos más grandes están asociados a la formación de cuerpos lúteos de

mayor tamaño y a mayores concentraciones de progesterona durante la fase luteal temprana (Núñez–Olivera *et al.*, 2014). La estimulación y sincronización del crecimiento folicular, junto a la ovulación de folículos de mayor diámetro y consecuente formación de cuerpos lúteos de mayor tamaño, podría ser una buena alternativa para incrementar la producción de progesterona y reducir así las pérdidas durante la gestación temprana. En este sentido, la administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en los tratamientos actuales para IATF, así como el desarrollo de otras estrategias que permitan aumentar el desarrollo folicular preovulatorio, podrían favorecer una mejor actividad luteal y una mayor tasa de preñez. Por otro lado, sabemos que el desarrollo embrionario temprano y consecuente reconocimiento materno y mantenimiento de la gestación, dependerán de la funcionalidad uterina que está principalmente regulada por los estrógenos y la progesterona (Mann and Lamming, 2001). La progesterona modula la secreción de factores promotores del desarrollo embrionario, entre ellos la familia de los factores de crecimiento insulino–símil (IGF–I, IGF–II, Receptor IGF y 6 proteínas de unión (IGFBPs)). En este sentido, se han reportado diferencias en la expresión endometrial de IGF–I en vacas con ciclos estrales normales *vs.* ciclos cortos y con una menor concentración de progesterona, pudiendo ser la causa de pérdidas embrionarias tempranas (Meikle *et al.*, 2001). Una mayor sensibilidad endometrial a la progesterona (*i.e.*: mayor cantidad de receptores), en la fase luteal temprana, podría favorecer la acción de esta hormona, el desarrollo del embrión y el reconocimiento materno de la gestación. Además, se ha reportado que el estradiol producido durante la fase folicular promueve la presencia de receptores de progesterona en la fase luteal temprana (Kimmins and McLaren, 2011). Todo esto sugiere que sería posible modificar el ambiente uterino mediante el control del desarrollo folicular y la producción de estradiol preovulatorio.

Una estrategia para disminuir la mortalidad embrionaria sería estimular la producción de progesterona, previo al período crítico de la gestación. A su vez, debe considerarse que la actividad del cuerpo lúteo podría estar influenciada por las características del folículo ovulatorio durante su desarrollo previo a la ovulación, de manera tal que, folículos de mayor tamaño, se asocian a un mayor desarrollo de las células de la granulosa y de la teca que darán lugar a las células luteales grandes y pequeñas, respectivamente (Vasconcelos *et al.*, 2001; Crowe, 2008). El crecimiento del folículo preovulatorio y su diámetro determinan la viabilidad ovocitaria, así como el momento de la ovulación y la consecuente producción de progesterona durante la fase luteal temprana (Lonergan, 2011). Además, se ha reportado que altas concentraciones de estradiol endógeno previo a la ovulación se asocian a un aumento en la tasa de preñez (Bridges *et al.*, 2013; Jinks *et al.*, 2013). Por este motivo, aquellas estrategias que estimulan la actividad luteal por períodos prolongados pueden contribuir a aumentar la supervivencia del embrión. Dentro de las alternativas más novedosas e interesantes se encuentra la de favorecer el desarrollo del folículo preovulatorio mediante la prolongación del “proestro”, definido como “el intervalo entre el comienzo de la luteólisis (descenso brusco de la concentración de progesterona) y el inicio del estro y la ovulación (pico de GnRH / LH)”.

Las dos características hormonales clave del proestro son: disminución de la concentración circulante de progesterona asociada con la regresión del cuerpo lúteo, y aumento de la concentración circulante de estradiol asociado a las etapas finales del crecimiento del folículo dominante (Wiltbank *et al.*, 2014). Los tratamientos de sincronización de la ovulación que utilizan esta alternativa son conocidos como “protocolos de proestro prolongado” y se fundamentan en prolongar el período de exposición al estradiol preovulatorio, como consecuencia, aumenta el diámetro del folículo ovulatorio en ausencia de la progesterona (Bridges *et al.*, 2008; Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2018). De esta forma, se genera un cuerpo lúteo de mayor tamaño y, por ende, mayores concentraciones de progesterona en los primeros días de la gestación temprana. Evidencia reciente indica que la duración del proestro es decisiva para el resultado de la fertilidad, porque el estradiol preovulatorio “programa” el útero preparándolo para la llegada del embrión mediante la modificación de la morfología celular, las secreciones y la regulación de los receptores esteroideos (Bridges *et al.*, 2013).

Estos procesos dinámicos se han relacionado con las concentraciones circulantes de progesterona y la secreción de histotrofos, necesarios para la supervivencia del embrión, alargamiento del conceptus y reconocimiento materno de la gestación (Spencer *et al.*, 2017). Además, las concentraciones preovulatorias de estradiol afectan la función lútea posterior y producción de progesterona, ya que las concentraciones bajas de estradiol antes de la ovulación podrían tener un efecto negativo en el entorno uterino post-ovulatorio y la supervivencia del embrión (Binelli *et al.*, 2014). Por esta razón, el largo del proestro y las concentraciones de estradiol-17 β pueden ser determinantes para el establecimiento y mantenimiento de la gestación temprana en rumiantes. En base a lo expuesto, en este trabajo intentamos influir sobre las condiciones pre y post-ovulatorias, tanto a nivel ovárico para producir más estradiol y progesterona, como a nivel uterino para mejorar el ambiente y la funcionalidad del útero; mediante estrategias farmacológicas aplicadas al folículo preovulatorio. Con esto buscamos, un mejor desarrollo embrionario, un mejor establecimiento y mantenimiento de la gestación, y por ende, una mayor tasa de preñez final.

PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

En Uruguay, país productor de carne, el escenario actual refleja una baja tasa de preñez, debida entre otros factores a las pérdidas embrionarias durante la gestación temprana, las que tienen un impacto negativo sobre la eficiencia reproductiva y económica afectando la rentabilidad de los sistemas productivos. En rodeos de carne, si bien la sincronización de la ovulación mediante tratamientos para IATF, permite

inseminar un elevado porcentaje de hembras (casi la totalidad del rodeo) en un momento indicado, en el mejor escenario no logra superar el 60 – 65% de gestación a los 30 días luego de la inseminación (Sartori *et al.*, 2010; Menchaca *et al.*, 2013; Bó *et al.*, 2018). Estas diferencias pueden estar vinculadas a la calidad del ovocito al momento de la ovulación, a la fecundación, a la calidad del embrión, a la función luteal y/o a la funcionalidad uterina. Además, las condiciones preovulatorias afectan la función luteal y uterina luego de la ovulación (Lonergan, 2010; Spencer *et al.*, 2017). Por lo tanto, si controlamos el desarrollo del folículo ovulatorio, podríamos estar mejorando la sobrevivencia embrionaria y el establecimiento de la gestación.

Muchas estrategias actuales apuntan a mejorar los índices reproductivos en vacas adultas y a menudo se subestima el impacto de trabajar sobre las vaquillonas, pero el momento en la que ésta queda preñada determina el comportamiento futuro de la hembra. En un trabajo previo, se menciona que aquellas vaquillonas que parieron primero son más longevas y sus crías más pesadas en comparación con aquellas que parieron más tarde en la temporada de partos (Cushman *et al.*, 2013). Por este motivo, es importante trabajar en herramientas que incrementen la eficiencia reproductiva en esta categoría logrando en este caso que las vaquillonas queden preñadas más temprano lo que favorece su performance reproductiva durante toda su vida. De esta manera, a largo plazo se está mejorando también la tasa de preñez de las vacas adultas que es donde luego se visualizan las mayores ineficiencias.

En base a lo expuesto, la propuesta de este trabajo consistió en profundizar en el estudio del efecto de la progesterona en los factores previamente mencionados. Donde se evaluaron diferentes tratamientos que permitirían mejorar el desarrollo del folículo previo a la ovulación y mejorar así la actividad del cuerpo lúteo subsiguiente en vaquillonas de carne. Además, favorecerían las condiciones uterinas para el reconocimiento materno de la gestación. Con esto se consiguió comprender mejor los mecanismos que determinan la sobrevivencia embrionaria a partir de un adecuado soporte luteal. De esta manera, el desarrollo de alternativas farmacológicas podrá contribuir a la resolución de un problema técnico concreto vinculado a la eficiencia reproductiva. Como consecuencia, se espera un beneficio para el sector productivo en el mediano plazo y, en el largo plazo, y en la medida que se mejore la productividad, un beneficio a nivel de la cadena cárnica exportadora y de los resultados económicos del país.

HIPÓTESIS

La implementación de alternativas farmacológicas ($\text{PGF}_{2\alpha}$ y GnRH) y la prolongación del proestro mejoran las condiciones ovulatorias, el ambiente uterino y aumentan la tasa de preñez en comparación con los tratamientos convencionales con estradiol y progesterona. Además, la administración de eCG al momento de la remoción del dispositivo con progesterona, mejora la tasa de preñez en vaquillonas IATF con el tratamiento de proestro prolongado (protocolo J-Synch).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diferentes estrategias farmacológicas sobre la actividad ovárica preovulatoria, la producción de progesterona y funcionalidad uterina luego de la ovulación, y la tasa de preñez en vaquillonas de carne.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar el efecto de administrar $\text{PGF}_{2\alpha}$ en diferentes momentos de un tratamiento con progesterona y estradiol, sobre la actividad ovárica, las concentraciones séricas de progesterona y estradiol- 17β durante el tratamiento, el diámetro del folículo ovulatorio y el momento de la ovulación.

2) Evaluar el efecto de la administración de GnRH como inductor de la ovulación en diferentes momentos de un tratamiento con progesterona y estradiol, sobre el diámetro del folículo ovulatorio, la concentración sérica de estradiol-17 β , el momento de la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo y la concentración sérica de progesterona durante la fase luteal subsiguiente.

3) Evaluar los cambios a nivel endometrial inducidos tanto por la eCG, como por la GnRH administradas previo a la ovulación.

4) Inducir un proestro prolongado para mejorar las características del folículo ovulatorio, determinar el diámetro folicular en el momento de la IATF y la actividad del cuerpo lúteo subsecuente.

5) Determinar la tasa de preñez con las estrategias antes mencionadas (*i.e.*: diferentes dosis de PGF_{2 α} , momento de administración de GnRH, con o sin eCG).

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA GENERAL

Animales e instalaciones

Para todos los trabajos se utilizaron vaquillonas nulíparas de razas británicas, en establecimientos con similares condiciones de manejo y pastoreo, en campo natural o campo natural mejorado, con acceso *ad-libitum* al agua y suplementos minerales. Las instalaciones fueron las adecuadas para el manejo con los animales (corrales, huevo, tubo, cepo). Todos los procedimientos que involucraron animales, incluyendo administración de inyectables, colocación de dispositivos intravaginales, extracción de muestras sanguíneas, biopsias de endometrio y ultrasonografía de órganos reproductivos, fueron aprobados por el Comité de Ética, Cuidado y Manejo de Animales para Experimentación de la Fundación IRAUy (resolución N.º 001–2014), avalada por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) de Uruguay.

Ultrasonografía

Para la visualización de las estructuras ováricas, se utilizó un ecógrafo WED–9618V (Well.D, Shenzhen, China) provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz utilizado en modo B. En el Experimento I (publicación I), los exámenes fueron realizados cada 24 h desde el día de la colocación del dispositivo intravaginal hasta el día de su retiro, luego cada 12 h hasta el momento en que se detectó la ovulación o hasta transcurridas las 144 h posteriores, según lo que ocurriera primero. Para el Experimento III (publicación II), los exámenes fueron realizados cada 12 h desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación o hasta transcurridas las 144 h posteriores, según lo que ocurriera primero. La ovulación fue definida por la desaparición del folículo de mayor diámetro presente entre dos exámenes consecutivos y confirmada 12 h más tarde. En las hembras ovuladas de ambos experimentos, se continuó realizando ecografías cada 24 h hasta el día 11 luego de la

ovulación. En cada ovario examinado, todos los folículos igual y/o mayores de 3 mm de diámetro y el cuerpo lúteo (CL), fueron medidos utilizando el calibre electrónico interno del ecógrafo. Para cada vaquillona, se grabó un vídeo y se realizó el registro en un mapa ovárico, de acuerdo con su ubicación relativa en el ovario, para posterior análisis de la dinámica folicular. Para determinar el volumen total del CL formado en las vaquillonas ovuladas, se calculó el promedio de dos diámetros perpendiculares (largo [L] y ancho [A]) con la fórmula: $V = (4/3) \times \pi \times r^3$; siendo r (radio) = $(L/2 + A/2) / 2$, de acuerdo con lo reportado por Sartori *et al.* (2004). Si el CL tenía una cavidad central llena de líquido, esta se calculó con la misma fórmula y el resultado se restó al volumen total del CL. Para el Experimento V (publicación III), los exámenes se realizaron en el momento previo a la inseminación el día de la IATF, utilizándose dos imágenes del folículo de mayor tamaño en sus diámetros máximos (ancho y alto). Para los análisis estadísticos, se consideró el promedio de todos estos valores (*i.e.*: media \pm SEM). Para determinar el estado fisiológico del ovario (*i.e.*: ciclando o anestro) previo al inicio de cada Experimento, se verificó la presencia o ausencia de un CL, al constatarse la presencia de un CL esta vaquillona fue clasificada como **“ciclando”**. Luego se verificó el tamaño y cantidad de folículos para definir el grado de anestro de acuerdo con lo reportado por Sartori *et al.* (2001), donde se define como **“anestro superficial”** a la presencia de al menos un folículo de 8 mm de diámetro y **“anestro profundo”** solo a la presencia de folículos menores de 8 mm de diámetro. Finalmente, en los Experimentos II y IV (publicaciones I y II), se verificó la actividad ovárica (*i.e.*: ciclando o anestro) y el tono uterino al momento de iniciar el tratamiento con progesterona y estradiol. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía a los 30–33 días luego de la inseminación.

Determinación de la condición corporal

Para evaluar la condición corporal (CC), se utilizó la escala de 1 a 8, donde 1 correspondió a hembras emaciadas y 8 a hembras obesas (Vizcarra *et al.*, 1986). La CC, se valoró al inicio y al final de los Experimentos I, III y V y al comienzo de cada réplica de los Experimentos II y IV.

Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales

Para las determinaciones hormonales, se tomaron muestras de 10 mL de sangre de la vena yugular. Las muestras fueron conservadas a 4°C, luego de la extracción y posteriormente fueron centrifugadas a 3.000 rpm (1.000 g) durante 20 min, para separar el suero que se congeló a -20°C hasta su posterior análisis (de Castro *et al.*, 2004). Todas las muestras fueron tomadas al amanecer. En el Experimento I (publicación I), la extracción se realizó diariamente desde el inicio del tratamiento hasta 96 h luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona. Para el Experimento III (publicación II), las muestras fueron recolectadas diariamente desde el día del retiro del dispositivo hasta 11 d luego de la ovulación. Las concentraciones séricas de progesterona y estradiol-17 β , fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA; Sirois and Fortune, 1990) en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (LEMA) de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay. Tanto las concentraciones séricas de progesterona como las de estradiol-17 β , fueron determinadas por duplicado mediante RIA en fase sólida y líquida respectivamente. Las concentraciones circulantes de estradiol-17 β , fueron determinadas luego de aplicar el método de extracción con éter mediante un RIA de doble anticuerpo. Este protocolo de extracción es utilizado habitualmente en este laboratorio, el cual permite una recuperación del 87% de los recuentos originales de las cuentas por millón (cpm) y ha sido validado y reportado por Meikle *et al.*, (1997).

En el Experimento I (publicación I), las concentraciones séricas de progesterona se determinaron desde la colocación del dispositivo hasta 24 h luego del retiro de este, y las de estradiol-17 β desde el retiro del dispositivo hasta el momento en que se detectó la ovulación. Ambas determinaciones se realizaron utilizando kits comerciales específicos (DIAsource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Bélgica). Las concentraciones de progesterona circulante se determinaron en cuatro ensayos, con una sensibilidad de 0,262 ng/mL, y un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo para el control de calidad 1 (0,4 ng/mL) y para el control de calidad 2 (3,0 ng/mL) fue de 10,2% y 7,4%, respectivamente. Los CVs inter-ensayo, para los mismos controles de calidad fueron 10,8% y 8,7%, respectivamente. Las concentraciones circulantes de estradiol-17 β , luego del método de extracción con éter, fueron determinadas en un solo ensayo donde la sensibilidad fue de 3,5 pg/mL. Los CVs intra-ensayo para el control de calidad 1 (88 pg/mL) y para el control de calidad 2 (288 pg/mL), fueron de 8,0% y 3,6%, respectivamente.

En el Experimento III (publicación II), las concentraciones séricas de estradiol-17 β , se determinaron desde el día del retiro del dispositivo hasta el momento en que se detectó la ovulación, y las de progesterona desde ese momento hasta pasados los 11 d posteriores a la ovulación. Para determinar la concentración circulante de estradiol-17 β

luego del procedimiento de extracción con éter, las muestras se analizaron por duplicado en un solo ensayo y mediante RIA en fase líquida siguiendo las recomendaciones del kit comercial específico (DIAsource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Bélgica). La sensibilidad del RIA fue de 4,0 pg/mL y el CV intra-ensayo para el control de calidad 1 (91,6 pg/mL) y para el control de calidad 2 (150,7 pg/mL), proporcionados por la compañía, fueron de 8,0% y 3,6%, respectivamente. Las concentraciones de progesterona se determinaron en cuatro ensayos en RIA directo de fase sólida siguiendo las recomendaciones del kit comercial (MP Biomedicals, LLC, Ohio, Estados Unidos). La sensibilidad del RIA fue de 0,29 ng/mL y los CVs intra-ensayo para el control de calidad 1 (0,6 ng/mL) y para el control de calidad 2 (2,8 ng/mL) fueron de 7,8% y 8,3%, respectivamente. Mientras que los CVs inter-ensayos para los mismos controles de calidad fueron de 9,8% y 8,1%, respectivamente.

Obtención de biopsias uterinas

En el Experimento III (publicación II), las muestras de endometrio fueron obtenidas al día 6 luego de la ovulación de la tercera porción craneal del cuerno uterino, en la unión útero-oviducto, mediante pinzas de biopsia (10366 LL, Karl Storz GmbH & Co., Tuttlingen, Alemania). En todas las vaquillonas se tomaron dos muestras del cuerno ipsilateral al CL y una muestra del cuerno contralateral. Se congelaron dos biopsias endometriales (una ipsilateral y una contralateral), inmediatamente de retiradas, con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para el análisis mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). La muestra restante del cuerno ipsilateral se fijó en paraformaldehído al 4% y se embebió en parafina para el análisis inmunohistoquímico. Todas las muestras luego de la recolección se almacenaron hasta su análisis en el LEMA – UdelaR.

Aislamiento y purificación de ARN, transcripción inversa y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

En el Experimento III (publicación II), el ARN total del tejido de endometrio recolectado de todas las vaquillonas, se extrajo usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), seguido de precipitación con cloruro de litio y tratamiento con ADNasa con el kit DNA-freeTM 180 (Ambion, Austin, TX, Estados Unidos). La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza de todos los ARN aislados, se evaluó con una relación de absorbancia de 260 a 280 nm y la integridad por

electroforesis (gel de agarosa al 1%). Para cada muestra, el ADNc se sintetizó mediante transcripción inversa, utilizando la transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con cebadores oligo-dT y se añadió 1 mg de ARN total como molde. Las secuencias y las longitudes esperadas del producto de los cebadores para amplificar el ADNc de los genes específicos PGR, ESR1 y de los controles endógenos, proteína ribosómica L19 (RPL19), hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa (HPRT) y β -actina (BACT) están presentados en la Tabla 2.1. Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando 7,5 mL de mezcla maestra SYBER[®] Green (kit Quantimix EASY SYG, Biotools B&M Labs, Madrid, España) cantidades equimolares de cebadores directos e inversos (200 nM; Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Alemania) y 2 mL de ADNc diluido (1:10 en agua libre de ARNasa / ADNasa) en un volumen final de 15 mL. Las muestras se analizaron por duplicado en un Rotor-GeneTM 197 6000 de 72 discos (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Las condiciones de amplificación estándar fueron 5 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C, 40 s a 60°C y 20 s a 72°C. Al final de cada ciclo, se analizaron las curvas de disociación para asegurar que se estaba detectando el amplicón deseado y descartar el ADN contaminante o los dímeros de los cebadores. Se combinaron muestras de ADNc de 8 vaquillonas (2 por cada grupo experimental), para proporcionar un control exógeno y se utilizaron cinco diluciones (de 100 a 6,25 ng/tubo), de este pool, para realizar regresiones lineales para cada gen. La eficiencia (E) de los ensayos se calculó de acuerdo con la fórmula $E = (10^{-1} / \text{pendiente} - 1)$; Rutledge and Côté, 2003; Tabla 2.1). La expresión génica se midió por cuantificación relativa al control exógeno y se normalizó a la expresión media geométrica de los genes de control endógenos (RPL19, HPRT y BACT), considerando las respectivas eficiencias (Pfaffl MW, 2001).

Tabla 2.1

Secuencias de cebadores, tamaños de amplicones esperados y eficiencia de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), para los receptores de progesterona (PGR), receptor de estrógeno α (ESR1), proteína ribosómica L19 (RPL19), hipoxantina–guanina fosforribosil–transferasa (HPRT) y β –actina (BACT)

Gen	Acceso	Secuencias de cebadores	Largo (pb)	Eficiencia	Referencias
<i>PGR</i>	Z66555	F: GACAGCACTTTCTAGGCGATAT R: TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	1,10	Sosa <i>et al.</i> , 2009
<i>ESR1</i>	AYO33393	F: AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R: CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	234	1,15	Sosa <i>et al.</i> , 2009
<i>RPL19</i>	NM_001040516.1	F: CCCCAATGAGACCAATGAAATC R: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	119	1,20	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>HPRT</i>	XM_580802	F: TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R: CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	0,84	Carriquiry <i>et al.</i> , 2009
<i>BACT</i>	U08283	F: CGAGCACGATGAAGATC R: CCTCCGATCCACACCGAGTA	64	1,03	Chen <i>et al.</i> , 2006

Abreviaturas: F, adelante; R, reversa.

Inmunohistoquímica

En el Experimento III (publicación II), la presencia y distribución de los receptores de progesterona y estrógeno, se visualizaron en cortes transversales de 5 μ m de tejido desde el cuerno uterino ipsilateral al CL, utilizando la técnica inmunohistoquímica de adivina–biotina–peroxidasa (Meikle *et al.*, 2000). A las secciones de tejido, se les retiró la parafina y se las rehidrató en concentraciones decrecientes de etanol. Luego, se colocaron en citrato de sodio 0,01 M (pH 6,0) y se calentaron en microondas durante 4,5 min para mejorar la exposición al antígeno. El resto del procedimiento se realizó a temperatura ambiente. Después de lavar con buffer fosfato salino (PBS; 0,01 M, pH 7,5), la actividad inespecífica de las peroxidasas endógenas se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 min. Las muestras se incubaron con suero normal equino (NHS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) durante 60 min en cámara húmeda. Luego se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario, anti-ER α monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Los Ángeles, CA, Estados Unidos) y anti-PR (Zymed, San Francisco, CA, Estados Unidos)

diluido 1:25 y 1:100 en PBS, respectivamente. Los controles negativos se generaron reemplazando el anticuerpo primario con una IgG no inmune homóloga a una concentración equivalente (Santa Cruz Biotechnology). Después de la unión del anticuerpo primario, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories) anti-ER α de ratón y PR, diluido 1:200 en suero normal equino o caprino. Para la detección de proteínas se utilizó el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories). La ubicación de la enzima unida se visualizó mediante 3, 3'-diaminobencidina en H₂O₂ (kit DAB; Vector Laboratories) y luego se tiñeron nuevamente las muestras con hematoxilina/eosina y fueron deshidratadas previo a su montaje.

Análisis de imágenes

En el Experimento III (publicación II), la intensidad de tinción del receptor se evaluó mediante inmunohistoquímica en tres secciones endometriales: epitelio luminal (LE), epitelio glandular (GE; epitelio glandular superficial próximo a la luz uterina) y estroma intercaruncular (IS). La cantidad de proteína inmunorreactiva en los diferentes tipos celulares fue estimada de manera subjetiva por dos técnicos independientes, los que desconocían los grupos experimentales y los tratamientos. Se analizaron 10 campos para cada tipo celular con un aumento de 1.000X para todas las vaquillonas. La tinción de los núcleos se clasificó como negativa (-), tenue (+), moderada (++) o intensa (+++). El grado de tinción de cada tipo celular se expresó en una escala de 0 a 10, donde 0 es la ausencia de tinción y 10 es la máxima intensidad de tinción (Thatcher *et al.*, 2003). El promedio de la intensidad de tinción se calculó como $(1 * n_1) + (2 * n_2) + (3 * n_3)$, donde n es el número de células en cada campo que exhiben tinción tenue (n_1), moderada (n_2) e intensa (n_3 ; Boos *et al.*, 1996).

Análisis estadístico

La normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos fueron verificadas mediante histogramas, gráficos q-q y pruebas estadísticas formales como parte del procedimiento univariado. El tipo de estructuras varianza-covarianza, se eligió en función de la magnitud del criterio de información de Akaike (AIC) y al Bayesiano (BIC), para los modelos realizados cuando había simetría compuesta heterogénea, no estructurada, autorregresiva, poder espacial y antidependencia de primer orden. Los modelos con el menor valor de AIC y BIC fueron los seleccionados. El desarrollo folicular y del CL, y las concentraciones séricas de estradiol-17 β y de progesterona, se

analizaron mediante el software estadístico InfoStat, desarrollado por Di Rienzo *et al.*, (2020), utilizando medidas repetidas en los modelos lineales generalizados mixtos (MLGM), incluyendo a los animales como variable aleatoria, y los tratamientos y el tiempo como variables fijas, y sus interacciones. La tasa de ovulación (vaquillonas ovuladas / tratadas) se analizó utilizando la prueba exacta de Fisher, (Experimentos I y III; publicaciones I y II).

Para los datos de qPCR e inmunohistoquímica, todas las variables fueron analizadas mediante MLGM del software estadístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). En el modelo para qPCR se incluyó la lateralidad del tracto reproductivo en relación con el CL (ipsi o contralateral), tratamiento (eCG o no-eCG), momento de administración de GnRH (48 o 72 h luego del retiro del dispositivo) y la interacción entre grupos como variables fijas, y la placa de PCR como variable aleatoria. Para inmunohistoquímica, la intensidad de tinción promedio de los 10 campos evaluados se analizó mediante MLGM del SAS, incluyendo en el modelo estadístico el tratamiento, momento de administración de GnRH, tipo celular (epitelio luminal, epitelio glandular superficial y estroma intercaruncular) y sus interacciones como variables fijas. Para analizar las diferencias entre las variables fijas y sus interacciones se utilizó la prueba de Tukey–Kramer, mientras que para describir las relaciones entre las variables se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson, (Experimento III; publicación II).

El procedimiento logístico se utilizó para generar el modelo de regresión y determinar los valores de intersección y pendientes de acuerdo con las estimaciones de máxima verosimilitud de cada efecto de orden continuo significativo. Se utilizaron coeficientes de correlación parcial (r) y de Pearson para describir las relaciones entre las variables. Las probabilidades se determinaron de acuerdo con la siguiente ecuación: $\text{Probabilidad} = (e^{\text{ecuación logística}}) / (1 + e^{\text{ecuación logística}})$. Las curvas de regresión logística se construyeron de acuerdo con los coeficientes proporcionados por el análisis de datos interactivos del software InfoStat. El análisis de regresión polinomial se utilizó cuando los modelos estadísticos fueron seleccionados de acuerdo con la significancia de los coeficientes de regresión ($P < 0,05$) y por la relación con el coeficiente de determinación (R^2). Se utilizó el procedimiento de regresión para determinar si cada medición individual influyó sobre la tasa de preñez o sobre la expresión del estro de forma lineal, cuadrática o cúbica. Con valores de significancia el modelo cuadrático fue seleccionado sobre el modelo lineal, (Experimento V; publicación III).

La tasa de preñez fue analizada mediante regresión logística incluida en los MLGM, donde los tratamientos (tiempo de GnRH / IATF a las 48, 60 o 72 h luego del retiro del dispositivo con progesterona), presencia o ausencia de CL (*i.e.*: ciclando o anestro), expresión del estro (pintada o despintada) y las interacciones fueron incluidas

como variables fijas. Se incluyeron como variables aleatorias la réplica, identificación animal, técnico para la inseminación, lote de partida del semen y toro. El riesgo ajustado o cocientes de chance (*i.e.*: odds ratios) y los intervalos de confianza (IC) del 95% se generaron durante la regresión logística (modelo final) para estimar la tasa relativa de preñez, (Experimentos II, IV y V; publicaciones I, II y III).

Los resultados son presentados como media \pm SEM, el nivel de significancia estadística se definió cuando $P < 0,05$ y tendencia cuando $P < 0,1$.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Se realizaron 5 experimentos que consistieron en experimentos de laboratorio y experimentos de campo. En los experimentos de laboratorio se determinó el efecto de diferentes hormonas sobre la actividad ovárica, la funcionalidad uterina y su expresión génica en los primeros días de gestación. En los experimentos de campo se determinaron variables vinculadas a la tasa de preñez. Previo a cada experimento se definió el estado fisiológico del ovario (presencia o ausencia del CL y diámetro folicular) mediante ultrasonografía en modo B. En este momento se registró la condición corporal individual, factores que fueron considerados para el diseño balanceado de los grupos experimentales. Todas las vaquillonas recibieron un tratamiento para IATF utilizando un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (DIB) durante 6 a 8 días (dependiendo del experimento) asociado a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (EB) al momento de colocar el dispositivo. Al retiro del dispositivo, se administró una dosis de 500 µg de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}; D+ cloprostenol) y una dosis de 0,5 mg de cipionato de estradiol (ECP) o una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH) y/o una dosis de 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG), las que dependieron de cada experimento. Todos los fármacos inyectables fueron administrados por vía intramuscular (i.m.). En aquellos experimentos donde se inseminaron las hembras, ésta se realizó a partir de las 48 h de retirado el dispositivo (dependiendo del experimento), para estos casos se utilizaron partidas de semen que resultaran aptas al examen de calidad seminal determinado por una motilidad individual mínima de 40%, menos del 30% de anormalidades totales con menos de 10% de anormalidades de cabeza y cuello, concentración mínima de 8 millones de espermatozoides viables y que al menos 30% superara el test de termo resistencia entre 35 y 37°C durante 2 h. Este tratamiento para IATF ha sido ampliamente validado (Menchaca *et al.*, 2013), asegurando un alto grado de sincronización de la ovulación, así como una elevada tasa de fecundación superior al 90% (Sartori *et al.*, 2010).

Experimento I

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al inicio de un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF sobre las concentraciones séricas de progesterona, desarrollo y diámetro del folículo preovulatorio, momento de la ovulación y concentraciones séricas de estradiol- 17β en vaquillonas de carne. La administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al inicio del tratamiento induce la regresión del cuerpo lúteo existente asegurando la exposición a la progesterona exógena únicamente, evitando concentraciones extremadamente altas en aquellas hembras que poseen un cuerpo lúteo y que determine un menor desarrollo folicular durante el tratamiento (Bó *et al.*, 2007). Este experimento se realizó en las instalaciones del establecimiento "San Sebastián" (33°LS, Florida, Uruguay). Se utilizaron vaquillonas Hereford de dos años ($n = 25$) con un peso corporal de $299,2 \pm 5,0$ kg (promedio \pm SEM) y una CC de $4,5 \pm 0,1$ (escala 1 a 8). Fueron seleccionadas 14 días antes del experimento de un lote total de 150 vaquillonas en función de la presencia de un CL, en este momento 25 de ellas fueron preseleccionadas y se sincronizaron previo al estro utilizando una dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (500 μg de cloprostenol sódico, Ciclase[®] DL, Zoetis, Buenos Aires, Argentina), con el objetivo de que todas estén entre los 7 a 12 d de su ciclo estral luego de la ovulación (día 0 del Experimento). El diámetro folicular, el peso corporal y la CC fueron considerados para el diseño balanceado de los grupos experimentales. El día 0, se confirmó la presencia de un CL mediante ultrasonografía y estas vaquillonas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal de liberación controlada de progesterona (0,5 g, DIB[®] 0,5, Zoetis) durante 7 días y en el momento de la colocación del dispositivo fueron administrados 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol[®], Zoetis). Las vaquillonas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los dos grupos experimentales para recibir 500 μg de cloprostenol sódico repartido en dos medias dosis (250 μg cada una) administradas al momento de la colocación y al retiro del dispositivo intravaginal con progesterona (grupo 2-PG; $n = 13$) o en una dosis única administrada en el momento del retiro del dispositivo, el que fue considerado como grupo control (grupo 1-PG; $n = 12$). Todas las vaquillonas fueron tratadas con una dosis i.m. de 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn[®], Zoetis) y 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG; Novormon[®] 5000, Zoetis) en el momento del retiro del dispositivo (día 7). Las estructuras ováricas fueron monitoreadas diariamente mediante ultrasonografía en modo B (7,5 MHz, WED-9618V Well.D, Shenzhen, China) cada 24 h desde el día de la colocación del dispositivo hasta su retiro y cada 12 h desde el retiro del dispositivo hasta el momento en que se detectó la ovulación o hasta 144 h posteriores, lo que ocurriera primero. Todos los folículos de más de 3 mm de diámetro se midieron usando el calibre electrónico interno, grabado en video y registrado en un mapa ovárico individual para cada vaquillona. Se midieron dos imágenes del folículo de mayor tamaño en sus diámetros máximos (alto y ancho), y fue utilizado el promedio para los análisis. Se consideró que la ovulación se produjo cuando desapareció el folículo de mayor tamaño entre dos exámenes ultrasonográficos consecutivos y se confirmó 12 h más tarde. Las concentraciones séricas de progesterona fueron evaluadas diariamente desde el inicio del

tratamiento hasta 24 h luego del retiro del dispositivo y las de estradiol-17 β desde el día del retiro del dispositivo hasta el momento en que se detectó la ovulación. Las vaquillonas no fueron inseminadas para poder visualizar de mejor manera las concentraciones séricas hormonales obtenidas en cada grupo experimental. En la Figura 2.1 se presenta el esquema del diseño experimental.

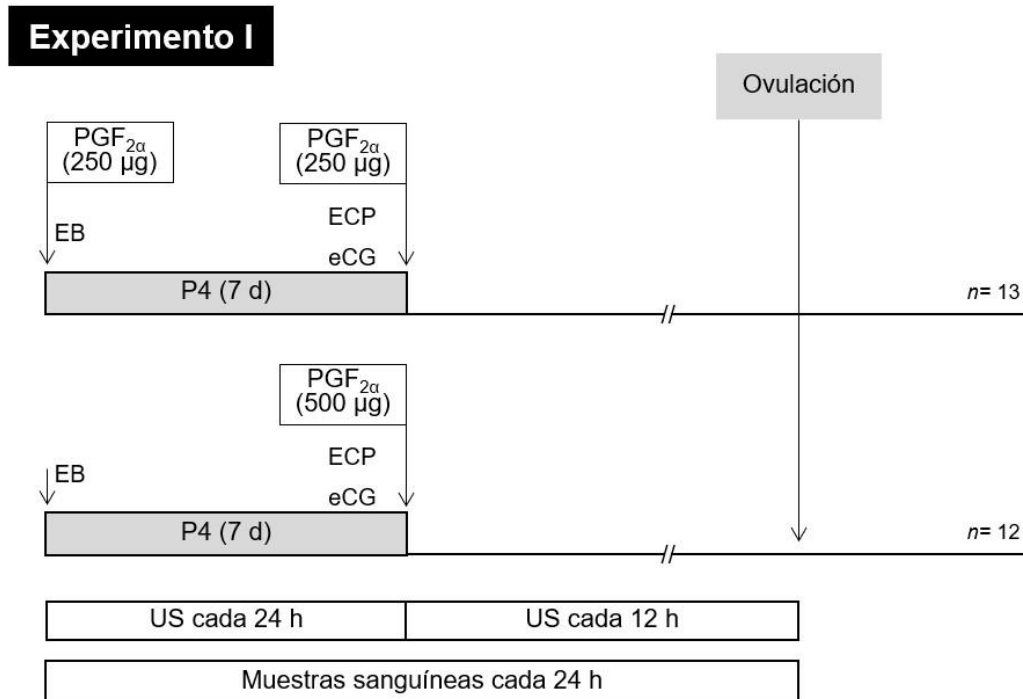


Figura 2.1. Diseño experimental para el Experimento I. PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, cloprostenol sódico 500 µg (dosis total), EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, ECP: cipionato de estradiol 0,5 mg, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, US: ultrasonografía ovárica, h: horas.

Experimento II

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al inicio del tratamiento con progesterona y estradiol sobre la tasa de preñez en vaquillonas de carne (*i.e.*: nulíparas, sin cría y en su primer servicio). Se realizaron 11 réplicas en diferentes establecimientos comerciales ubicados en todas las regiones del país. Se utilizaron 3.479 vaquillonas cruce Hereford–Angus en su mayoría, con una CC de $4,5 \pm 0,1$ (escala 1 a 8); en 10 de las réplicas usamos vaquillonas de 2 años ($n = 2.690$) y en la restante réplica vaquillonas de 14 meses ($n = 789$). En cada réplica, se confirmó la presencia o ausencia de un CL en cada vaquillona mediante ultrasonografía al inicio del tratamiento (día 0). Todos los establecimientos tenían un manejo similar, en condiciones de pastoreo con acceso *ad-libitum* al agua, sal y suplementos minerales. Las vaquillonas fueron sometidas al mismo tratamiento con progesterona y estradiol (DIB + EB al día 0 y ECP + eCG al día 7) descrito para el Experimento I. Se administró $\text{PGF}_{2\alpha}$ (500 μg de cloprostenol sódico, Ciclase[®] DL, Zoetis) repartidos en dos medias dosis (250 μg cada una) en el momento de la colocación y del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona (grupo 2–PG) o en una dosis única en el momento del retiro del dispositivo (grupo 1–PG). En cada réplica, las vaquillonas fueron asignadas al azar para ser inseminadas en la mañana o en la tarde del día 9 (*i.e.*: a las 48 o a las 54 h luego del retiro del dispositivo) en un diseño 2 X 2 factorial. Por lo que, las vaquillonas fueron tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada al colocar y al retiro del dispositivo e inseminadas a las 48 h ($n = 852$) o a las 54 h ($n = 896$) luego del retiro del dispositivo, o fueron tratadas con una dosis única de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al retiro del dispositivo e inseminadas a las 48 h ($n = 835$) o a las 54 h ($n = 896$) luego del retiro del dispositivo. La inseminación fue realizada por dos experimentados técnicos utilizando partidas de semen de uno o dos toros por réplica, las que fueron asignadas por igual a cada grupo experimental. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía a los 30–35 días luego de la inseminación. En la Figura 2.2 se presenta el esquema del diseño experimental.

Experimento II

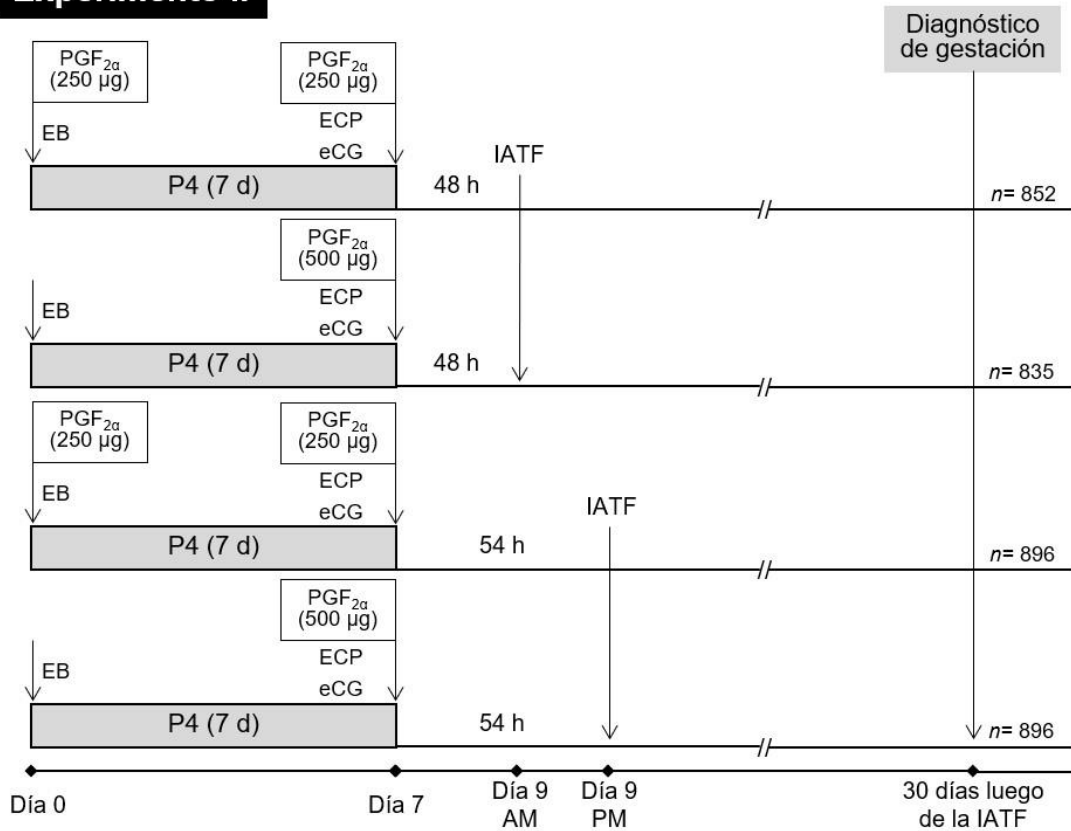


Figura 2.2. Diseño experimental para el Experimento II. PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, cloprostenol sódico 500 µg (dosis total), EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, ECP: cipionato de estradiol 0,5 mg, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, h: horas, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

Experimento III

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la administración de eCG (300 UI) al final de un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol con proestro prolongado (protocolo J-Synch). Utilizando este nuevo protocolo hormonal que permite prolongar la duración del proestro con el fin de promover el incremento del diámetro del folículo ovulatorio y una mayor circulación de estradiol preovulatorio, el cual genera un cuerpo lúteo de mayor tamaño y por ende mayores concentraciones séricas de progesterona en los primeros días de la gestación temprana (de la Mata *et al.*, 2018). Esto se fundamenta en la hipótesis que es posible mejorar las condiciones del proestro si se realiza el retiro del dispositivo con progesterona de manera anticipada, permitiendo una mayor exposición y desarrollo del folículo en ausencia de esta hormona, antes de inducir la ovulación. La adición de eCG podría favorecer el desarrollo del folículo ovulatorio tal como fue demostrado cuando fue aplicada en el protocolo convencional (Núñez-Olivera *et al.*, 2014), efecto que se sumaría al beneficio del proestro prolongado. Se evaluó el desarrollo y diámetro del folículo preovulatorio, momento de la ovulación, concentraciones séricas de estradiol-17 β y progesterona, expresión génica endometrial, y presencia y distribución de receptores ER α y PR en tejido endometrial durante el diestro temprano en vaquillonas de carne prepúberes. Este experimento se realizó en las instalaciones del establecimiento "San Sebastián" (33°LS, Florida, Uruguay). Se utilizaron vaquillonas Hereford de 2 años ($n = 46$) sin CL, con un peso corporal de $309,1 \pm 3,3$ kg (promedio \pm SEM) y CC de $4,0 \pm 0,1$ (escala 1 a 8). El anestro se determinó en todas las vaquillonas por la ausencia de CL detectada mediante 2 exámenes ultrasonográficos consecutivos con 10 d de diferencia, justo antes del inicio del tratamiento de sincronización. Todas las vaquillonas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal siliconado de liberación controlada que contenía 0,5 g de progesterona (DIB[®] 0,5, Zoetis) asociado a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol[®], Zoetis). Al día 6 de tratamiento se retiró el dispositivo con progesterona y se administró una dosis de 500 μ g de cloprostenol sódico (PGF_{2 α} ; Ciclase[®] DL, Zoetis) por vía i.m. En este momento, las vaquillonas fueron divididas en cuatro grupos experimentales para recibir o no una dosis de 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG; Novormon[®] 5000, Zoetis) administrada por vía i.m. al momento del retiro del dispositivo y se subdividieron para recibir una dosis de 100 μ g de acetato de gonadorelina (GnRH; Gonasyn[®] GDR, Zoetis) administrada por vía i.m. a las 48 h o a las 72 h luego de retirado el dispositivo, en un diseño 2 X 2 factorial. Cada grupo experimental fue balanceado por bloques al azar considerando la actividad ovárica (*i.e.*: anestro superficial o anestro profundo), el peso corporal y la CC al inicio del tratamiento de cada vaquillona. Las estructuras ováricas fueron monitoreadas cada 12 h mediante ultrasonografía en modo B (7,5 MHz, WED-9618V Well.D, Shenzhen, China), desde el momento en que se retiró el dispositivo hasta cuando se confirmó la ovulación o hasta 144 h posteriores, lo que ocurriera primero, luego cada 24 h durante 11 d para monitorear el desarrollo del CL en aquellas ovuladas. Todos los folículos mayores a 3 mm de diámetro se midieron usando el calibre electrónico interno, grabado en video y registrado

en un mapa ovárico individual para cada vaquillona. Se midieron dos imágenes del folículo de mayor tamaño en sus diámetros máximos (alto y ancho), y fue utilizado el promedio para los análisis. Se consideró que la ovulación se produjo cuando desapareció el folículo de mayor tamaño entre dos exámenes ultrasonográficos consecutivos y se confirmó 12 h más tarde. Las concentraciones séricas de estradiol-17 β fueron evaluadas diariamente desde el día del retiro del dispositivo hasta que se detectó la ovulación y las de progesterona durante 11 d luego de la ovulación. Las vaquillonas no fueron inseminadas para poder visualizar de mejor manera las concentraciones séricas hormonales obtenidas en cada grupo experimental. Al día 6 luego de la ovulación se realizó en todas las vaquillonas una biopsia uterina ipsi y contralateral al CL para determinar los transcritos de estrógenos y progesterona. En la Figura 2.3 se presenta el esquema del diseño experimental.

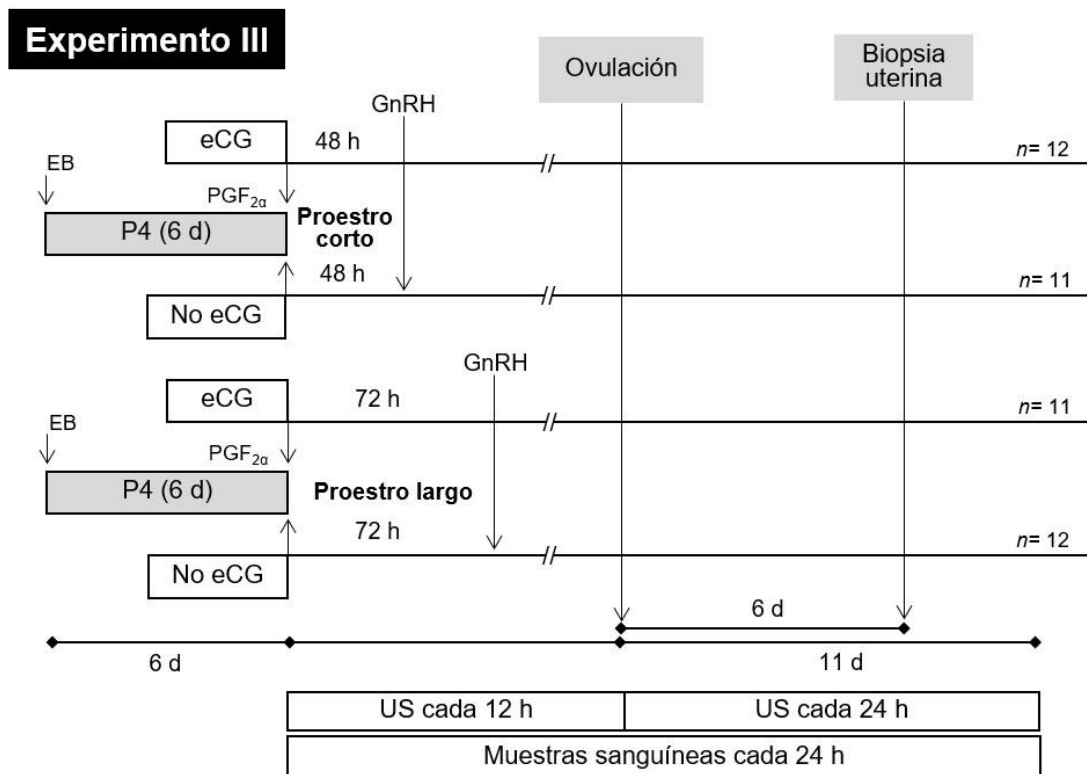


Figura 2.3. Diseño experimental para el Experimento III. EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, eCG: gonadotrofina coriónica equina 300 UI, PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, cloprostenol sódico 500 μ g, h: horas, GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas, acetato de gonadorelina 100 μ g, US: ultrasonografía ovárica.

Experimento IV

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la administración de eCG al final de un tratamiento con proestro prolongado para IATF (protocolo J-Synch) sobre la tasa de preñez en vaquillonas de carne. Se realizaron 6 réplicas en diferentes establecimientos comerciales ubicados en varias regiones del país. Se utilizaron 2.598 vaquillonas cruce Hereford–Angus en su mayoría, con una CC de $4,5 \pm 0,1$ (escala 1 a 8). En cada réplica, se determinó la presencia o ausencia de un CL en cada vaquillona mediante ultrasonografía al inicio del tratamiento (día 0). Todos los establecimientos tenían un manejo similar, en condiciones de pastoreo con acceso *ad-libitum* al agua, sal y suplementos minerales. Las vaquillonas fueron sometidas al mismo tratamiento de progesterona y estradiol con proestro prolongado (protocolo J-Synch) descrito para el Experimento III. Al momento del retiro del dispositivo (día 6, al final de la tarde), en cada réplica las vaquillonas fueron asignadas al azar para recibir o no 300 UI de eCG, y luego se subdividieron para recibir GnRH en el momento de la IATF, que se realizó temprano en la mañana o en la tarde del día 9 (*i.e.*: a las 60 h o a las 72 h luego del retiro del dispositivo, asumiendo ambos como proestro prolongado) en un diseño 2 X 2 factorial. La inseminación fue realizada por dos experimentados técnicos utilizando partidas de semen de uno o dos toros por réplica, las que fueron asignadas por igual a cada grupo experimental. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía a los 30–35 días luego de la inseminación. En la Figura 2.4 se presenta el esquema del diseño experimental.

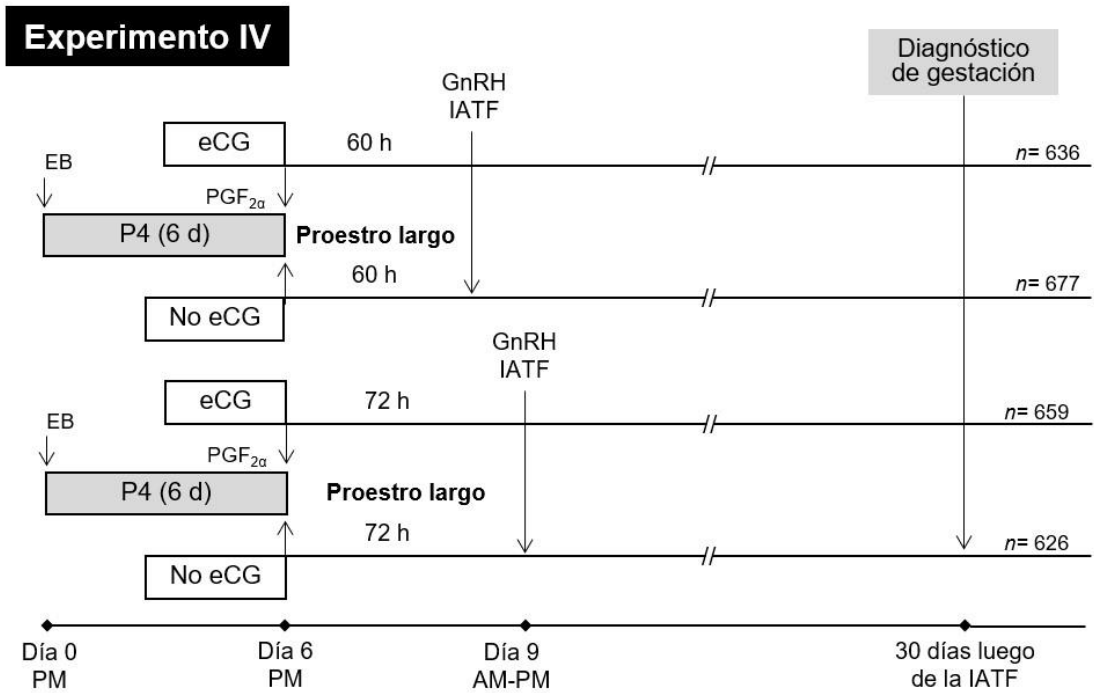


Figura 2.4. Diseño experimental para el Experimento IV. EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, cloprostenol sódico 500 µg, h: horas, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, acetato de gonadorelina 100 µg, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

Experimento V

El objetivo de este experimento fue inducir diferentes longitudes de proestro entre 48 a 72 h mediante la administración de GnRH, para evaluar el efecto sobre el tamaño folicular ovulatorio, la expresión del estro en la IATF y la tasa de preñez en vaquillonas de carne. Este experimento se realizó en 4 réplicas en las instalaciones de los establecimientos "El Valentino" y "El Rincón" (33°LS, Rocha y Florida, Uruguay). Ambos establecimientos tenían un manejo similar, en condiciones de pastoreo con acceso *ad-libitum* al agua, sal y suplementos minerales. Se utilizaron vaquillonas Angus y Hereford de 2 años ($n = 911$) con una CC de $4,5 \pm 0,1$ (escala 1 a 8). En cada réplica, se determinó la presencia o ausencia de un CL en cada vaquillona mediante ultrasonografía al inicio del tratamiento (día 0, por la mañana). Todas las vaquillonas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal siliconado de liberación controlada que contenía 0,5 g de progesterona (DIB® 0,5, Zoetis) asociado a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol®, Zoetis). Al momento del retiro del dispositivo (día 6, por la mañana), todas las vaquillonas se pintaron en la base de la cola para detectar actividad de monta (CeloTest®, Phibro, Buenos Aires, Argentina) y se administraron por vía i.m. una dosis de 500 µg de cloprostenol sódico (PGF_{2α}; Ciclase® DL, Zoetis) y una dosis de 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG; Novormon® 5000, Zoetis). Para establecer diferentes períodos de longitud del proestro (intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la administración de GnRH), se administró una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH; Gonasyn® GDR, Zoetis) por vía i.m. a las 48 h (día 8, por la mañana; $n = 308$) o a las 60 h (día 8, por la tarde; $n = 290$) o a las 72 h (día 9, por la mañana; $n = 313$) luego de retirado el dispositivo. En cada réplica, las vaquillonas fueron asignadas a cada grupo experimental los que fueron balanceados por bloques al azar considerando la actividad ovárica (*i.e.*: presencia o ausencia de CL) y la CC al inicio del tratamiento. La inseminación fue realizada por dos experimentados técnicos utilizando partidas de semen de uno o dos toros por réplica, las que fueron asignadas por igual a cada grupo experimental. En el momento de la IATF, en tres de las cuatro réplicas ($n = 525$) se registró la expresión del estro según el estado de eliminación de pintura de detección de celo (*i.e.*: estro), por lo que no se realizó una evaluación visual del comportamiento estral. En este momento, el diámetro del folículo ovulatorio fue determinado mediante ultrasonografía en modo B (7,5 MHz, WED-9618V Well.D, Shenzhen, China), observándose ambos ovarios midiendo el folículo de mayor tamaño utilizando el calibre electrónico interno, grabado en vídeo y registrado en una ficha individual. Para cada folículo se midieron dos imágenes en sus diámetros máximos (alto y ancho), y el promedio fue utilizado para los análisis. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía a los 30–35 días luego de la inseminación. En la Figura 2.5 se presenta el esquema del diseño experimental.

Experimento V

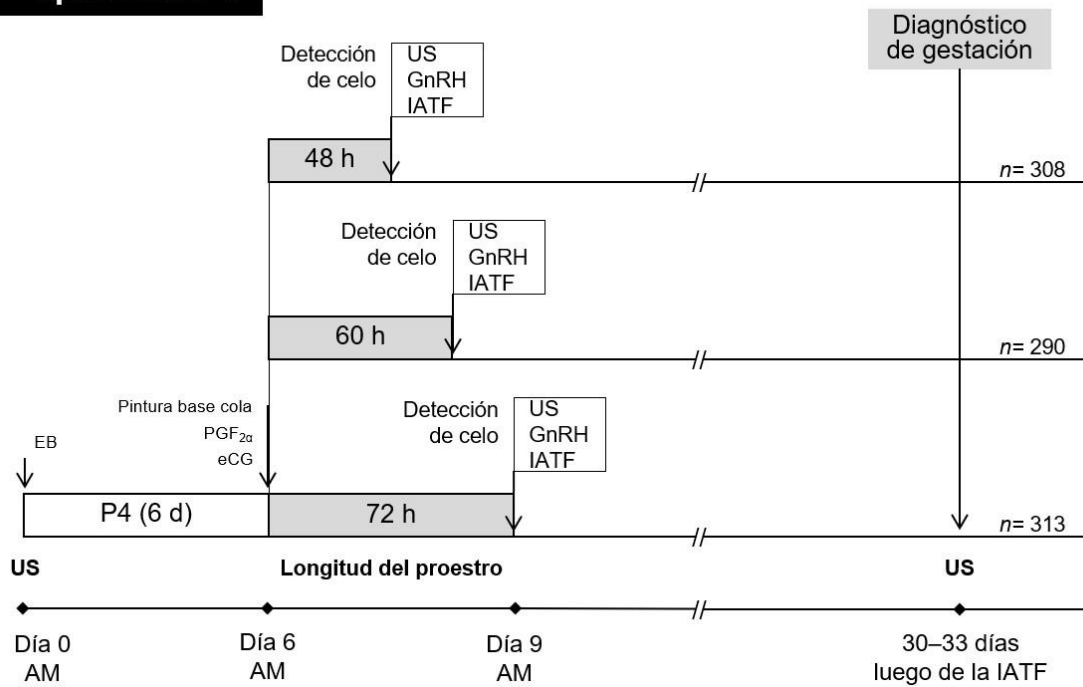


Figura 2.5. Diseño experimental para el Experimento V. EB: benzoato de estradiol 2 mg, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, d: días, PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, cloprostenol sódico 500 μg, eCG: gonadotropina coriónica equina 300 UI, h: horas, Detección de celo: determinada en el momento de la IATF por la eliminación de la pintura en la base cola pintada (> 30%), US: ultrasonografía reproductiva, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, acetato de gonadorelina 100 μg, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

RESULTADOS

Experimento I (publicación I)

Efecto de la progesterona sobre la funcionalidad del cuerpo lúteo y las características del folículo ovulatorio

El tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el momento de la colocación del dispositivo resultó en concentraciones de progesterona sérica menores durante el período de tratamiento de 7 d comparado al grupo control ($4,2 \pm 0,3$ vs. $8,0 \pm 1,0$ ng/mL; $P < 0,01$; Figura 3.1.1). En el grupo de tratamiento con dos dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (grupo 2-PG) el diámetro folicular preovulatorio fue mayor ($12,2 \pm 0,5$ mm) comparado al grupo que recibió una dosis única de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (grupo 1-PG) en el momento del retiro del dispositivo ($9,6 \pm 0,5$; $P < 0,01$; Figura 3.1.1). Además, las vaquillonas que fueron tratadas con las dos dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tuvieron un diámetro folicular mayor en el momento de la última evaluación ultrasonográfica antes de que se detectara la ovulación ($14,4 \pm 0,4$ vs. $12,8 \pm 0,4$ mm; $P < 0,05$; Tabla 3.1.1). No hubo diferencias en el promedio de las concentraciones séricas de estradiol- 17β desde el momento del retiro del dispositivo hasta que se detectó la ovulación entre ambos grupos de tratamiento ($P = 0,44$; Figura 3.1.2). Las vaquillonas del grupo 2-PG tuvieron un intervalo de tiempo menor desde el momento del retiro del dispositivo hasta que se detectó la ovulación, comparado con las vaquillonas del grupo 1-PG ($P < 0,05$; Tabla 3.1.1). La tasa de ovulación no fue diferente para los dos grupos de tratamiento ($P = 0,42$; Tabla 3.1.1) y la distribución de la ovulación se muestra en la Figura 3.1.2.

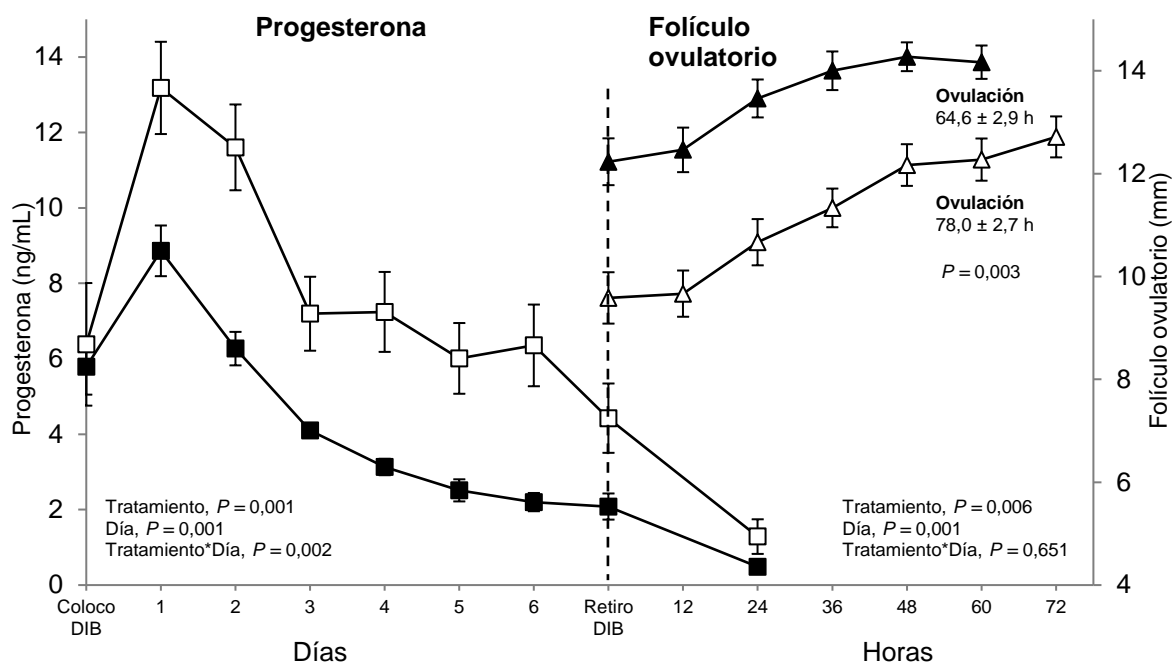


Figura 3.1.1. Concentración sérica de progesterona (promedio \pm SEM; panel izquierdo) y desarrollo del folículo ovulatorio (panel derecho) luego de la administración de prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (cuadrados y triángulos negros) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (cuadrados y triángulos blancos), en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL (*Bos taurus*).

Tabla 3.1.1

Efecto de la administración de prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (grupo 2-PG) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (grupo 1-PG) en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL (promedio \pm SEM).

	Concentración sérica de progesterona* (ng/mL)	Diámetro folicular al retiro del dispositivo (mm)	Diámetro folicular a la ovulación (mm)	Tasa de crecimiento folicular** (mm/d)	Tasa de ovulación (%)	Intervalo a la ovulación** (h)
Grupo 1-PG	8,0 \pm 1,0	9,6 \pm 0,5	12,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	83,3% (10/12)	78,0 \pm 2,7
Grupo 2-PG	4,2 \pm 0,3	12,2 \pm 0,5	14,4 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1	100% (13/13)	64,6 \pm 2,9
<i>P</i> -valor	0,001	0,001	0,015	0,498	0,425	0,003

*Promedio (\pm SEM) durante los 7 d de tratamiento con el dispositivo intravaginal con progesterona.

**Desde el momento del retiro del dispositivo hasta cuando se detectó la ovulación.

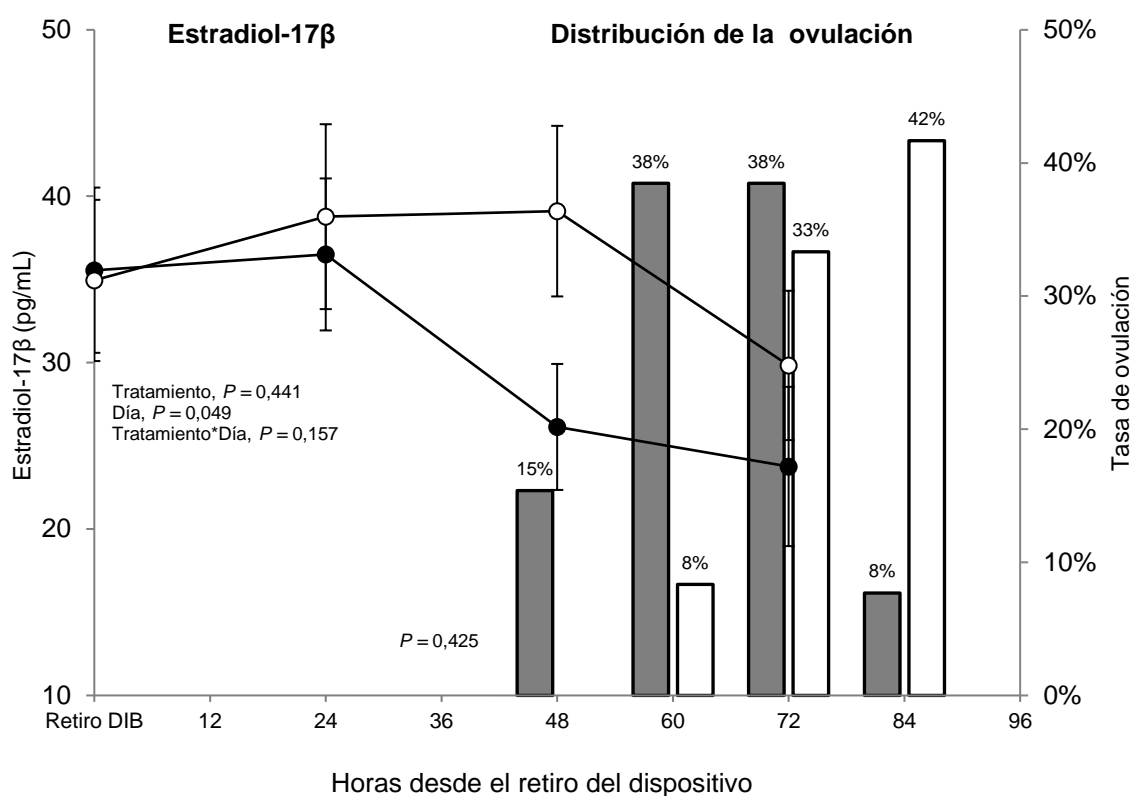


Figura 3.1.2. Concentración sérica de estradiol-17β (promedio \pm SEM; panel izquierdo) y tasa de ovulación (vaquillonas ovuladas / tratadas; panel derecho) luego de la administración de prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (círculos y barras negras) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (círculos y barras blancas), en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL (*Bos taurus*).

Experimento II (publicación I)

Efecto de la progesterona inducida con PGF_{2α} al inicio del tratamiento sobre la tasa de preñez

La tasa de preñez de las vaquillonas de 2 años y de las de 14 meses se resumen en la Tabla 3.2.1. En las vaquillonas de 2 años, la tasa de preñez general, independientemente del estado fisiológico al inicio del tratamiento (*i.e.*: con o sin CL), fue similar para las vaquillonas del grupo 2-PG y 1-PG (64,3%, 872/1.356 y 66,5%, 887/1.334; respectivamente; $P = 0,23$). Mientras que, en las vaquillonas de 14 meses hubo una tendencia entre el grupo 2-PG y 1-PG para tasa de preñez general (48,5%, 190/392 y 54,7%, 217/397; respectivamente; $P = 0,08$). La tasa de preñez fue mayor en las vaquillonas con CL al inicio del tratamiento comparado con las que no tenían CL (67,1%, 989/1.474 vs. 63,3%, 770/1.216; respectivamente; $P < 0,05$) y no hubo diferencia en las vaquillonas de 14 meses con o sin CL en el momento de la colocación del dispositivo (50%, 193/386 vs. 53,1%, 214/403; respectivamente; $P = 0,38$). Con respecto a las vaquillonas que tenían un CL presente al momento de la colocación del dispositivo, la tasa de preñez no se vio afectada por el tratamiento de dos dosis de PGF_{2α} repartidas (grupo 2-PG; $P = 0,33$). Se encontró una tendencia ($P = 0,07$) en la interacción entre tratamientos y horario de inseminación para vaquillonas de 2 años con CL al inicio del tratamiento. Las vaquillonas de 14 meses con CL que fueron IATF a las 54 h luego del retiro del dispositivo, tuvieron una tasa de preñez menor en el grupo 2-PG comparada al grupo 1-PG ($P < 0,05$; Tabla 3.2.1). Para las vaquillonas que no tenían CL al momento de la colocación del dispositivo, no hubo diferencias en la tasa de preñez ni con los horarios de inseminación entre los grupos de tratamientos ($P = 0,19$).

Tabla 3.2.1

Tasa de preñez obtenida luego de la administración de prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ en dos medias dosis repartidas al momento de la colocación y del retiro del dispositivo (grupo 2-PG) o en una dosis única administrada al momento del retiro del dispositivo (grupo 1-PG) en un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF en vaquillonas de carne con CL. Los resultados para vaquillonas de 2 años se resumen en el panel superior y para vaquillonas de 14 de meses en el panel inferior.

	Grupo 2-PG			Grupo 1-PG			<i>P-valor</i>		
	IATF 48 h	IATF 54 h	Total	IATF 48 h	IATF 54 h	Total	PG	Hora	PG x IATF
Vaquillonas de 2 años									
Con CL (<i>n</i> = 1.474)	68,4% (249/364) ^{ab}	63,5% (254/400) ^a	65,8% (503/764)	66,4% (233/351) ^{ab}	70,5% (253/359) ^b	68,5% (486/710)	0,31	0,90	0,07
Sin CL (<i>n</i> = 1.216)	63,1% (183/290)	61,6% (186/302)	62,3% (369/592)	65,3% (190/291)	63,4% (211/333)	64,3% (401/624)	0,48	0,53	0,93
Vaquillonas de 14 meses									
Con CL (<i>n</i> = 386)	44,9% (44/98)	47,7% (42/88)	46,2% (86/186)	57,0% (57/100)	50,0% (50/100)	53,5% (107/200)	0,16	0,68	0,33
Sin CL (<i>n</i> = 403)	45,0% (45/100)	55,7% (59/106)	50,5% (104/206)	54,8% (51/93)	56,7% (59/104)	55,8% (110/197)	0,28	0,21	0,38

Los efectos simples se compararon solo cuando la interacción tenía un *P*-valor < 0,1; para este caso en la misma fila a vs. b difieren (*P* < 0,05)

Experimento III (publicación II)

Efecto de la eCG en un tratamiento con proestro prolongado (protocolo J-Synch) sobre las características del folículo ovulatorio y la funcionalidad del cuerpo lúteo

En promedio, el 91,3% (42/46) de las vaquillonas que estaban en anestro ovularon, lo que no se vio afectado por el tratamiento eCG ni GnRH (Tabla 3.3.1). Las cuatro vaquillonas que no ovularon fueron excluidas del análisis para folículo ovulatorio. No se encontraron ovulaciones dobles para ninguno de los dos tratamientos: eCG y No eCG. Las mediciones del folículo preovulatorio y las características del CL se encuentran en la Tabla 3.3.1. Tal como se esperaba, las vaquillonas que recibieron GnRH a las 72 h luego del retiro del dispositivo tuvieron un período de proestro más largo ($P < 0,05$) que las que recibieron la GnRH a las 48 h luego del retiro del dispositivo. El proestro fue en promedio, 9,7 h más largo en el grupo con GnRH a las 72 h que en el grupo con GnRH a las 48 h. La distribución de las horas de ovulación se muestra en la Figura 3.3.1. El promedio del diámetro del folículo ovulatorio se muestra en la Figura 3.3.2. Las vaquillonas que recibieron GnRH a las 72 h luego del retiro del dispositivo tuvieron un diámetro del folículo ovulatorio mayor ($P < 0,05$) que las que recibieron la GnRH a las 48 h luego de retirado el dispositivo. El porcentaje de vaquillonas que ovularon antes de la administración de GnRH fue mayor ($P < 0,05$) en las que recibieron la GnRH a las 72 h que aquellas que recibieron la GnRH a las 48 h (Tabla 3.3.1).

Los exámenes ultrasonográficos del CL y las concentraciones séricas de progesterona mostraron dos respuestas lúteas diferentes en ambos grupos de tratamiento luego de la ovulación: a) vaquillonas con un CL competente con una fase lútea normal, y b) vaquillonas que muestran un CL en regresión prematura, con un ciclo corto. En aquellas vaquillonas con un CL competente, la ecotextura lútea fue homogénea y las concentraciones séricas de progesterona fueron superiores a un 1 ng/mL durante todo el período experimental, y hasta 11 d luego de la ovulación. En aquellas vaquillonas que mostraron un CL con una fase de regresión prematura, el parénquima lúteo solo se detectó hasta no más de 5 a 8 d luego de la ovulación, donde comenzó a disminuir el tamaño y las concentraciones séricas de progesterona disminuyeron abruptamente por debajo de 1 ng/mL. Un total de 10 vaquillonas tuvieron fases lúteas cortas luego de la ovulación, 3 de ellas eran del grupo eCG y 7 de ellas pertenecían al grupo No eCG (Tabla 3.3.1). La proporción de vaquillonas con un CL competente (*i.e.*: concentraciones séricas de progesterona superiores a 1 ng/mL el día 11 luego de la ovulación) sobre el total de vaquillonas tratadas fue del 82,6% (19/23) en los grupos eCG y del 56,5% (13/23) para los grupos No eCG, respectivamente ($P = 0,054$; Tabla 3.3.1).

Tabla 3.3.1

Efecto de la administración de eCG al inicio del proestro (*i.e.*: al momento del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona) combinada con la administración de GnRH a las 48 h o a las 72 h luego del retiro del dispositivo sobre el desarrollo del folículo ovulatorio en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.

	GnRH 48 h		GnRH 72 h		<i>P</i> -valor		
	eCG	No eCG	eCG	No eCG	eCG x GnRH	eCG	GnRH
Tasa de ovulación	100% (12/12)	81,8% (9/11)	90,9% (10/11)	91,7% (11/12)	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Diámetro del folículo dominante (FD) al retiro del dispositivo (mm)	8,8 ± 0,4	8,0 ± 0,3	8,3 ± 0,3	8,9 ± 0,4	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Diámetro del FD a la administración de GnRH (mm)	12,3 ± 0,5	11,8 ± 0,5	13,6 ± 0,3	13,3 ± 0,7	<i>NS</i>	<i>NS</i>	< 0,05
Vaquillonas ovuladas previo a la administración de GnRH	0% (0/12)	0% (0/9)	30,0% (3/10)	18,2% (2/11)	<i>NS</i>	<i>NS</i>	< 0,05
Diámetro folicular a la ovulación (mm)	13,3 ± 0,4	12,9 ± 0,4	13,6 ± 0,3	13,9 ± 0,6	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Tasa de crecimiento del FD (mm/d)	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación (h)	82,0 ± 2,0	80,0 ± 2,0	86,4 ± 4,1	94,9 ± 4,1	<i>NS</i>	<i>NS</i>	< 0,05
CL de regresión prematura / ovulación	16,7% (2/12)	22,2% (2/9)	10,0% (1/10)	45,5% (5/11)	<i>NS</i>	< 0,1	<i>NS</i>
CL normales / vaquillonas tratadas	83,3% (10/12)	63,6% (7/11)	81,8% (9/11)	50,0% (6/12)	<i>NS</i>	0,05	<i>NS</i>

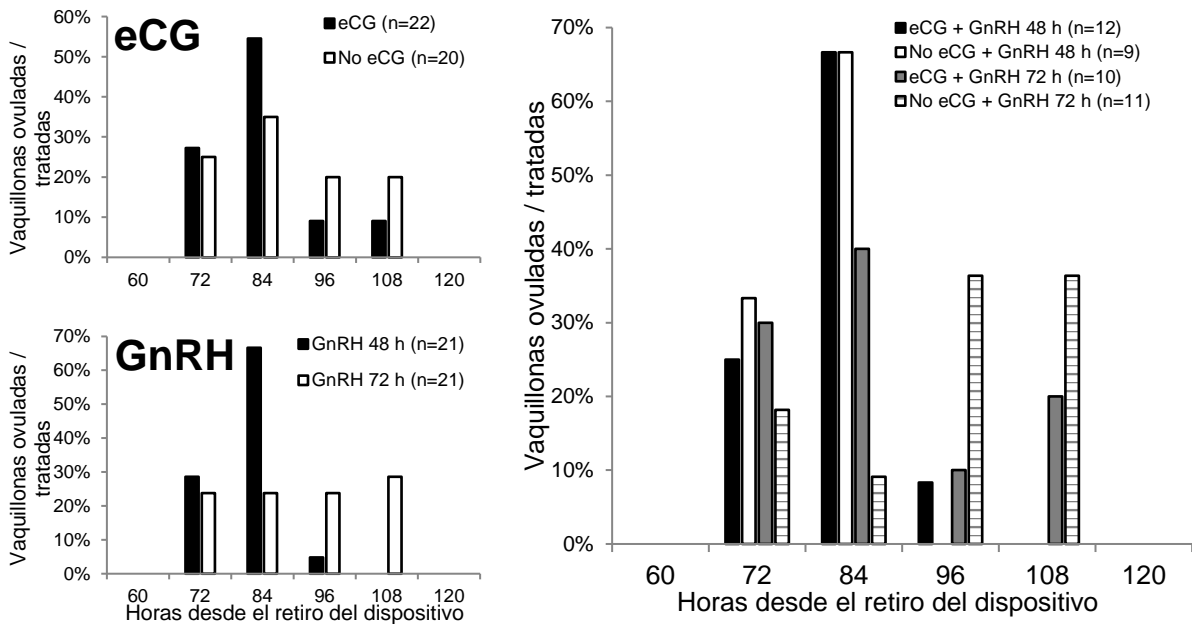


Figura 3.3.1. Distribución de la ovulación luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona en un tratamiento para IATF con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne en anestro. Los datos están expresados como efectos principales (panel izquierdo), para el tratamiento eCG ($P = NS$) y para GnRH ($P < 0,05$); la interacción entre eCG y GnRH no fue significativa ($P = NS$) y por ese motivo los efectos simples se presentan solo de manera descriptiva (panel derecho).

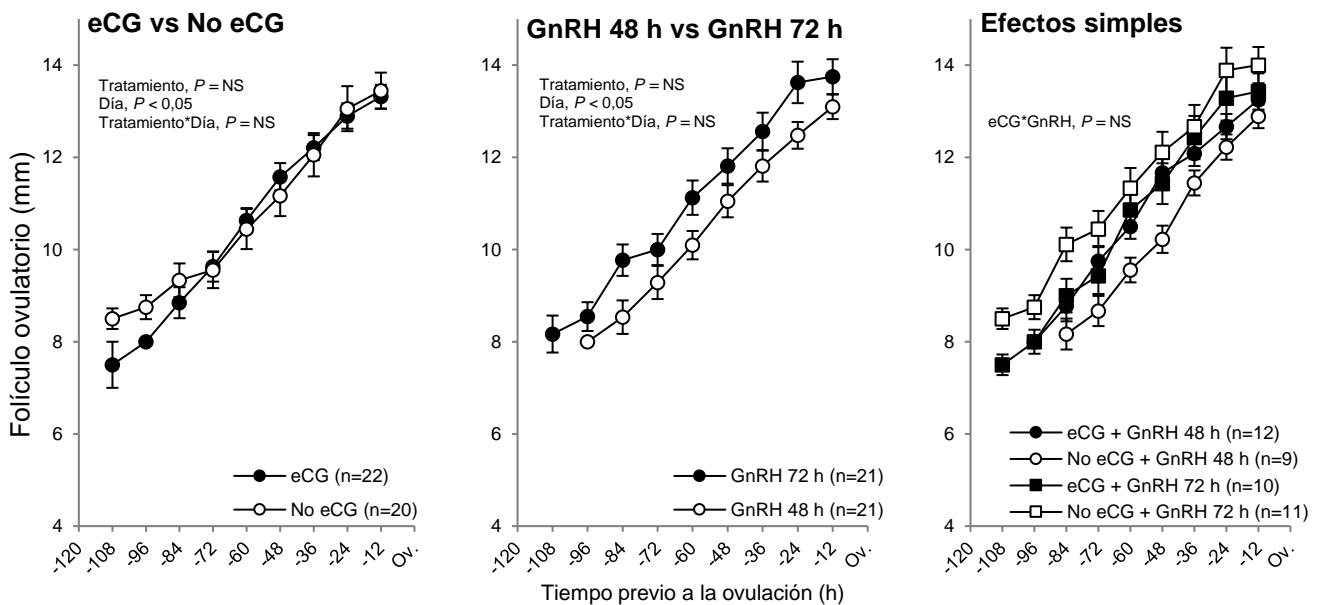


Figura 3.3.2. Diámetro del folículo dominante luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona en un tratamiento para IATF con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne en anestro. Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel izquierdo) y para el tratamiento GnRH (panel central), y aunque no se encontró interacción entre eCG y GnRH ($P = NS$) los efectos simples (panel derecho) se presentan solo de manera descriptiva.

El promedio de las concentraciones séricas de estradiol-17 β desde el momento del retiro del dispositivo hasta la ovulación se vieron afectadas por el tratamiento con eCG ($P < 0,05$), pero no por el momento en que se administró la GnRH (48 h vs. 72 h; $P = 0,325$). El día afectó las concentraciones séricas de estradiol-17 β ($P < 0,05$). En las vaquillonas que recibieron eCG al retirar el dispositivo las concentraciones séricas de estradiol-17 β fueron mayores ($10,1 \pm 0,4$ pg/mL) comparadas con las que no recibieron eCG al retiro del dispositivo ($8,7 \pm 0,3$ pg/mL; $P < 0,05$; Figura 3.3.3 lado izquierdo).

El promedio de las concentraciones séricas de progesterona durante el período de 11 d a partir de la ovulación no fue diferente entre los grupos de tratamiento ($P = NS$), hubo efecto del día ($P < 0,05$) y no hubo interacción entre día y tratamiento ($P = NS$). Cuando se compararon los datos durante la fase lútea media (*i.e.*: desde el día 8 al 11 luego de la ovulación), las vaquillonas que recibieron GnRH a las 72 h mostraron concentraciones séricas de progesterona más altas que las que recibieron la GnRH a las 48 h luego de retirado el dispositivo, con una diferencia significativa alcanzada los días 10 y 11 ($P < 0,05$). Aquellas vaquillonas que presentaron un CL con fase de regresión prematura con concentraciones séricas de progesterona subluteales (*i.e.*: inferiores a un 1 ng/mL) fueron excluidas de este análisis. Los datos se presentan en la Figura 3.3.3 lado derecho.

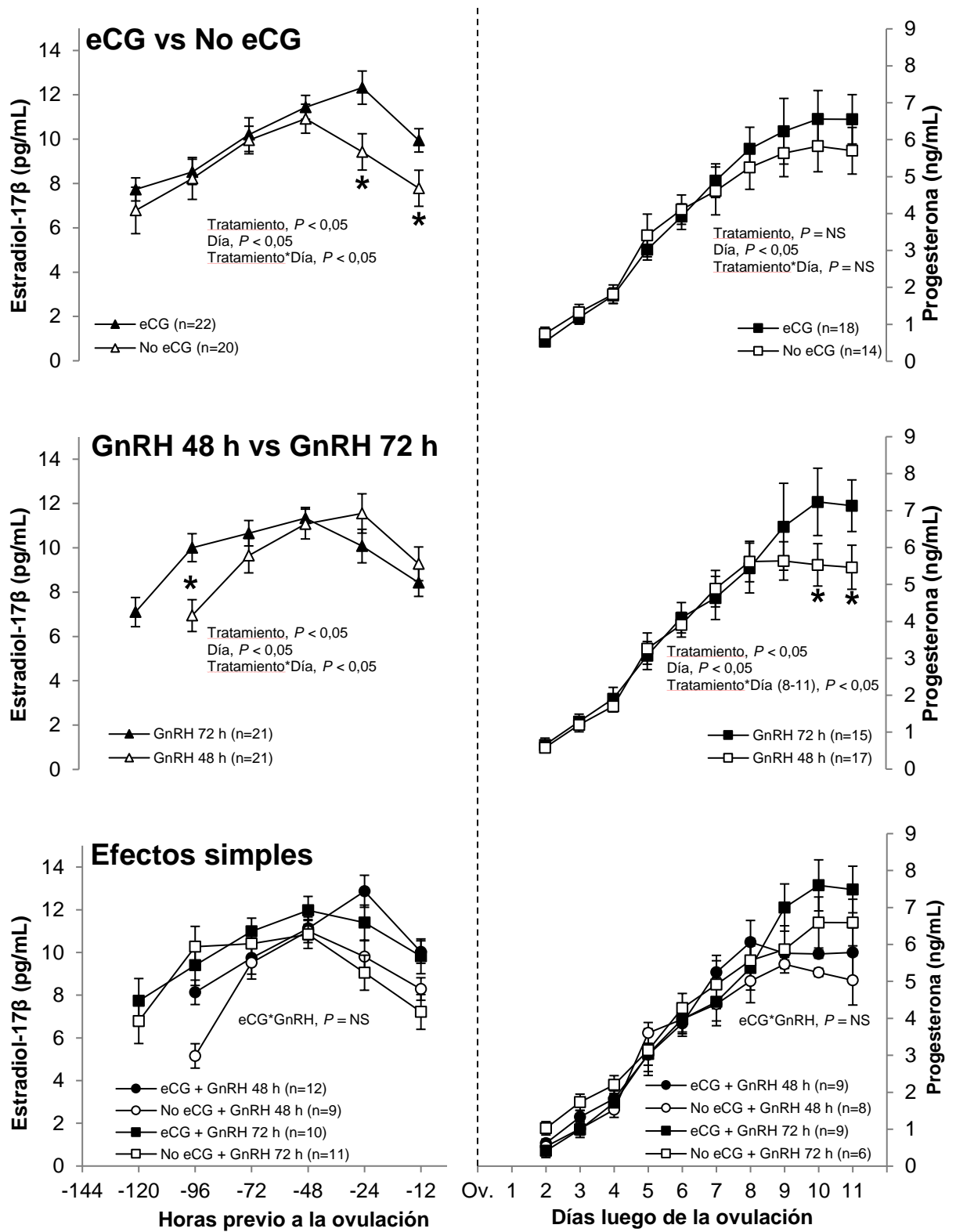


Figura 3.3.3. Concentraciones séricas de estradiol-17β (lado izquierdo) y de progesterona (lado derecho) luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona en un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) para IATF en vaquillonas de carne en anestro. Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel superior) y para el tratamiento GnRH (panel central). Asteriscos en paneles superiores indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Efectos simples (panel inferior) se presentan solo de manera descriptiva.

Los niveles de ARNm de PGR endometrial no se vieron afectados por el tratamiento con eCG o el momento en que se administró la GnRH (eCG vs. No eCG: $0,9 \pm 0,3$ vs. $1,1 \pm 0,3$; respectivamente; $P = NS$), GnRH administrada a las 48 h vs. 72 h ($1,2 \pm 0,3$ vs. $0,9 \pm 0,3$; respectivamente; $P = NS$), ni se encontró interacción entre tratamientos eCG y hora de administración de GnRH ($P = NS$). No hubo efecto del lado del cuerno en relación con el CL (*i.e.*: ipsilateral o contralateral; $P = NS$), ni interacción entre lado y tratamiento en la expresión de ARNm de PGR ($0,9 \pm 0,3$ vs. $1,1 \pm 0,3$; $P = NS$; Figura 3.3.4).

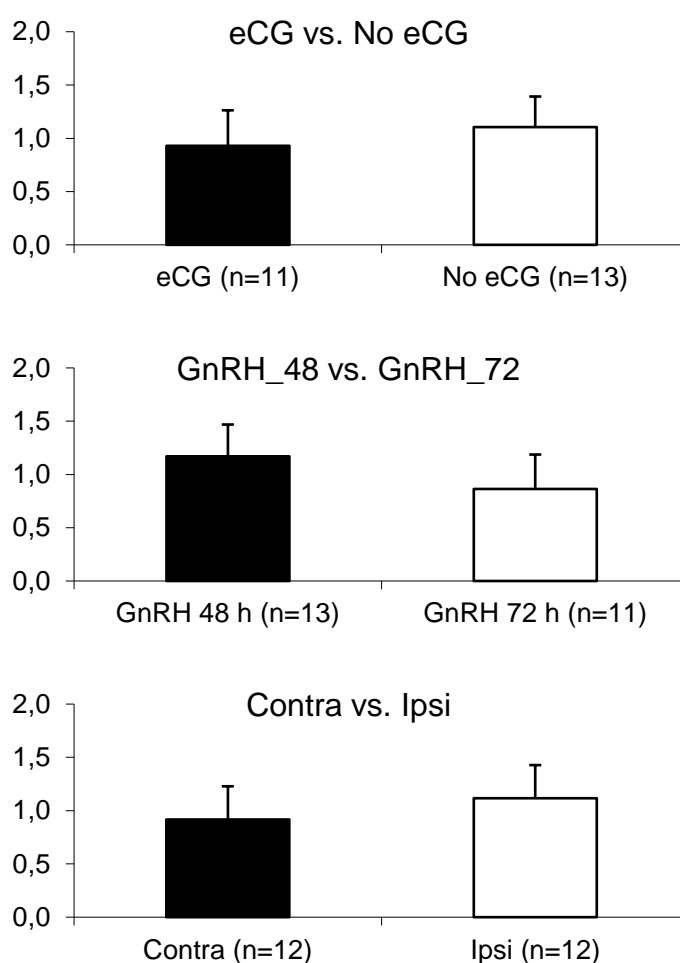


Figura 3.3.4. Expresión relativa del ARNm endometrial del receptor de progesterona (PGR). Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel superior), para el tratamiento GnRH (panel central) y para el cuerno contralateral o ipsilateral al cuerpo lúteo (panel inferior), en un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) para IATF en vaquillonas de carne en anestro. Las muestras fueron obtenidas al Día 6 luego de la ovulación mediante biopsia de la porción craneal de los cuernos uterinos. No hubo diferencias entre grupos ($P = NS$).

Los niveles de ARNm de ESR1 endometrial no se vieron afectados por el tratamiento con eCG o el momento en que se administró la GnRH (eCG vs. No eCG: $1,2 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,5$; respectivamente; $P = NS$), GnRH administrada a las 48 h vs. 72 h ($1,2 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,5$; respectivamente; $P = NS$), ni se encontró interacción entre tratamientos eCG y hora de administración de GnRH ($P = NS$). No hubo efecto del lado del cuerno en relación con el CL (*i.e.*: ipsilateral o contralateral; $P = NS$), ni interacción entre lado y tratamiento en la expresión de ARNm de ESR1 ($1,1 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,5$; $P = NS$; Figura 3.3.5).

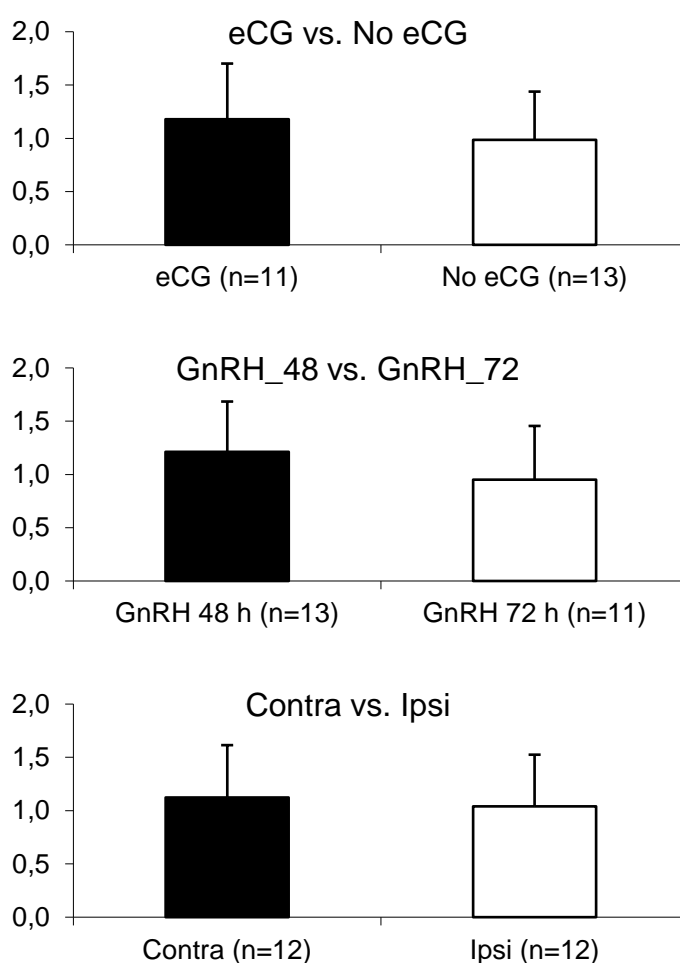


Figura 3.3.5. Expresión relativa del ARNm endometrial del receptor de estrógenos α (ESR1). Los datos (promedio \pm SEM) están expresados como efectos principales para el tratamiento eCG (panel superior), para el tratamiento GnRH (panel central) y para el cuerno contralateral o ipsilateral al cuerpo lúteo (panel inferior), en un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) para IATF en vaquillonas de carne en anestro. Las muestras fueron obtenidas al Día 6 luego de la ovulación mediante biopsia de la porción craneal de los cuernos uterinos. No hubo diferencias entre grupos ($P = NS$).

Los receptores de progesterona (PR) y de estrógenos α ($ER\alpha$) se localizaron en los núcleos de las células endometriales (Figuras 3.3.6 y 3.3.7, respectivamente). Cuando los anticuerpos específicos se sustituyeron por una IgG no inmunitaria, la ausencia de tinción confirmó una alta especificidad de inmunotinción.

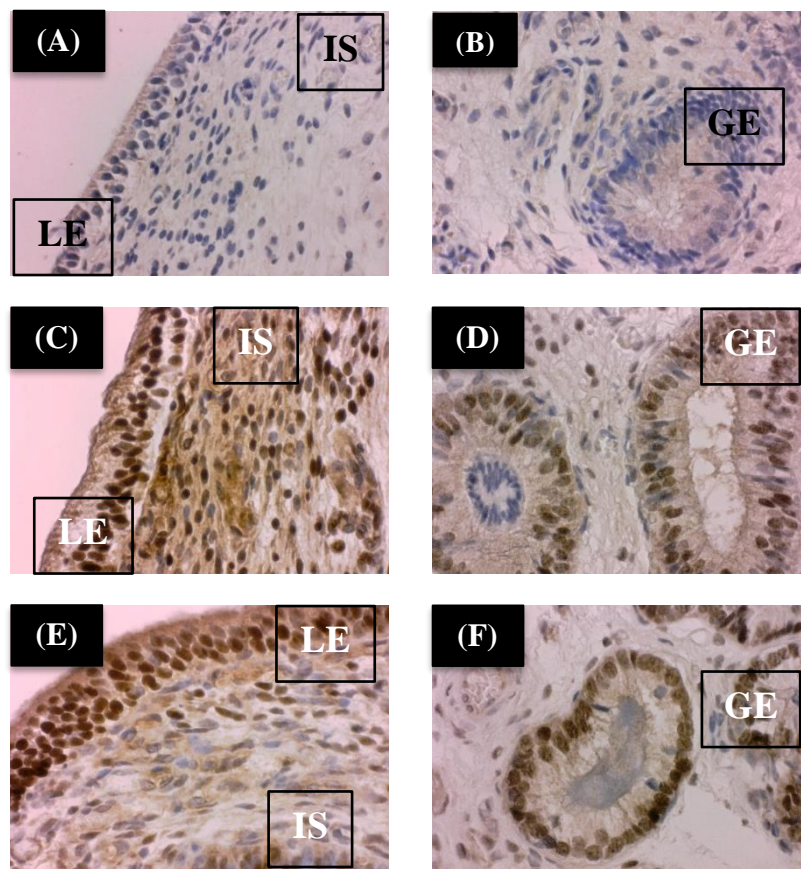


Figura 3.3.6. Localización inmunohistoquímica del receptor de progesterona (PR) en el epitelio luminal (LE), estroma intercaruncular (IS) y epitelio glandular (GE) de los controles negativos (A, B) en el cuerno uterino ipsilateral al CL en el día 6 luego de la ovulación. Las muestras para el tratamiento eCG (C, D) y para GnRH (E, F), respectivamente, se muestran como efectos principales. El control negativo no mostró tinción porque los anticuerpos específicos fueron sustituidos por una IgG no inmunitaria (A, B). No se encontraron diferencias en la intensidad de tinción media o en el área positiva para el PR dentro de cada factor (tratamiento eCG y GnRH).

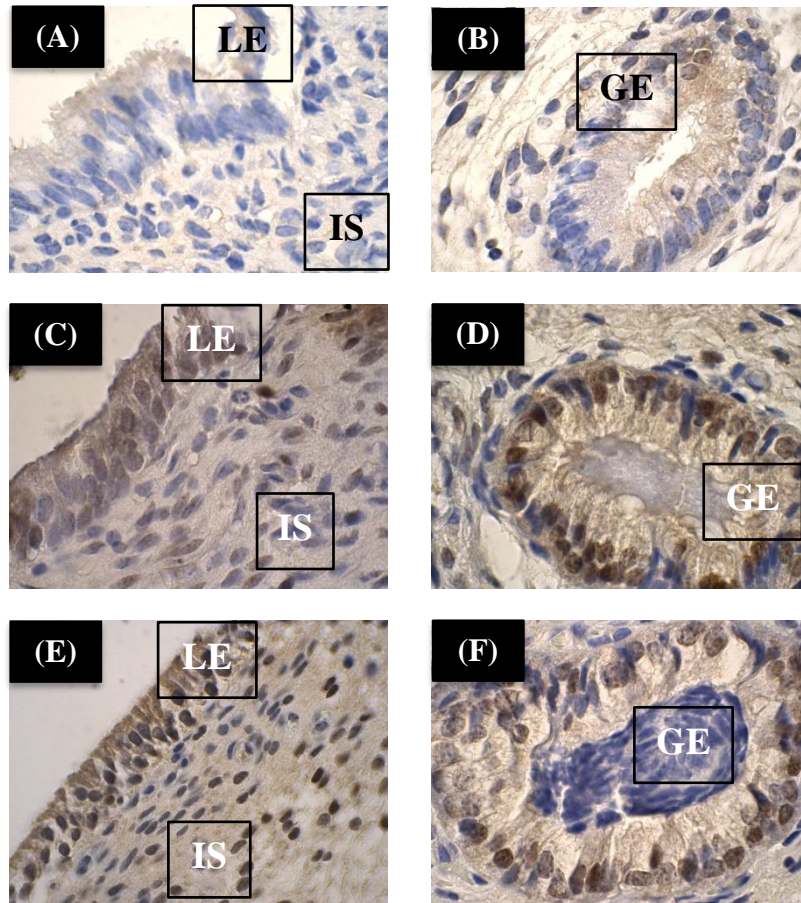


Figura 3.3.7. Localización inmunohistoquímica del receptor de estrógenos α ($ER\alpha$) en el epitelio luminal (LE), estroma intercaruncular (IS) y epitelio glandular (GE) de los controles negativos (A, B) en el cuerno uterino ipsilateral al CL en el día 6 luego de la ovulación. Las muestras para el tratamiento eCG (C, D) y para GnRH (E, F), respectivamente, se muestran como efectos principales. El control negativo no mostró tinción porque los anticuerpos específicos fueron sustituidos por una IgG no inmunitaria (A, B).

En el área total de PR positivo hubo una tendencia en el tipo celular ($P < 0,1$), y en la interacción entre el tratamiento eCG y hora de administración de GnRH también se observó una tendencia ($P < 0,1$). Las pruebas de Tukey–Kramer mostraron que el epitelio luminal presentaba más área de tinción PR positiva que en el estroma intercaruncular (70 ± 6 vs. 58 ± 6 %; $P < 0,05$), y en el epitelio glandular hubo una tendencia a presentar más área de tinción PR positiva que en el estroma intercaruncular (68 ± 6 vs. 58 ± 6 %; $P < 0,1$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el epitelio luminal y glandular ($P = \text{NS}$). En el epitelio luminal, las vaquillonas del grupo eCG + GnRH a las 72 h tenían más área de tinción PR positiva que las del grupo eCG + GnRH a las 48 h ($P < 0,05$), y que las del grupo No eCG + GnRH a las 72 h ($P < 0,05$; Figura 3.3.8 panel superior). Además, las vaquillonas del grupo No eCG + GnRH a las 48 h presentaron más área de tinción PR positiva que las del grupo eCG + GnRH a las 48 h en el epitelio glandular ($P < 0,05$; Figura 3.3.8 panel superior).

El área total de ER α positivo se vio afectada por el tipo celular ($P < 0,01$), y por la interacción entre las células, el tratamiento eCG y la hora de administración de GnRH ($P < 0,01$). El epitelio luminal presentó más área de tinción ER α positiva que en el estroma intercaruncular (63 ± 6 vs. 40 ± 5 %; $P < 0,01$), y el epitelio glandular presentó más área de tinción ER α positiva que en el estroma intercaruncular (64 ± 5 vs. 40 ± 5 %; $P < 0,01$). En el epitelio luminal, las vaquillonas del grupo eCG + GnRH a las 72 h tenían más área de tinción ER α positiva que aquellas en el grupo eCG + GnRH a las 48 h (89 ± 13 vs. 37 ± 12 %; $P < 0,05$; Figura 3.3.8 panel inferior).

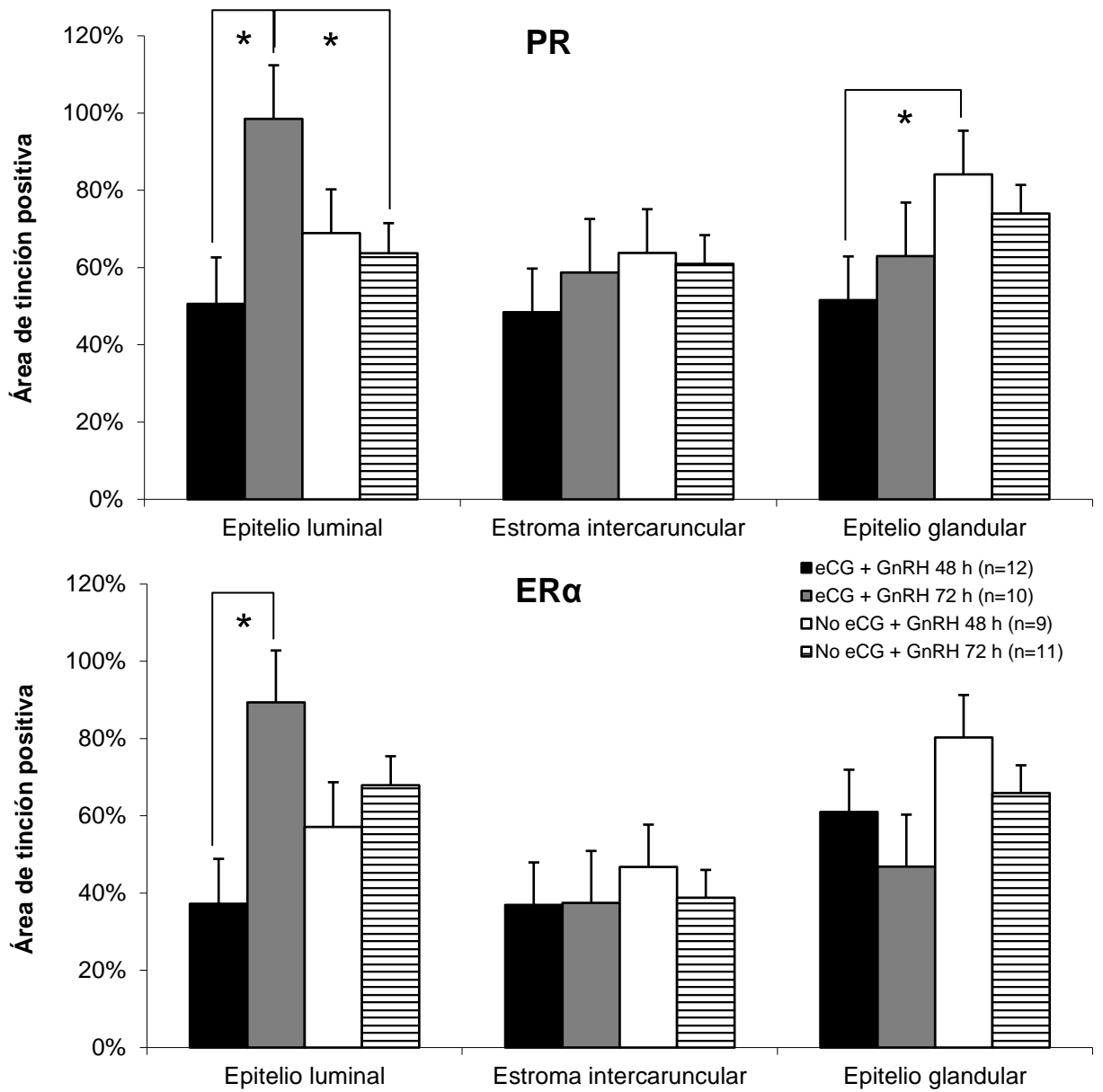


Figura 3.3.8. Área de tinción positiva del receptor de progesterona (PR, panel superior) y del receptor de estrógenos α (ER α , panel inferior) en el epitelio luminal, estroma intercaruncular y epitelio glandular en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Las muestras fueron tomadas al día 6 luego de la ovulación mediante biopsia uterina de la porción craneal del cuerno. Los datos están expresados como promedio \pm SEM, y los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

Experimento IV (publicación II)

Efecto de la prolongación del proestro sobre la tasa de preñez

Las vaquillonas que recibieron eCG en el momento del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona tuvieron una mayor tasa de preñez que las que no recibieron eCG ($P < 0,05$; Tabla 3.4.1). Además, las vaquillonas que fueron tratadas con GnRH e inseminadas a las 60 h tuvieron una mayor tasa de preñez que aquellas con GnRH / IATF a las 72 h ($P < 0,05$; Tabla 3.4.1). Hubo una interacción entre el tratamiento eCG y GnRH / IATF, debido a una tasa de preñez en aquellas vaquillonas del grupo No eCG + GnRH / IATF a las 72 h comparada a las demás vaquillonas de los otros tres grupos de tratamiento ($P < 0,05$). Las vaquillonas con CL presente al inicio del tratamiento tuvieron una mayor tasa de preñez que aquellas sin CL al iniciar el tratamiento ($P < 0,05$), sin interacción entre el tratamiento eCG ni con GnRH / IATF (Tabla 3.4.1).

Tabla 3.4.1

Tasa de preñez obtenida con la administración de eCG al inicio del proestro (*i.e.*: al momento del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona) en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch), y con GnRH / IATF a las 60 h o a las 72 h luego del retiro del dispositivo en vaquillonas de carne. Los efectos principales se resumen en el panel superior, y de acuerdo con la interacción ($P < 0,05$) los efectos simples se encuentran en el panel inferior.

	Tratamiento	Tasa de preñez	Letras diferentes, $P < 0,05$
Efectos principales			
Tratamiento eCG	eCG	57,1% (739/1.295)	a
	No eCG	53,1% (692/1.303)	b
Momento de GnRH / IATF	IATF 60 h	57,0% (749/1.313)	a
	IATF 72 h	53,1% (682/1.285)	b
Presencia de cuerpo lúteo (CL)	Con CL	57,3% (937/1.636)	a
	Sin CL	51,4% (494/962)	b
Efectos simples			
Interacción eCG x IATF	eCG + IATF 60 h	57,9% ^a (368/636)	a
	eCG + IATF 72 h	56,3% ^a (371/659)	a
	No eCG + IATF 60 h	56,3% ^a (381/677)	a
	No eCG + IATF 72 h	49,7% ^b (311/626)	b

No se encontró interacción entre la presencia del CL y los tratamientos eCG o GnRH / IATF ($P = NS$).

Experimento V (publicación III)

Asociación entre el proestro prolongado, el diámetro folicular y la tasa de preñez

El diámetro del folículo ovulatorio en el momento de la GnRH / IATF fue mayor en las vaquillonas con 72 h y con 60 h de duración de proestro ($P < 0,05$) que en aquellas con 48 h de duración de proestro (Tabla 3.5.1). La expresión del estro en el momento de la IATF fue de 72,2% (379/525) y mostró una tendencia a ser mayor cuando se realizó GnRH / IATF a las 72 h ($P < 0,1$) en comparación con aquellas vaquillonas en las que se realizó a las 60 h o a las 48 h después del retiro del dispositivo con progesterona (Tabla 3.5.1). En una proporción de vaquillonas (19/178) no se detectó ningún folículo grande (*i.e.*: > 8 mm de diámetro) al momento de la GnRH / IATF y el 68,4% (13/19) de ellas estaban preñadas a los 33 días luego de la IATF. Asumimos que todas estas vaquillonas ovularon antes de la administración de la GnRH, porque la pintura de la base de la cola indicaba que todas habían estado en celo (*i.e.*: expresión del estro). Este hallazgo fue mayor en aquellas vaquillonas en las que se realizó GnRH / IATF a las 72 h que en aquellas en las que se realizó a las 60 h o a las 48 h ($P < 0,05$; Tabla 3.5.1). La tasa de preñez tendió a ser mayor en las vaquillonas que se realizó GnRH / IATF a las 72 h ($P < 0,1$) en comparación con aquellas vaquillonas en las que se realizó a las 60 h o a las 48 h luego del retiro del dispositivo con progesterona (Tabla 3.5.1).

Tabla 3.5.1

Efecto de diferentes longitudes de proestro* sobre el tamaño del folículo preovulatorio, la expresión del estro y la tasa de preñez en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.

Duración del proestro*	Diámetro del folículo ovulatorio en la IATF (mm)	Vaquillonas en celo en la IATF	Vaquillonas ovuladas en la IATF	Tasa de preñez
GnRH / IATF 48 h	12,2 ± 0,1 ^a	68,2% (122/179) ^c	1,7% (3/179) ^a	63,6% (196/308) ^c
GnRH / IATF 60 h	12,8 ± 0,1 ^b	71,4% (120/168) ^{cd}	1,2% (2/168) ^a	63,1% (183/290) ^{cd}
GnRH / IATF 72 h	12,9 ± 0,2 ^b	77,0% (137/178) ^d	10,7% (19/178) ^b	70,0% (219/313) ^d
<i>P</i> -valor	$< 0,05$	$< 0,1$	$< 0,05$	$< 0,1$

* Intervalo desde el retiro del dispositivo intravaginal con progesterona hasta la GnRH / IATF.

Un histograma descriptivo de la frecuencia de diferentes tamaños foliculares se muestra en la Figura 3.5.1. El diámetro encontrado con mayor frecuencia en aquellas vaquillonas con GnRH / IATF realizada a las 48 h fue de 12,0 mm (27% de las vaquillonas), a las 60 h fue de 13,0 mm (24%) y a las 72 h fue de 14,0 mm (22%), respectivamente.

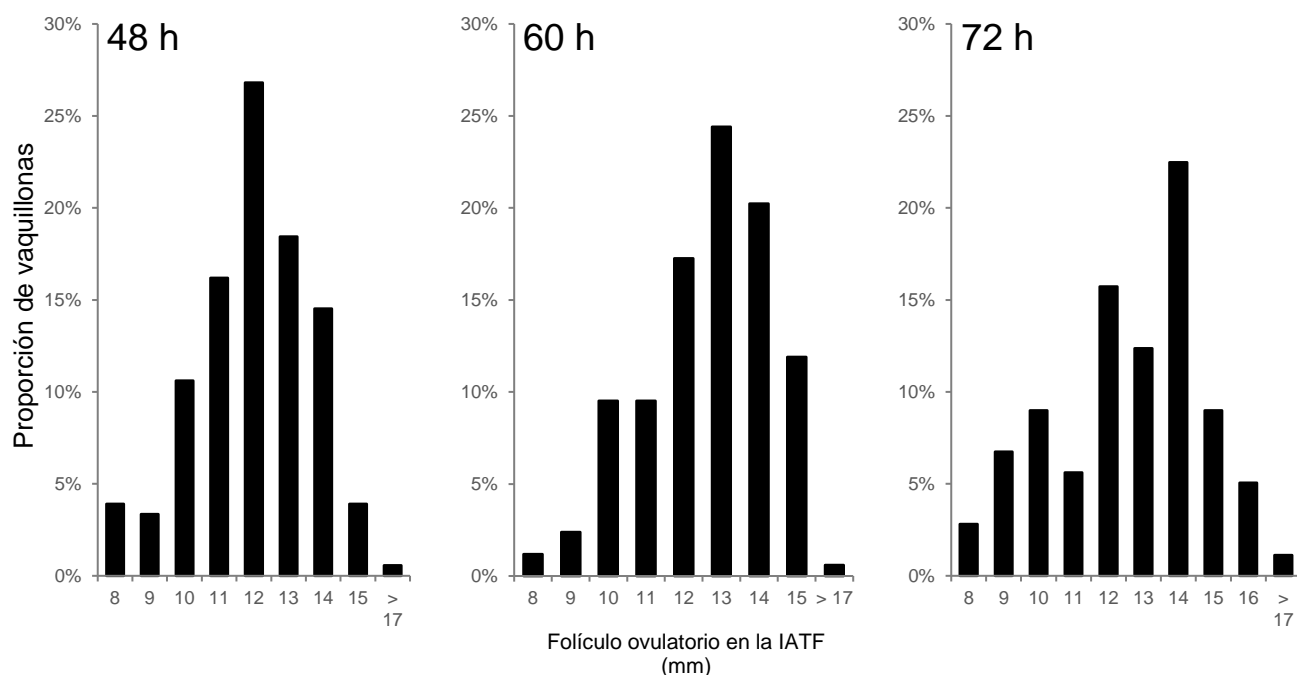


Figura 3.5.1. Representación descriptiva del efecto de la longitud del proestro (*i.e.*: intervalo desde el retiro del dispositivo con progesterona hasta la GnRH / IATF) sobre el diámetro folicular alcanzado en el momento de la IATF en vaquillonas de carne. El valor modal del diámetro del folículo ovulatorio cambió de 12,0 a 14,0 mm cuando la longitud del proestro se extendió de 48 h a 72 h, con una respuesta cuadrática en las tres diferentes longitudes de proestro ($P < 0,05$).

Al inicio del tratamiento con progesterona, se detectó la presencia de un CL en el 54,2% de las vaquillonas (494/911). El diámetro del folículo preovulatorio no se vio afectado por la presencia del CL en el momento de la colocación del dispositivo intravaginal con progesterona ($P = NS$), y se encontró una tendencia ($P < 0,1$) para la interacción entre la presencia del CL al inicio del tratamiento y la longitud del proestro.

La expresión del estro no se vio afectada por la presencia del CL al inicio del tratamiento de sincronización ($P = \text{NS}$), y hubo una interacción ($P < 0,05$) entre la presencia del CL al inicio del tratamiento y la longitud del proestro. Se encontró una relación positiva entre la expresión del estro en el momento de la IATF y el diámetro del folículo preovulatorio, la probabilidad de expresión del estro aumentó a medida que el diámetro folicular aumentaba, de manera cuadrática ($R^2 = 0,99$; $P < 0,05$; Figura 3.5.2, panel izquierdo). Además, la probabilidad de preñez se asoció positivamente con el diámetro del folículo de mayor tamaño en el momento de la IATF en el grupo con longitud de proestro de 48 h ($P < 0,05$), mientras que no fue significativa en las vaquillonas de los grupos con longitud de proestro de 60 y 72 h ($P = \text{NS}$; Fig. 3.5.2, panel derecho).

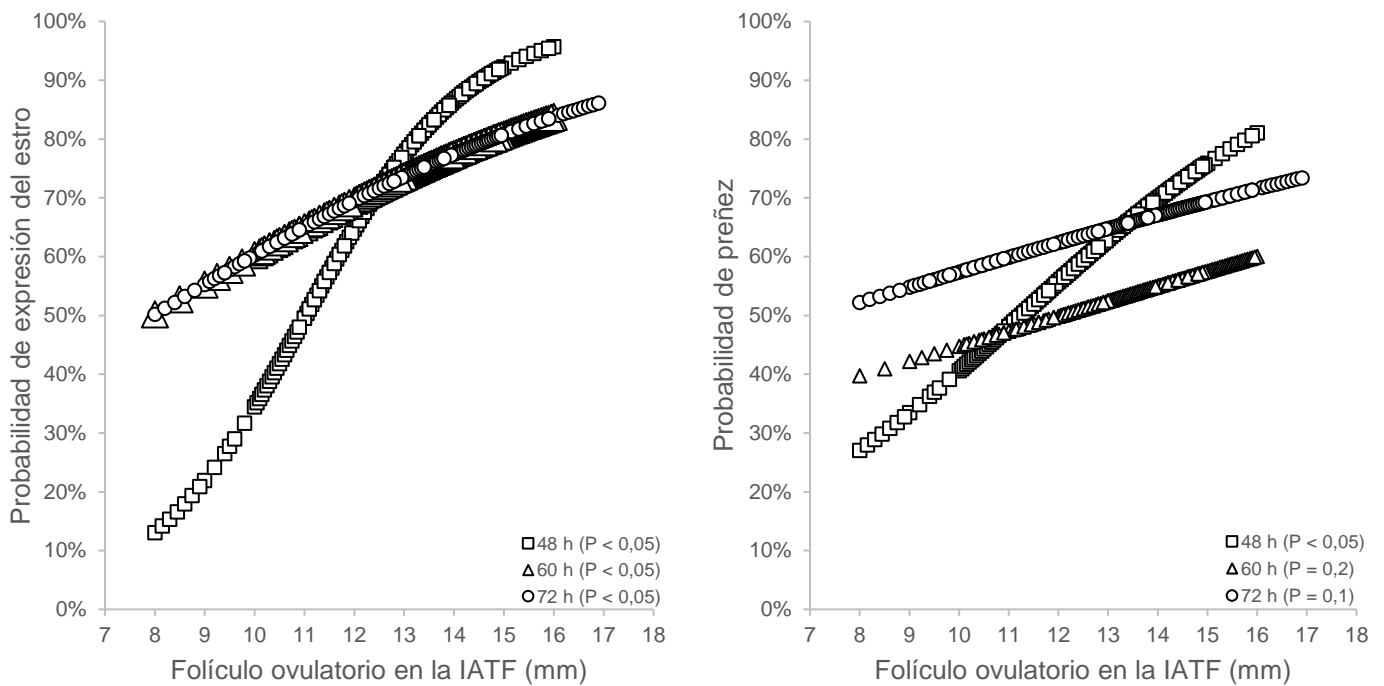


Figura 3.5.2. Probabilidad de expresión del estro (panel izquierdo) y probabilidad de preñez (panel derecho) según el diámetro del folículo de mayor tamaño en el momento de la IATF en vaquillonas para carne sometidas a diferentes longitudes de proestro (*i.e.*: intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la administración de GnRH / IATF: 48 h, 60 h o 72 h).

Se encontró una correlación positiva entre el diámetro del folículo preovulatorio ($r_{\text{part}} = 0,12$) y la expresión del estro ($r_{\text{part}} = 0,28$), la cual se asoció positivamente con la tasa de preñez ($r = 0,30$; $P < 0,01$). La probabilidad de preñez aumentó a medida que

aumentaba el diámetro del folículo preovulatorio (Figura 3.5.2), que según el análisis estadístico el mejor ajuste se correspondió con un modelo de regresión cuadrática ($R^2 = 0,99$; $P = 0,050$) en comparación con un modelo de regresión lineal ($R^2 = 0,96$; $P = 0,054$). De hecho, la probabilidad de preñez tendió a aumentar 1,07 veces cuando las vaquillonas fueron tratadas con GnRH / IATF a las 72 h en comparación con aquellas que recibieron GnRH / IATF a las 48 h ($P < 0,1$; Tabla 3.5.2). La presencia de un CL en el momento de la inserción del dispositivo y la expresión del estro aumentaron la probabilidad de preñez ($P < 0,05$; Tabla 3.5.2).

Tabla 3.5.2

Probabilidad de preñez para diferentes longitudes de proestro* en un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (protocolo J–Synch) en vaquillonas de carne.

Duración del proestro*	Odds Ratios	(IC 95%)		<i>P</i> -valor
		Inferior	Superior	
GnRH / IATF 48 h	Referencia	–	–	–
GnRH / IATF 60 h	0,66	0,42	1,03	0,13
GnRH / IATF 72 h	1,07	0,68	1,69	0,07
Efectos principales				
Sin CL	Referencia	–	–	–
Con CL	1,46	1,01	2,13	0,05
Sin celo	Referencia	–	–	–
Con celo	1,72	1,14	2,60	0,01

* Intervalo desde el retiro del dispositivo intravaginal con progesterona hasta la GnRH / IATF.

La tasa de preñez se vio afectada por la presencia de un CL en el momento de la inserción del dispositivo intravaginal con progesterona (71,3%, 352/494 vs. 59,0%, 246/417; $P < 0,01$) y se observó una tendencia ($P < 0,1$) en la interacción entre la presencia del CL, longitud del proestro y expresión del estro en el momento de la IATF. Por esta razón, la tasa de preñez en los tres grupos experimentales se muestra por separado para las vaquillonas con o sin CL en el momento de la inserción del dispositivo con progesterona (Figura 3.5.3). En las vaquillonas con CL al inicio del tratamiento, la tasa de preñez fue mayor en aquellas que se les realizó GnRH / IATF a las 72 h ($P < 0,05$) comparado con las que se les realizó GnRH / IATF a las 48 h o a las 60 h (Figura 3.5.3). En las vaquillonas sin CL la tasa de preñez no fue diferente ($P = NS$) entre los grupos experimentales (promedio 59,0%; Figura 3.5.3).

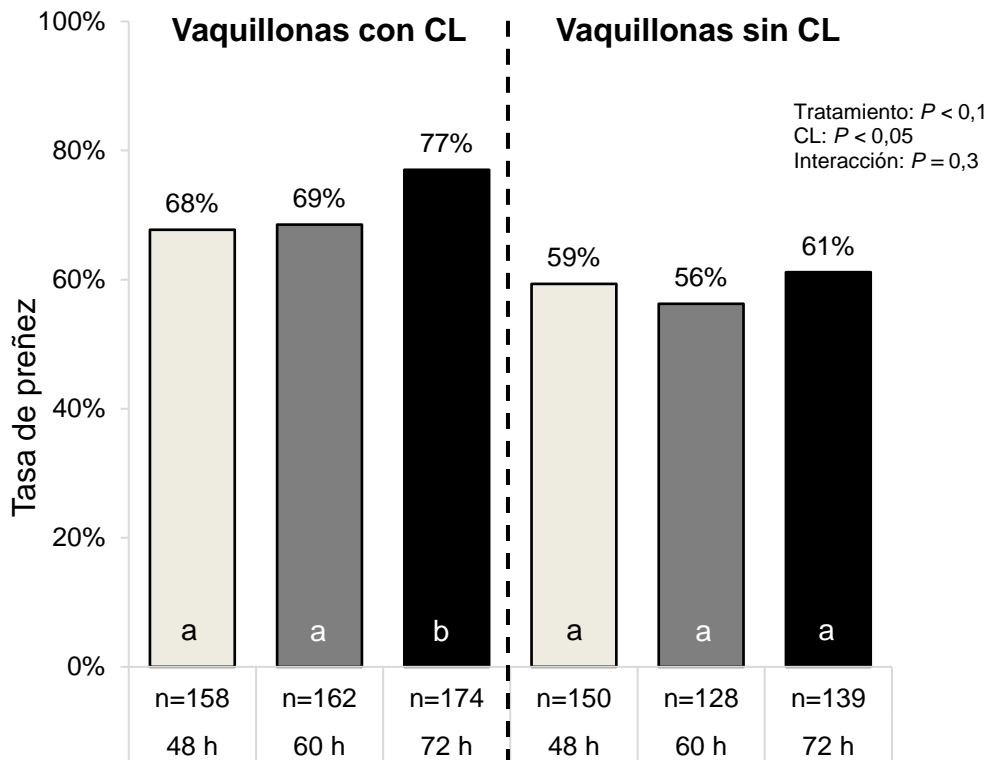


Figura 3.5.3. Tasa de preñez obtenida con diferentes longitudes de proestro (*i.e.*: intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la GnRH / IATF) en vaquillonas con CL (panel izquierdo) y sin CL (panel derecho) sincronizadas con un tratamiento para IATF con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch). Para vaquillonas con presencia de CL (a vs. b; $P < 0,05$).

Cuando los resultados se analizaron con relación a la expresión del estro en el momento de la IATF (*i.e.*: pintura de cola borrada > 30%), la tasa de preñez fue mayor en las vaquillonas que estaban en celo comparadas con aquellas que no estaban en celo (63,9%, 242/379 vs. 45,9%, 67/146; $P < 0,01$). En aquellas vaquillonas que presentaron signos de celo, se obtuvo una mayor tasa de preñez en las que se les realizó GnRH / IATF a las 72 h que en aquellas que se les realizó a las 60 h ($P < 0,05$), mientras que fue intermedia en aquellas con GnRH / IATF a las 48 h (Figura 3.5.4). Por el contrario, la tasa de preñez no fue diferente ($P = NS$) entre los grupos experimentales (promedio 45,9 %, 67/146) en las vaquillonas que no mostraron signos de celo (Figura 3.5.4). Finalmente, hubo una interacción entre la presencia del CL al momento de colocar el dispositivo y la expresión del estro en las vaquillonas que se les realizó GnRH / IATF a las 72 h, debido a una menor tasa de preñez en aquellas vaquillonas que no manifestaron signos de celo ni tenían CL ($P < 0,05$; Tabla 3.5.3). Para el mismo grupo experimental, la tasa de preñez se vio afectada por la presencia del CL al momento de colocar el dispositivo y la expresión del estro ($P < 0,05$), mientras que se observó una tendencia en la expresión del estro ($P < 0,1$) en aquellas vaquillonas que se les realizó GnRH / IATF a las 48 h y a las 60 h (Tabla 3.5.3).

Tabla 3.5.3

Interacción entre diferentes longitudes de proestro*, presencia de cuerpo lúteo (CL) y expresión del estro sobre la tasa de preñez después de un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (protocolo J-Synch) en vaquillonas de carne.

Duración del proestro	Vaquillonas con CL		Vaquillonas sin CL		<i>P-valor</i>		
	Estro	No estro	Estro	No estro	<i>Estro x CL</i>	<i>Estro</i>	<i>CL</i>
GnRH / IATF 48 h	63,9% (23/36) ^a	52,0% (13/25) ^a	64,0% (55/86) ^a	46,9% (15/32) ^a	0,758	0,059	0,968
GnRH / IATF 60 h	67,3% (33/49) ^a	42,9% (12/28) ^b	49,3% (35/71) ^{ab}	45,0% (9/20) ^{ab}	0,234	0,078	0,191
GnRH / IATF 72 h	73,8% (45/61) ^a	76,9% (10/13) ^a	67,1% (51/76) ^a	28,6% (8/28) ^b	0,029	0,005	0,014

Cuando se encontró interacción, para una misma fila a vs. b, $P < 0,05$ difieren.

* Intervalo desde el retiro del dispositivo con progesterona hasta la GnRH / IATF.

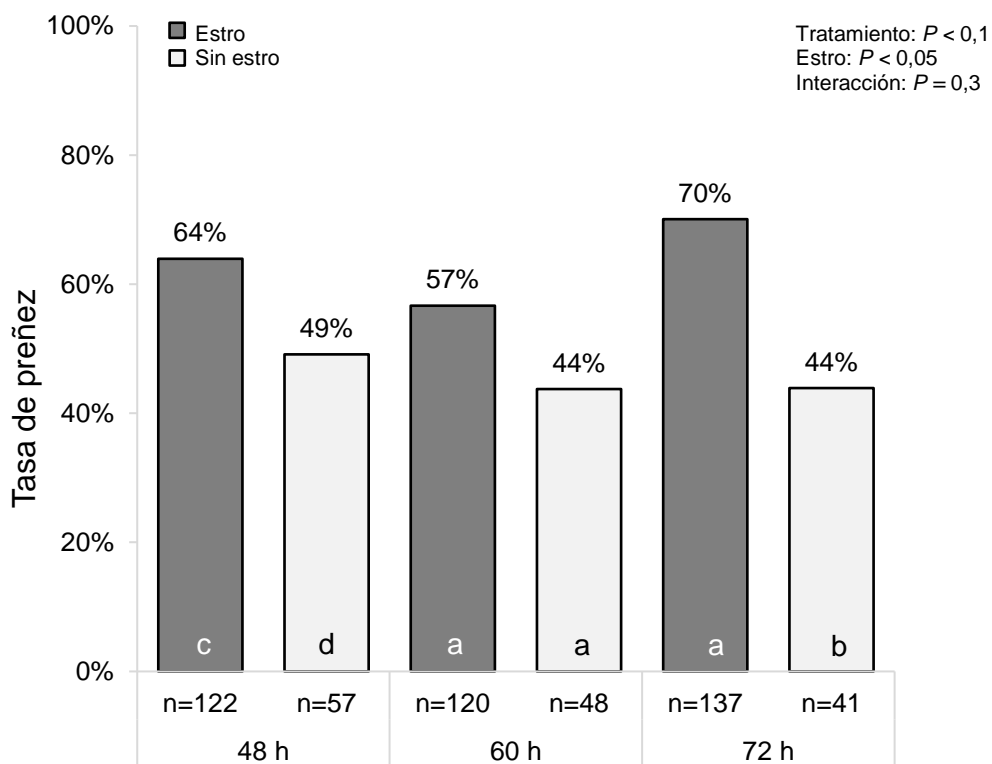


Figura 3.5.4. Tasa de preñez obtenida con diferentes longitudes de proestro (*i.e.*: intervalo desde el retiro del dispositivo hasta las GnRH / IATF) en vaquillonas que fueron sincronizadas con un tratamiento con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) con expresión del estro (barras grises) y sin expresión del estro (barras blancas) en el momento de la IATF (a vs. b, $P < 0,05$; c vs. d, $P < 0,1$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis soportan las hipótesis planteadas. La implementación de alternativas farmacológicas ($\text{PGF}_{2\alpha}$ y GnRH) mejoran las condiciones ovulatorias. El crecimiento folicular preovulatorio y el ambiente uterino post-ovulatorio mejoran con la longitud prolongada del proestro. La administración de eCG al final del tratamiento de 6 días con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) mejora la tasa de preñez. La combinación de estas estrategias favorece la función luteal previo al período crítico y la secreción de hormonas esteroideas, las que a su vez provocan una expresión génica uterina diferencial incrementando la tasa de preñez en vaquillonas de carne.

Los resultados de los Experimentos I y II indican que, en vaquillonas con un CL presente al inicio del tratamiento, las respuestas ováricas durante el tratamiento con progesterona y estradiol se ven afectadas por la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el momento de la colocación del dispositivo con progesterona. Además, se obtuvieron concentraciones menores de progesterona durante el período de tratamiento con el dispositivo intravaginal, aumentó el diámetro del folículo ovulatorio y la ovulación ocurrió más temprano en relación con el momento del retiro del dispositivo con progesterona. La tasa de preñez no estuvo afectada por la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el momento de la colocación del dispositivo y, en consecuencia, esta fue menor cuando se realizó la IATF a las 54 h luego del retiro del dispositivo con progesterona.

Los Experimentos III y IV se realizaron para definir mejor el protocolo J-Synch con respecto al uso de la eCG y el momento de la administración de la GnRH, y para comprender los aspectos moleculares de la biología uterina potencialmente afectada por estos tratamientos. Nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con eCG mejoró la tasa de preñez en vaquillonas cuando se administró al final de un tratamiento de 6 días con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch). Además, la extensión de la longitud del proestro retrasando la administración de GnRH de 48 a 72 h, dio como resultado un folículo ovulatorio de mayor tamaño, con más tiempo de exposición al estradiol preovulatorio endógeno y mayores concentraciones séricas de progesterona post-ovulatoria comparado con el proestro corto. La funcionalidad uterina se vio afectada por los tratamientos, contribuyendo a una mejor comprensión en la manipulación farmacológica de la reproducción de la hembra bovina. Estos hallazgos están respaldados por diferentes enfoques basados en exámenes de ovario mediante ultrasonografía,

determinaciones de concentraciones séricas hormonales, expresión de proteína uterina y tasa de preñez obtenida con este tratamiento para IATF en vaquillonas de carne.

En el Experimento V, nos centramos en la comparación entre tres diferentes longitudes de proestro, inducidas por el tratamiento con GnRH administrada a las 48 h, a las 60 h o a las 72 h luego del retiro del dispositivo intravaginal en un tratamiento con progesterona y estradiol de 6 días (protocolo J-Synch), respectivamente. En este experimento se demuestra que extender el período de duración del proestro retrasando la administración de GnRH de 48 a 72 h, obtenemos como resultado un folículo preovulatorio de mayor tamaño, una mayor proporción de vaquillonas con expresión del estro, y mejora la tasa de preñez en vaquillonas con CL cuando comparado con resultados de un tratamiento con proestro corto. Además, observamos que existe una correlación positiva entre la longitud del proestro, el diámetro del folículo preovulatorio, la expresión del estro y esto se asocia con el aumento en la tasa de preñez en vaquillonas de carne *Bos taurus*.

El efecto positivo de concentraciones de progesterona relativamente menores sobre el crecimiento del folículo dominante ha sido claramente documentado (Sirois and Fortune, 1990; Utt *et al.*, 2003; Dadarwal *et al.*, 2013), efecto que está mediado por un aumento en la frecuencia de pulsos de LH (Ireland and Roche, 1982; Ginther *et al.*, 2001, 2013a). Altas concentraciones de progesterona disminuyen la frecuencia de pulsos de LH (Bergfeld *et al.*, 1996; Ginther and Beg, 2012) y, en consecuencia, suprimen el crecimiento folicular dando como resultado folículos más pequeños (Stock and Fortune, 1993; Adams *et al.*, 2008) por lo que a veces hay una falla en la ovulación. Si ocurre la ovulación a partir de folículos pequeños, la fertilidad es probablemente menor debido a: 1) el desarrollo de un CL más pequeño y, consecuentemente, concentraciones de progesterona relativamente menores que cuando ovulan folículos más grandes (Crowe, 2008; Wiltbank *et al.*, 2012b), 2) menor competencia en el desarrollo de ovocitos (Lequarre *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2018) o 3) menores concentraciones preovulatorias de estradiol que afectan negativamente la programación uterina (Bó *et al.*, 2016; Binelli *et al.*, 2017; de la Mata *et al.*, 2018). Aún no han sido establecidas con claridad las concentraciones óptimas de progesterona para obtener un medio endócrino y condiciones fisiológicas que resulten en una tasa de preñez máxima con el uso de tratamientos para IATF, en ese sentido estos trabajos aportan información novedosa. En el Experimento I, las concentraciones de progesterona circulante en vaquillonas tratadas con PGF_{2α} al momento de colocar y de retirar el dispositivo fueron menores durante el tratamiento comparado con las de vaquillonas tratadas con una sola dosis de PGF_{2α} al momento del retiro del dispositivo. Este efecto promovió el crecimiento folicular preovulatorio, resultando en un diámetro mayor del folículo ovulatorio al finalizar el tratamiento y al momento de la ovulación. Por lo tanto, los resultados de este Experimento indican que, en vaquillonas con CL con el uso de esta estrategia, hubo un mantenimiento efectivo de

las concentraciones óptimas de progesterona para promover el crecimiento folicular preovulatorio.

En general, cuanto más grande es el folículo dominante al final del tratamiento para IATF, menor es el intervalo entre el inicio del estro y la ovulación (Savio *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2013b). El tamaño del folículo ovulatorio y su madurez fisiológica están implicados en la contribución al establecimiento y mantenimiento de la gestación (Lamb *et al.*, 2001). En este primer Experimento, el intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación fue menor en las vaquillonas que recibieron el tratamiento con PGF_{2α} dividida en dos medias dosis. La conveniencia con el uso de este tratamiento es algo controversial, porque el beneficio del aumento en el tamaño del folículo ovulatorio queda anulado por el tiempo a la ovulación más temprano en comparación con el efecto de la dosis única al final del tratamiento, que se asocia con una menor cantidad de estradiol endógeno durante el período preovulatorio (Binelli *et al.*, 2009, 2014) y la programación uterina (Sponchiado *et al.*, 2017; de la Mata *et al.*, 2018). Dado que el intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación parece afectar la fertilidad (Bridges *et al.*, 2008), se han propuesto e implementado con éxito estrategias novedosas para prolongar la longitud del proestro (Bridges *et al.*, 2010; de la Mata *et al.*, 2018). Por lo tanto, este efecto paradójico del tratamiento con PGF_{2α} al momento de colocar el dispositivo podría tener un resultado desconocido, si no negativo, sobre la fertilidad.

En el Experimento II, incluso con las diferencias en las concentraciones de progesterona circulante y del diámetro del folículo ovulatorio entre los grupos de tratamiento con PGF_{2α}, los resultados en la tasa de preñez fueron similares luego de la IATF. En este trabajo, la IA se realizó a las 48 h o a las 54 h y la ovulación ocurrió aproximadamente entre las 64 h y las 78 h luego de retirado el dispositivo con progesterona (*i.e.*: en promedio de 10 a 30 h luego de la IA). En las vaquillonas de 2 años con CL tratadas con las dos medias dosis de PGF_{2α} e IATF realizada a las 54 h luego de retirado el dispositivo, la tasa de preñez fue menor que en las que fueron tratadas con una dosis única al momento del retiro del dispositivo y que las que fueron IATF a las 48 h. La hipótesis fue que la menor tasa de preñez obtenida en vaquillonas con IATF a las 54 h se relacionó con un intervalo más corto desde la IA hasta la ovulación. En el grupo de tratamiento con dos medias dosis de PGF_{2α}, sin embargo, la tasa de preñez fue similar cuando la IATF se realizó a las 48 h de retirado el dispositivo, por lo que este resultado no soporta por completo la hipótesis planteada. En relación con este resultado, no parece ser beneficioso usar este tratamiento con dos medias dosis, al momento de colocar y de retirar el dispositivo con progesterona en vaquillonas de carne. Estudios previos en vaquillonas cruza *Bos indicus* indicaron que aquellas que tenían un CL al comienzo del tratamiento y tenían una concentración de progesterona circulante relativamente mayor inducida por la colocación de un dispositivo intravaginal comparadas con aquellas que

no habían sido tratadas con dispositivos podrían tener un menor crecimiento de los folículos dominantes, lo que afectaría de manera negativa la tasa de ovulación y la de preñez (Cutaia *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2013; Sá Filho *et al.*, 2015; Sales *et al.*, 2015). Los resultados de este Experimento en vaquillonas *Bos taurus* no son consistentes con esta línea de trabajo en vaquillonas *Bos indicus* e indican que hubo un efecto diferenciado entre estas hembras. Se ha reportado diferencias significativas en la farmacocinética de la progesterona entre vaquillonas *Bos indicus* y *Bos taurus* (Carvalho *et al.*, 2008; 2017; Batista *et al.*, 2020). Además, cuando se administra el mismo tratamiento con progesterona en ambos genotipos, las concentraciones de progesterona circulante, que suprimen el crecimiento folicular y conducen a menores tasa de preñez luego de la IA, son mayores en las vaquillonas *Bos indicus* (Sartori *et al.*, 2016a, 2016b; Carvalho *et al.*, 2017). Las diferencias entre el beneficio del tratamiento con PGF_{2α} en vaquillonas *Bos indicus* reportado previamente y el efecto neutral de las vaquillonas *Bos taurus* que se determinó en este Experimento parece estar respaldado por las diferencias en la farmacocinética de la progesterona reportada anteriormente como consecuencia de un diferente metabolismo hepático de la progesterona entre las dos subespecies (Batista *et al.*, 2020).

El control de las concentraciones de progesterona circulante mediante la administración de PGF_{2α} en el momento de la colocación del dispositivo también puede verse afectado por la cantidad de progesterona contenida en el dispositivo intravaginal. Los resultados de estos dos Experimentos son válidos solo para el tratamiento con dispositivos que contienen 0,5 g de progesterona, asociados a una dosis de eCG al final del tratamiento con el dispositivo intravaginal. Este protocolo para IATF, que consiste en un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, EB, ECP y eCG, es el tratamiento más popular en los países de América del Sur (Bó *et al.*, 2018), donde más de 16 millones de vacas y vaquillonas son inseminadas anualmente usando protocolos de IATF (Mapletoft *et al.*, 2018). Utilizando este protocolo, con una media dosis de PGF_{2α} en el momento de la colocación del dispositivo no parece ser beneficioso para mejorar la tasa de preñez en vaquillonas *Bos taurus*, y se recomienda la dosis completa en una sola administración en el momento del retiro del dispositivo. Desde el punto de vista práctico, además de la fácil implementación del tratamiento con una sola dosis de PGF_{2α}, el período más largo para realizar las inseminaciones (*i.e.*: de 48 a 56 h), puede mantenerse con la administración de una sola dosis de PGF_{2α} al final del tratamiento. Esto es relevante para programas de IATF a gran escala con 400 o 500 hembras por día (*i.e.*: IA a.m. y p.m.), y en pequeñas cantidades también, permite manejar el momento más conveniente para realizar la inseminación.

Los tratamientos basados en la prolongación del proestro han atraído gran atención de los profesionales, asesores y productores en toda América, porque se ha reportado que la tasa de preñez es mayor que la obtenida con los protocolos

convencionales en ganado de carne (Bó *et al.*, 2007, 2018; Day *et al.*, 2015). En un estudio reciente se demostró que el protocolo J–Synch fue eficaz para extender el proestro al acortar el tratamiento con progesterona (de 7 u 8 a 6 días) y al reemplazar la administración del cipionato de estradiol al retirar el dispositivo por GnRH administrada a las 60 o 72 h más tarde (de la Mata *et al.*, 2018). En el Experimento III, nos centramos en la comparación entre un proestro corto y uno prolongado, inducido por el tratamiento con GnRH administrada a las 48 h vs. a las 72 h luego de retirado el dispositivo, respectivamente. La administración de GnRH a las 72 h retrasó la ovulación, aumentó el tamaño del folículo ovulatorio, prolongó el período de exposición al estradiol endógeno previo a la ovulación e indujo mayores concentraciones séricas de progesterona y área de tinción positiva para los receptores PR y ER α uterinos en la fase luteal posterior. Estos hallazgos se han asociado con un mayor éxito en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en el ganado de carne (Lonergan *et al.*, 2016; Binelli *et al.*, 2017; Sá Filho *et al.*, 2017). Además, en un estudio previo en el que se realizó IATF tras un proestro prolongado inducido por un protocolo J–Synch (GnRH / IATF de 60 a 72 h), la tasa de preñez fue mayor que la obtenida con el protocolo convencional utilizando cipionato de estradiol (de la Mata *et al.*, 2018). También se ha reportado que la tasa de preñez fue mayor que cuando se realizó GnRH / IATF a las 48 h, en comparación con 72 h en vaquillonas tratadas con el protocolo J–Synch y eCG (Núñez–Olivera *et al.*, 2016). Este experimento contribuye con hallazgos explicativos relacionados con la función ovárica y el ambiente uterino, lo que respalda la conveniencia de extender la longitud del proestro en los protocolos para IATF en ganado de carne.

La administración de eCG mejoró la tasa de preñez cuando se realizó la IATF a las 72 h de retirado el dispositivo intravaginal con progesterona. Esta mayor tasa de preñez inducida por el tratamiento con eCG no fue influenciada por el estado del ovario al inicio del tratamiento. La diferencia entre vaquillonas tratadas con eCG y no tratadas se mantuvo tanto en aquellas con CL como en las sin CL (*i.e.*: ciclando o anestro, al momento de la colocación del dispositivo). Esta mejora en la tasa de preñez reportada por varios estudios, muchos de ellos realizados en Argentina, Brasil y Uruguay en condiciones de pasturas similares (revisado por Bó *et al.*, 2007; Mapletoft *et al.*, 2018) siempre asociada a los tratamientos con progesterona y estradiol (protocolos convencionales de 7 u 8 días), apoya el uso de esta gonadotrofina en programas para IATF. Los resultados actuales extienden esta práctica a las vaquillonas sometidas a protocolos con proestro prolongado.

Cuando se administró a vaquillonas en anestro, el tratamiento con eCG al retirar el dispositivo tendió a mejorar la función luteal post–ovulatoria. Aunque este hallazgo no se buscó en este experimento, resultados similares fueron reportados anteriormente en vacas con cría en anestro (Baruselli *et al.*, 2004; Bó *et al.*, 2007; Núñez–Olivera *et al.*, 2014) y en receptoras de embriones (Bó *et al.*, 2002). La regresión temprana del CL luego

de un tratamiento con progesterona y estradiol fue reportada previamente en vacas con cría en anestro posparto (Núñez–Olivera *et al.*, 2014). En este anterior estudio, demostramos que, aunque los tratamientos con progesterona y estradiol son efectivos para inducir la ovulación en la mayoría de las hembras en anestro, algunas no fueron capaces de mantener la función luteal después de la ovulación y regresaron al anestro. Estas vacas mostraron un aumento en las concentraciones séricas de progesterona durante la fase luteal temprana, que disminuyó a valores indetectables de 7 a 14 días luego de la ovulación. La misma respuesta se encontró en este Experimento III en vaquillonas prepúberes. Esta información apoya la idea de que los tratamientos con progesterona y estradiol no siempre son efectivos para superar el anestro en todas las hembras tratadas. Este experimento extiende esta noción a las vaquillonas y demuestra que la adición de la eCG al retirar el dispositivo mejora la inducción de la ciclicidad y contribuye con la capacidad del CL de mantener su función para el establecimiento de la gestación. Se ha demostrado que el tratamiento con eCG modificó características específicas relacionadas con la esteroidogénesis, como la forma mitocondrial y el número de células luteales grandes (Rigoglio *et al.*, 2013) y aumentó la expresión de enzimas esteroidogénicas (P450 scc, 3 β -HSD y StAR) en el CL (Fátima *et al.*, 2013). En este experimento, la mayor proporción de vaquillonas con un CL competente en las tratadas con eCG frente a las no tratadas (82,6% vs. 56,5%, respectivamente; $P = 0,054$), se vio afectada por una mayor inducción de la ovulación y una menor proporción de CLs de regresión prematura. Este hallazgo explica, al menos en parte, la mejora en la tasa de preñez obtenida con el uso de eCG en el momento del retiro del dispositivo en el Experimento IV.

Con respecto a la expresión génica de los esteroides sexuales, no encontramos diferencias entre los grupos experimentales, lo que concuerda con reportes anteriores (Robinson *et al.*, 2001). Además, de que se ha reportado que los estrógenos durante la fase folicular regulan hacia arriba tanto los receptores PR como los ER α en el útero de la mayoría de las especies mamíferas (Ing and Tornesi, 1997), y que la progesterona durante la fase lútea los regula hacia abajo, además debe tenerse en cuenta que la expresión de ARNm no siempre refleja el contenido de proteínas (Meikle *et al.*, 2000). La biopsia uterina completa se utilizó para realizar determinaciones de ARNm, mientras que la sensibilidad del tipo celular específico a los esteroides puede diferir. Por lo que, el aumento de las concentraciones séricas de estradiol-17 β en el tratamiento con eCG está relacionado con el mayor contenido de proteína de PR en el epitelio luminal en vaquillonas con eCG comparadas con aquellas sin eCG cuando la GnRH fue administrada a las 72 h. Los datos son muy consistentes en mostrar la relevancia del tiempo de administración de la GnRH en vaquillonas tratadas con eCG; evidenciándose más área de tinción PR-positiva y ER α -positiva en el epitelio luminal cuando se administró GnRH a las 72 h comparadas con las administradas a las 48 h. Estos datos concuerdan con las mayores concentraciones séricas de estradiol encontradas en las vaquillonas tratadas con eCG y GnRH a las 72 h, y amplían la idea de que extender la longitud del proestro mejora la actividad esteroidogénica del folículo y las concentraciones de estradiol (Bridges *et al.*,

2014; Mesquita *et al.*, 2014) que, en consecuencia, pueden afectar la funcionalidad uterina.

El proestro prolongado inducido por el protocolo J-Synch se define por la administración de GnRH de 60 a 72 h luego del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona (Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2018). En el Experimento IV, cuando se administró eCG al retirar el dispositivo en este protocolo de proestro prolongado, se obtuvo una tasa de preñez similar con IATF realizada a las 60 h o a las 72 h (~58% vs. ~56%), un hallazgo que confirma los resultados previos (~55% vs. ~57%) reportado recientemente (de la Mata *et al.*, 2018). De acuerdo con estos datos, sugerimos que la longitud óptima del proestro en vaquillonas *Bos taurus* puede ser de 60 a 72 h, lo que tiene implicancias prácticas para quienes aplican esta tecnología en establecimientos comerciales. Además, se debe agregar una dosis de eCG al momento del retiro del dispositivo con progesterona en el protocolo J-Synch permitiendo realizar la IATF de 60 a 72 h luego de retirado el dispositivo. Esta amplia ventana para la inseminación aumenta las posibilidades de aplicar IATF en rodeos grandes y con un manejo extensivo, ya que se pueden inseminar entre 400 y 500 hembras por día. En este caso, el dispositivo intravaginal con progesterona debe retirarse al final de la tarde del día 6 y la IATF realizarse durante todo el día 9 (desde temprano por la mañana hasta las últimas horas por la tarde). En cuanto a los resultados obtenidos con vaquillonas tratadas con eCG, la tasa de preñez fue similar entre las hembras con IATF en la mañana o en la tarde. Por otro lado, para aquellos rodeos pequeños con pocas hembras, el momento de la inseminación puede programarse a la mejor conveniencia durante el día 9, sin afectar la tasa de preñez.

La relación entre el diámetro del folículo preovulatorio y la tasa de preñez encontrada en el Experimento V está respaldada por varios estudios previos. Se ha reportado que la inducción de la ovulación de folículos pequeños disminuye la tasa de preñez o aumenta las pérdidas embrionarias / fetales tempranas en bovinos (Lamb *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005, 2008). Además, la ovulación prematura de un folículo dominante inducida con GnRH redujo el diámetro del folículo en el momento de la ovulación, disminuyendo la función lútea y por ende la fertilidad posterior (Mussard *et al.*, 2007; Dadarwal *et al.*, 2013). Por el contrario, la ovulación de folículos de mayor tamaño mejora la fertilidad, un efecto que se asoció con elevadas concentraciones de estradiol circulante cerca del momento de la inseminación (Perry *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2018). En este Experimento, la tasa de preñez mejoró a medida que aumentaba el tamaño folicular; el diámetro folicular observado con mayor frecuencia fue de 12 mm para el proestro de 48 h, de 13 mm para el de 60 h y de 14 mm para el de 72 h. Por otro lado, en este Experimento todas las vaquillonas recibieron una dosis de eCG al inicio del proestro, o sea, al retirar el dispositivo intravaginal con progesterona. La administración de gonadotrofinas con efectos similares al de las hormonas FSH / LH inducen la maduración folicular final resultando en una mayor secreción de estradiol (revisado por Allrich, 1994), similares

resultados hemos obtenido en el Experimento anterior respaldando que el tratamiento con eCG en vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch mejoran la tasa de preñez en una IATF (Núñez-Olivera *et al.*, 2020). Por lo tanto, sugerimos que las estrategias que promuevan el crecimiento folicular persistan en los protocolos para IATF. En general, estos hallazgos apoyan la consideración de nuevas estrategias para promover el crecimiento y la maduración folicular preovulatorios.

En este Experimento, la presencia de folículos de mayor tamaño en el momento de la inseminación se asoció con una mayor expresión del estro. En las vaquillonas inducidas a tener un proestro de 72 h, el tamaño folicular fue mayor y la proporción de estro fue significativamente mayor que la del proestro de 48 h. Luego de la implementación de un protocolo para IATF para inducir la ovulación, las hembras que presentan celo tienen una mayor capacidad ovulatoria y una mayor tasa de preñez (Perry *et al.*, 2020). Además, se ha reportado que la aparición del estro en los programas de IATF se asocia positivamente con mejores tasas de ovulación y preñez (Sá Filho *et al.*, 2010, 2011; Richardson *et al.*, 2016; Bó *et al.*, 2018; Cedeño *et al.*, 2021). Trabajos realizados en programas de transferencia de embriones han confirmado que la expresión del estro antes de la ovulación tuvo un efecto positivo en la tasa de preñez después de la transferencia de embriones en vacas receptoras (Bó and Cedeño, 2018; Cedeño *et al.*, 2020). Además, la manifestación del comportamiento del estro hasta 3 días luego del retiro del dispositivo con progesterona aumentó la probabilidad de preñez en receptoras de embriones producidos in-vitro (Frade *et al.*, 2014). En vaquillonas Holstein, se obtuvo una probabilidad máxima de preñez predicha cuando la duración del proestro fue de 3 días, con una relación cuadrática entre la duración del proestro y la probabilidad de preñez (Colazo and Ambrose, 2011). El beneficio obtenido en este Experimento con vaquillonas durante el proestro más largo, probablemente se deba a que las vaquillonas que exhibieron estro estuvieron expuestas a concentraciones circulantes de estradiol endógeno más elevadas en este período que aquellas que fueron inducidas a ovular con GnRH antes de exhibir el estro.

Aquellas vacas que exhiben estro producen conceptos más largos el día 19 de gestación, tienen una mejor probabilidad de supervivencia y un mejor establecimiento de la gestación (Davoodi *et al.*, 2016). El mantenimiento de la gestación también parece mejorar con la expresión del estro antes de la ovulación, ya que se observaron menores pérdidas embrionarias / fetales tempranas después de los 30 días de gestación y una mayor tasa de partos en aquellas receptoras que exhibieron estro antes de la ovulación (Cedeño *et al.*, 2020). Existe una relación positiva entre el diámetro del folículo, la expresión del estro y las concentraciones de estradiol sérico preovulatorio (Perry *et al.*, 2014, 2020). La producción de estradiol durante el proestro tiene un efecto positivo en la fase lútea posterior, el ambiente uterino y el desarrollo embrionario (Mann y Lamming, 2000; Santos *et al.*, 2004). Las concentraciones de estradiol preovulatorias parecen ser críticas

en la programación del ambiente uterino para que reciba el embrión antes del reconocimiento materno de la gestación (Binelli *et al.*, 2017; Perry *et al.*, 2020). Por lo tanto, la menor tasa de preñez observada en vaquillonas inducidas a ovular demasiado pronto (*i.e.*: GnRH administrada a las 48 h) sin expresión del estro, sugiere que necesitan tiempo adicional para la maduración folicular final. Por otro lado, en las vaquillonas que ya habían ovulado al momento de la administración de GnRH a las 72 h, el 68,4% (13/19) de ellas estaban preñadas a los 30 días luego de la IATF. Esto sugiere que no hay necesidad de preocuparse por las vaquillonas ovuladas en este momento. Además, la relación positiva entre la tasa de preñez y el diámetro folicular preovulatorio fue significativa con el proestro más corto (Figura 3.5.2, panel derecho), que se superó, al menos en parte, cuando la longitud del proestro se extendió a las 72 h. Estos hallazgos respaldan aún más la conveniencia de prolongar la ventana entre el retiro del dispositivo con progesterona y la administración de GnRH.

La expresión del estro en este Experimento, determinada por la eliminación de la pintura de la base de la cola, fue un factor importante asociado con una mayor respuesta ovárica, y este evento es indicativo de una respuesta de sincronización exitosa. El uso de la pintura en la base de la cola fue útil para identificar aquellas vaquillonas con una mayor expresión del estro, por lo que adicionalmente permite que las vaquillonas sin expresión del estro puedan ser el objetivo para el uso de tratamientos diferenciales adicionales para mejorar la fertilidad. Aunque el protocolo de sincronización utilizado es un método efectivo y bien establecido para inducir la ovulación sincronizada entre vaquillonas (Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2018), en nuestro trabajo encontramos gran variabilidad en el tamaño de los folículos al final del tratamiento. Probablemente, esto ocurre debido al intervalo de tiempo (3 a 6 días) que tarda en producirse una nueva onda folicular (Adams *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2001). En consecuencia, en el momento de la inseminación en un tratamiento con progesterona y estradiol, la vida útil del folículo preovulatorio se extiende de 4 a 7 días (*i.e.*: desde la aparición de la onda hasta la inseminación), esto podría explicar la amplia gama de tamaños de folículos encontrados al momento de la IATF. El aumento en el tamaño del folículo ovulatorio podría ser potencialmente positivo para la fertilidad debido al estradiol circulante elevado cerca del momento de la inseminación, como lo demuestra una mayor expresión del estro de los días -2 a 0 en un programa de IATF, y una concentración elevada de progesterona sérica circulante después de la IATF (Perry *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2018). Aunque los programas para IATF no requieren de la detección del estro, el crecimiento y la calidad de los embriones recuperados el día 6 de gestación, y un aumento en la tasa de preñez fue reportado cuando se detectó el estro (*i.e.*: con altas concentraciones circulantes de estradiol) antes de la inseminación en programas de IATF (Larimore *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2018).

Las evidencias demuestran que aumentar el intervalo desde el retiro del dispositivo con progesterona hasta la ovulación parece beneficiar la fertilidad, por tal motivo, se han propuesto e implementado con éxito nuevas estrategias para prolongar la duración del proestro. Los protocolos para extender la longitud del proestro se clasifican en protocolos con GnRH y progesterona (Bridges *et al.*, 2008) o con estradiol y progesterona (de la Mata *et al.*, 2018). En los protocolos con GnRH y progesterona, se ha reportado que la reducción del tiempo de exposición del dispositivo con progesterona de 7 a 5 días, y la prolongación del intervalo desde el retiro del dispositivo hasta la GnRH / IATF (*i.e.*: protocolo Co-Synch de 5 días) aumenta la exposición a concentraciones elevadas de estradiol circulante antes de la ovulación, mejorando la tasa de preñez en vacas y vaquillonas (Bridges *et al.*, 2008, 2010; Small *et al.*, 2009; Kasimanickam *et al.*, 2012). En los protocolos con estradiol y progesterona (*i.e.*: protocolo J-Synch de 6 días), también se mejoró la tasa de preñez en vaquillonas al reducir la exposición a la progesterona de 7 u 8 a 6 días y prolongar el proestro de 48 h (con cipionato de estradiol administrado al retiro del dispositivo) a 72 h (con GnRH administrada en el momento de la IATF; de la Mata *et al.*, 2018). En este estudio anterior, aunque el protocolo J-Synch indujo una mayor tasa de preñez que el protocolo convencional, fue difícil determinar si la razón real de tal mejoría se debió a la extensión del período de proestro o al reemplazo del cipionato de estradiol por la GnRH para inducir la ovulación. En el Experimento actual, todas las vaquillonas recibieron GnRH y el tratamiento a las 72 h posteriores al retiro del dispositivo mejoró la tasa de preñez, por lo que concluimos que la mayor longitud del proestro mejoró la tasa de preñez.

La inseminación artificial a tiempo fijo es una técnica de reproducción asistida y como herramienta tecnológica se está convirtiendo en una práctica común en la producción de ganado de carne, y el número de terneros producidos por IATF en establecimientos comerciales está aumentando constantemente (Bó *et al.*, 2019; Baruselli *et al.*, 2020; Menchaca *et al.*, 2021). En cuanto a los resultados obtenidos con esta tecnología y su creciente adopción, no solo se relaciona con la tasa de preñez aceptable, sino que también porque es una tecnología amigable para el usuario. Para encontrar formas más eficientes de producir carne, los profesionales, asesores y productores deben centrarse en la innovación e incorporación de nuevas tecnologías, debido a que es necesario garantizar un suministro de alimentos que pueda satisfacer las necesidades nutricionales de una población en crecimiento (FAO, 2018).

CONCLUSIONES

La administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el momento de la colocación de un dispositivo intravaginal indujo concentraciones de progesterona circulante menores durante todo el período de tratamiento comparada con la administración de una dosis única al momento del retiro del dispositivo. En consecuencia, hubo un folículo ovulatorio de mayor tamaño y un intervalo más corto hasta la ovulación en vaquillonas tratadas con las dos medias dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Sin embargo, la tasa de preñez no fue diferente entre estos tratamientos, por lo que permitió administrar una única dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al retiro del dispositivo sin efectos perjudiciales para la tasa de preñez.

La administración de eCG al retiro del dispositivo y la extensión del proestro retrasando la administración de GnRH demostró la conveniencia de un tratamiento corto con progesterona y estradiol (protocolo J-Synch) para vaquillonas de carne. Esta estrategia mejoró la tasa de preñez luego de la IATF, indujo mayores concentraciones de progesterona luego de la ovulación con una mayor proporción de vaquillonas con un CL competente. Además, el tratamiento con eCG se relacionó con el mayor contenido proteico de PR en el epitelio luminal cuando se administró GnRH a las 72 h. Estos resultados amplían la idea de que extender la longitud del proestro aumenta la exposición uterina al estradiol endógeno producido por el folículo ovulatorio que, en consecuencia, pudo afectar la funcionalidad uterina.

La extensión en la longitud del proestro de 48 a 72 h en un tratamiento con progesterona y estradiol de 6 días (protocolo J-Synch), aumentó el tamaño folicular preovulatorio en el momento de la IATF, aumentó la expresión del estro y mejoró la tasa de preñez en vaquillonas con CL. La IATF puede realizarse en un amplio período (60 a 72 h luego del retiro del dispositivo y administración de eCG), con implicancias prácticas para la aplicación de esta tecnología en programas a gran escala. Estos resultados apoyan la recomendación de aplicar protocolos con proestro prolongado en los programas para IATF en vaquillonas de carne *Bos taurus*.

Implicancias prácticas

Los resultados de esta tesis muestran claramente los beneficios de utilizar una dosis de eCG al retirar el dispositivo con progesterona y de extender el período de proestro a 72 h luego de retirado el dispositivo en vaquillonas de carne. Este tratamiento ha comenzado a implementarse en condiciones comerciales donde se aplican programas de IATF. Es probable que el uso de esta estrategia se transforme en un componente esencial en la aplicación de esta tecnología a gran escala en vaquillonas. La información aportada es muy novedosa en cuanto al mecanismo que explica la mayor tasa de preñez obtenida con esta estrategia.

El incremento en la eficiencia de las técnicas de sincronización estral e inseminación artificial, de manera indirecta, se verá reflejado en la reducción de las pérdidas embrionarias y / o fetales tempranas. Las estrategias planteadas apuntan a mejorar los índices reproductivos en rodeos de carne, logrando en este caso que las vaquillonas queden preñadas más temprano lo que favorece su performance reproductiva durante toda la vida de la hembra. De esta manera, a largo plazo se está mejorando también la tasa de preñez de las vacas adultas que es donde luego se visualizan las mayores ineficiencias. A menudo, se subestima el impacto de trabajar sobre las vaquillonas, pero el momento en la que ésta queda preñada determina el comportamiento futuro de la hembra. Por este motivo, es importante trabajar en herramientas que incrementen la eficiencia reproductiva en esta categoría.

Por otro lado, la producción mundial de alimentos debe incrementarse considerando el crecimiento de la población, la demanda de los mercados y la evolución de los hábitos alimenticios. La tendencia mundial, debido al aumento del poder adquisitivo en los países emergentes, es hacia un mayor consumo de productos de origen animal y de alto valor biológico, como lo son las carnes, huevos y productos lácteos (FAO, 2018). Para encontrar formas más eficientes de producir carne, los productores y profesionales asesores, deben centrarse en la innovación y la incorporación de tecnologías que permitan maximizar el éxito de los programas reproductivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu, F.M., Coutinho da Silva, M.A., Cruppe, L.H., Mussard, M.L., Bridges, G.A., Harstine, B.R., Smith, G.W., Geary, T.W., Day, M.L., 2018. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. *Anim. Reprod. Sci.* 196, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.020>
2. Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
3. Allrich, R.D., 1994. Endocrine and Neural Control of Estrus in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2738–2744. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77216-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77216-7)
4. Anualpec, 2021. Estadísticas agropecuarias. Publicado en internet, disponible en <http://www.anualpec.com.br>. Activo Noviembre 2021.
5. Baruselli, P.S., Reis, E.L., Marques, M.O., Nasser, L.F., Bó, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 479–86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>
6. Batista, E.O.S., Sala, R. V., Ortolan, M.D.D.V., Jesus, E.F., Del Valle, T.A., Rennó, F.P., Macabelli, C.H., Chiaratti, M.R., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2020. Hepatic mRNA expression of enzymes associated with progesterone metabolism and its impact on ovarian and endocrine responses in Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) heifers with differing feed intakes. *Theriogenology* 143, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.033>
7. Bergfeld, E.G.M., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Mariscal, V., Sanchez, T., Kinder, J.E., 1996. Changing Dose of Progesterone Results in Sudden Changes in Frequency of Luteinizing Hormone Pulses and Secretion of 17 β -Estradiol in Bovine Females¹. *Biol. Reprod.* 54, 546–553. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.546>
8. Binelli, M.; Thatcher, W.; Mattos, R., Baruselli, P., 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56, 1451–1463.
9. Binelli, M., Machado, R., Bergamaschi, M.A., Bertan, C.M., 2009. Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. *Anim. Reprod.* 6, 125–134.
10. 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., 2017. Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horiz.* 41, 121–129.
<https://doi.org/XX6B5WFT80K8P9A2> [pii]\n10.1098/rstb.2005.1620
11. Binelli, M., Pugliesi, G., Hoeck, V. V., Sponchiado, M., Ramos, R.S., Oliveira, M.L., França, M.R., D’Alexandri, F.L., Mesquita, F.S., Membrive, C.M.B., 2014. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim. Reprod.* 11, 246–253.
 12. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Mapletoft, R.J., 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer program in cattle. *Theriogenology* 57, 53–72.
 13. Bó, G.A., Cedeño, A., 2018. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. *Anim. Reprod.* 15, 224–230. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0060>
 14. 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. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64, 223–236.
 15. Bó, G.A., de la Mata, J.J., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86, 388–396.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.053>
 16. Bó, G.A., Huguenine, E., De La Mata, J.J., Núñez-Olivera, R., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2018. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>
 17. Bó, G.A., Mapletoft, R.J., 2019. Control of ovarian function for in vivo and in vitro embryo production. *Clin. Theriogenology* 11, 337–346.
 18. Bó, G.A., Rogan, D.R., Mapletoft, R.J., 2018. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology* 112, 26–33.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>
 19. Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R., Grunert, E., 1996. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 11–21. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01492-3](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01492-3)

20. Bridges, G.A., Day, M.L., Geary, T.W., Cruppe, L.H., 2013. Triennial Reproduction Symposium: Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J. Anim. Sci.* 91, 3002–3013. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-5882>
21. Bridges, G.A., Helser, L.A., Grum, D.E., Mussard, M.L., Gasser, C.L., Day, M.L., 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69, 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.011>
22. Bridges, G.A., Mussard, M.L., Burke, C.R., Day, M.L., 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.002>
23. Bridges, G.A., Mussard, M.L., Helser, L.A., Day, M.L., 2014. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology* 81, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.11.020>
24. Bridges, P.J., Wright, D.J., Buford, W.I., Ahmad, N., McCormick, M.L., Schrick, F.N., Dailey, R.A., Lewis, P.E., Inskeep, E.K., 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *J. Anim. Sci.* 78, 2942–2949.
25. Campanile, G., Baruselli, P.S., Limone, A., D’Occhio, M.J., 2021. Local action of cytokines and immune cells in communication between the conceptus and uterus during the critical period of early embryo development, attachment and implantation – Implications for embryo survival in cattle: A review. *Theriogenology* 167, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.02.020>
26. Carriquiry, M., Weber, W.J., Fahrenkrug, S.C., Crooker, B.A., 2009. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation 1. *J. Dairy Sci.* 92, 4889–4900. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1676>
27. Carvalho, J.B.P., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* \times *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.035>
28. Carvalho, J.P.B., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Soares, J.G., Baruselli, P.S., 2017. Efeito da prostaglandina F2 α no início do protocolo de sincronização da ovulação em novilhas leiteiras *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bos indicus* \times *Bos taurus*. *Bol. Ind. Anim. Nov. Odessa* 74, 122–134.

29. Cedeño, A., Tríbulo, A., Tríbulo, R.J., Andrada, S., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., 2020. Effect of estrus expression or treatment with GnRH on pregnancies per embryo transfer and pregnancy losses in beef recipients synchronized with estradiol/progesterone-based protocols. *Theriogenology* 157, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.023>
30. Cedeño, A. V., Cuervo, R., Tríbulo, A., Tríbulo, R., Andrada, S., Mapletoft, R., Menchaca, A., Bó, G.A., 2021. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. *Theriogenology* 161, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.014>
31. Chen, Y., Green, J.A., Antoniou, E., Ealy, A.D., Mathialagan, N., Walker, A.M., Avasle, M.P., Rosenfeld, C.S., Hearne, L.B., Roberts, R.M., 2006. Effect of interferon- τ administration on endometrium of nonpregnant ewes: A comparison with pregnant ewes. *Endocrinology* 147, 2127–2137. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1310>
32. Colazo, M.G., Ambrose, D.J., 2011. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology* 76, 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.013>
33. Committee on bovine reproductive nomenclature., 1972. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.*, pp. 216–237.
34. Crowe, M., 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 5, 20–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01210.x>
35. Cushman, R.A., Kill, L.K., Funston, R.N., Mousel, E.M., Perry, G.A., 2013. Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions. *J. Anim. Sci.* 91, 4486–4491. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6465>
36. Cutaia, L., Tríbulo, R., Moreno, D., Bó, G.A., 2003. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 59, 216.
37. Dadarwal, D., Mapletoft, R.J., Adams, G.P., Pfeifer, L.F.M., Creelman, C., Singh, J., 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.003>
38. Davoodi, S., Cooke, R.F., Fernandes, A.C.C., Cappellozza, B.I., Vasconcelos, J.L.M., Cerri, R.L.A., 2016. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology* 85, 645–655.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.002>

39. Day, M.L., 2015. State of the art of GnRH - based timed AI in beef cattle. *Anim. Reprod.* 12, 473–478.
40. de Castro, T., Valdez, L., Rodriguez, M., Benquet, N., Rubianes, E., 2004. Decline in Assayable Progesterone in Bovine Serum under Different Storage Conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 36, 381–384.
41. de La Mata, J.J., Núñez-Olivera, R., Cuadro, F., Bosolasco, D., De Brun, V., Meikle, A., Bó, G.A., Menchaca, A., 2018. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 1541–1552.
<https://doi.org/10.1071/RD17473>
42. DIEA, 2021. Anuario estadístico Agropecuario. Estadísticas agropecuarias. Publicado en internet. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presento-anuario-estadistico-agropecuario-2021>. Activo Noviembre 2021.
43. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
44. Diskin, M.G., Morris, D.G., 2008. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 260–267.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>
45. Diskin, M.G., Murphy, J.J., Sreenan, J.M., 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 297–311.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.008>
46. Diskin, M.G., Parr, M.H., Morris, D.G., 2012. Embryo death in cattle: An update. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 244–251. <https://doi.org/10.1071/RD11914>
47. FAO. 2018. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. Rome. 224 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
48. Fátima, L.A., Baruselli, P.S., Gimenes, L.U., Binelli, M., Rennó, F.P., Murphy, B.D., Papa, P.C., 2013. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 998–1011. <https://doi.org/10.1071/RD12155>
49. Frade, M.C., Frade, C., Cordeiro, M.B., Sá Filho, M.F., Mesquita, F.S., Nogueira, G.P., Binelli, M., Membrive, C.M.B., 2014. Manifestation of estrous behavior and subsequent progesterone concentration at timed-embryo transfer in

- cattle are positively associated with pregnancy success of recipients. *Anim. Reprod. Sci.* 151, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.005>
50. Ginther, O.J., Bashir, S.T., Mir, R.A., Santos, V.G., Beg, M.A., 2013a. Interrelationships among progesterone, LH, and luteal blood flow during a pulse of a PGF 2α metabolite and functional role of LH in the progesterone rebound in heifers. *Theriogenology* 79, 1110–1119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.003>
51. Ginther, O.J., Beg, M.A., 2012. Dynamics of Circulating Progesterone Concentrations Before and During Luteolysis: A Comparison Between Cattle and Horses. *Biol. Reprod.* 86, 1–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099820>
52. Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A., Kot, K., 2001. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. *Reproduction* 122, 103–110. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220103>
53. Ginther, O.J., Pinaffi, F.L.V., Khan, F.A., Duarte, L.F., Beg, M.A., 2013b. Follicular-phase concentrations of progesterone, estradiol-17 β , LH, FSH, and a PGF 2α metabolite and daily clustering of prolactin pulses, based on hourly blood sampling and hourly detection of ovulation in heifers. *Theriogenology* 79, 918–928. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.015>
54. Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56, 1417–1433.
55. Ing, N.H., Belen Tornesi, M., 1997. Estradiol Up-Regulates Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression in Specific Ovine Uterine Cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205–1215. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.5.1205>
56. Inskip, E.K., 2004. Preovulatory , postovulatory , and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82, 24–39.
57. Inskip, E.K., Dailey, R.A., 2005. Embryonic death in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 21, 437–61. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.02.002>
58. Ireland, J.J., Roche, J.F., 1982. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *J. Reprod. Fert.* 64, 295–302.
59. Jinks, E.M., Smith, M.F., Atkins, J.A., Pohler, K.G., Perry, G.A., MacNeil, M.D., Roberts, A.J., Waterman, R.C., Alexander, L.J., Geary, T.W., 2012. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in

suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91, 1176–1185.
<https://doi.org/10.2527/jas2012-5611>

60. Kasimanickam, R., Asay, M., Firth, P., Whittier, W.D., Hall, J.B., 2012. Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef heifers synchronized with five-day CO-Synch + controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology* 77, 1624–1631. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.007>
61. Kerbler, T.L., Buhr, M.M., Jordan, L.T., Leslie, K.E., Walton, J.S., 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47, 703–714.
62. Kimmins, S., Maclaren, L.A., 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22, 742–748. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0708>
63. Lamb, G.C., Stevenson, J.S., Kesler, D.J., Garverick, H.A., Brown, D.R., Salfen, B.E., 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F₂alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide We. *J. Anim. Sci.* 79, 2253–2259.
64. Larimore, E.L., Amundson, O.L., Bird, S.L., Funnell, B.J., Kruse, S.G., Bridges, G.A., Perry, G.A., 2015. Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 93, 2806–2812. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8892>
65. Lequarre, A.S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbiès-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P., 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63, 841–859. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>
66. Lonergan, P., 2015. New insights into the function of progesterone in early pregnancy. *Anim. Front.* 5, 12–17. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0003>
67. Lonergan, P., 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 76, 1594–1601. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012>
68. Lonergan, P., Forde, N., Spencer, T., 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 66–74. <https://doi.org/10.1071/RD15326>
69. Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E., 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the

- cow. *Vet. J.* 171, 500–3. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.12.005>
70. Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–80.
71. Mann, G.E., Lamming, G.E., 2000. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 64, 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00205-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00205-0)
72. Mann, G.E., Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 34, 269–274.
73. Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S., Menchaca, A., Sartori, R., 2018. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0007>
74. Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Bó, G.A., Caccia, M., Mapletoft, R.J., 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 86, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.06.005>
75. Meikle, A., Sahlin, L., Ferraris, A., Masironi, B., Blanc, J.E., Rodríguez-Iraozqui, M., Rodríguez-Piñón, M., Kindahl, H., Forsberg, M., 2001. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor alpha, progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 45–56.
76. Meikle, A., Forsberg, M., Sahlin, L., Masironi, B., Tasende, C., Rodríguez-Pinon, M., Garofalo, E.G., 2000. A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reprod Nutr Dev* 40, 283–293.
77. Meikle, A., Tasende, C., Rodríguez, M., Garófalo, E.G., 1997. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 48, 1105–1113. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00343-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00343-9)
78. Menchaca, A., Núñez-Olivera, R., Wijma, R., García-Pintos, C., Fabini, F., de Castro, T., 2013. Como mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas *Bos taurus*. 10^o Simp. Int. Reprod. Anim. - Córdoba, Argentina 103–133.
79. Mesquita, F.S., Pugliesi, G., Scolari, S.C., França, M.R., Ramos, R.S., Oliveira, M., Papa, P.C., Bressan, F.F., Meirelles, F. V., Silva, L.A., Nogueira, G.P.,

- Membrive, C.M.B., Binelli, M., 2014. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology* 81, 861–869.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.022>
80. Moreno, D., Cutaia, L., Villata, L., Ortisi, F., Bó, G.A. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol and progesterone. *Theriogenology* 55: 408.(abstract).
81. Mussard, M.L., Burke, C.R., Behlke, E.J., Gasser, C.L., Day, M.L., 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 937–943. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-592>
82. Núñez-Olivera, R., Bó, G.A., Menchaca, A., 2016. Association between proestrus length, preovulatory follicular diameter, estrus behavior and pregnancy rate in progesterone-estradiol based treatment J-Synch for FTAI in *Bos taurus* beef heifers. Proc. 18th Int. Congr. Anim. Reprod. (ICAR). Tours, Fr. Elsevier. pp. 477. (Abstract). 477.
83. Núñez-Olivera, R., Cuadro, F., Bosolasco, D., de Brun, V., de la Mata, J., Brochado, C., Meikle, A., Bó, G.A., Menchaca, A., 2020. Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time. *Theriogenology* 151, 16–27.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.031>
84. Núñez-Olivera, R., de Castro, T., Bó, G.A., Piaggio, J., Menchaca, A., 2018. Equine chorionic gonadotropin administration after insemination affects luteal function and pregnancy establishment in postpartum anestrous beef cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 62, 24–31.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.08.003>
85. Núñez-Olivera, R., de Castro, T., García-Pintos, C., Bó, G., Piaggio, J., Menchaca, A., 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 111–116.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>
86. Okuda, K., Miyamoto, Y., Skarzynski, D.J., 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 255–64.
87. Peippo, J., Machaty, Z., Peter, A., 2011. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology* 76, 1373–9.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.018>

88. Perry, G.A., Smith, M.F., Roberts, A.J., MacNeil, M.D., Geary, T.W., 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 684–9. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-519>
89. Perry, G.A., Cushman, R.A., Perry, B.L., Schiefelbein, A.K., Northrop, E.J., Rich, J.J.J., Perkins, S.D., 2020. Role of preovulatory concentrations of estradiol on timing of conception and regulation of the uterine environment in beef cattle. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 66, 12–25. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1695979>
90. Perry, G.A., Perry, B.L., 2008. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2007.09.003>
91. Perry, G.A., Smith, M.F., Lucy, M.C., Green, J.A., Parks, T.E., MacNeil, M.D., Roberts, A.J., Geary, T.W., 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5268–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501700102>
92. Perry, G.A., Swanson, O.L., Larimore, E.L., Perry, B.L., Djira, G.D., Cushman, R.A., 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.02.001>
93. Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 16–21.
94. Reese, S.T., Franco, G.A., Poole, R.K., Hood, R., Fernandez Montero, L., Oliveira Filho, R. V., Cooke, R.F., Pohler, K.G., 2020. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 212, 106251. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106251>
95. Richardson, B.N., Hill, S.L., Stevenson, J.S., Djira, G.D., Perry, G.A., 2016. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci.* 166, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.013>
96. Rigoglio, N.N., Fátima, L.A., Hanassaka, J.Y., Pinto, G.L., Machado, A.S.D., Gimenes, L.U., Baruselli, P.S., Rennó, F.P., Moura, C.E.B., Watanabe, I.-S., Papa, P.C., 2013. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 79, 673–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.023>
97. Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E., Wathes, D.C., 2001. Expression of

- oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122, 965–979. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220965>
98. Rodrigues, A.D., Cooke, R.F., Cipriano, R.S., Silva, L.G.T., Cerri, R.L.A., Cruppe, L.H., Meneghetti, M., Pohler, K.G., Vasconcelos, J.L.M., 2018. Impacts of estrus expression and intensity during a timed-ai protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in bos indicus-influenced beef cows. *J. Anim. Sci.* 96, 236–249. <https://doi.org/10.1093/jas/skx043>
99. Rutledge, R.G., Côté, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31, 93e – 93. <https://doi.org/10.1093/nar/gng093>
100. Sá Filho, M.F., Crespilho, A.M., Santos, J.E.P., Perry, G.A., Baruselli, P.S., 2010. 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.* 120, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.007>
101. Sá Filho, M.F., Nasser, L.F.T., Pentead, L., Prestes, R., Marques, M.O., Freitas, B.G., Monteiro, B.M., Ferreira, R.M., Gimenes, L.U., Baruselli, P.S., 2015. Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of Bos indicus beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 160, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.024>
102. Sá Filho, M.F., Santos, J.E.P., Ferreira, R.M., Sales, J.N.S., Baruselli, P.S., 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 76, 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.022>
103. Sá Filho, M.F., Gonella-Diaza, A.M., Sponchiado, M., Mendanha, M.F., Pugliesi, G., Ramos, R. dos S., Andrade, S.C. da S., Gasparin, G., Coutinho, L.L., Goissis, M.D., Mesquita, F.S., Baruselli, P.S., Binelli, M., 2017. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0211-3>
104. Sales, J.N.S., Carvalho, J.B.P., Crepaldi, G.A., Soares, J.G., Giroto, R.W., Maio, J.R.G., Souza, J.C., Baruselli, P.S., 2015. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in Bos indicus (Nelore) beef cows. *Theriogenology* 83, 1093–1100.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.009>

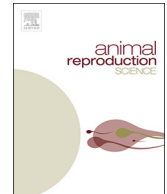
105. Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvão, K.N., 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 513–35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.015>
106. Sartori, R., Bastos, M.R., Wiltbank, M.C., 2010. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 151–8. <https://doi.org/10.1071/RD09221>
107. Sartori, R., Fricke, P.M., Ferreira, J.C.P., Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 65, 1403–1409. <https://doi.org/10.1021/jf8036775>
108. Sartori, R., Gimenes, L.U., Monteiro, P.L.J., Melo, L.F., Baruselli, P.S., Bastos, M.R., 2016a. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology* 86, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>
109. Sartori, R., Haughian, J.M., Shaver, R.D., Rosa, G.J.M., Wiltbank, M.C., 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87, 905–20. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73235-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73235-X)
110. Sartori, R., Monteiro, P.L.J., Wiltbank, M.C., 2016b. Endocrine and metabolic differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive management. *Anim. Reprod.* 13, 168–181. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR868>
111. Sartori, R., Rosa, G.J.M., Wiltbank, M.C., 2002. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85, 2813–22. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74368-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74368-3)
112. Savio, J.D., Thatcher, W.W., Morris, G.R., Entwistle, K., Drost, M., Mattiacci, M.R., 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *Reproduction* 98, 77–84. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980077>
113. Senasa, 2021. Estadísticas agropecuarias. Publicado en internet, disponible en <https://www.argentina.gob.ar/senasa/estadisticas>. Activo Octubre 2021.
114. Sirois, J., Fortune, J.E., 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with

low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127, 916–925. <https://doi.org/10.1210/endo-127-2-916>

115. Small, J.A., Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J., 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71, 698–706. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.045>
116. Sosa, C., Abecia, J.A., Carriquiry, M., Vázquez, M.I., Fernández-Foren, A., Talmon, M., Forcada, F., Meikle, A., 2009. Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 869–881. <https://doi.org/10.1071/RD09051>
117. Spencer, T.E., Forde, N., Lonergan, P., 2017. Insights into conceptus elongation and establishment of pregnancy in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 84–100. <https://doi.org/10.1071/RD16359>
118. Sponchiado, M., Gomes, N.S., Fontes, P.K., Martins, T., Del Collado, M., Pastore, A.D.A., Pugliesi, G., Nogueira, M.F.G., Binelli, M., 2017. Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. *PLoS One* 12, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175954>
119. Stock, A.E., Fortune, J.E., 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory parameters. *Endocrinology* 132, 1108–1114.
120. Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R., Pru, J.K., 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56, 1435–1450.
121. Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, A.A., Badinga, L., Pershing, R., Bartolome, J., Santos, J.E., 2003. Regulation of embryo survival in cattle. *Reprod. Suppl.* 61, 253–266.
122. Utt, M.D., Jousan, F.D., Beal, W.E., Utt, M.D., Jousan, F.D., Beal, W.E., 2003. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. The online version of this article, along with updated information and services, is located on t 1562–1567.
123. 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, 307–14.

124. Vasconcelos, J.L.M., Pereira, M.H.C., Meneghetti, M., Dias, C.C., Filho, O.G.S., Peres, R.F.G., 2013. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 10, 206–214.
125. Vizcarra, J.A., Wettemann, R.P., 1996. Reproducibility, Repeatability, and Degree of Expertise Required to Assess Body Condition Score in Beef Cattle. *Prof. Anim. Sci.* 12, 28–31. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)32478-5](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)32478-5)
126. Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C.O., 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 127–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>
127. Wiltbank, M.C., Baez, G.M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M.Z., Monteiro, P.L.J., Melo, L.F., Ochoa, J.C., Santos, J.E.P., Sartori, R., 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86, 239–253. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.037>
128. Wiltbank, M.C., Baez, G.M., Vasconcelos, J.L.M., Pereira, M., Souza, A.H., Sartori, R., Pursley, J.R., 2014. The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 11, 225–236.
129. Wiltbank, M.C., Salih, S.M., Atli, M.O., Luo, W., Bormann, C.L., Ottobre, J.S., Vezina, C.M., 2012a. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim. Reprod.* 9, 242–259.
130. Wiltbank, M.C., Souza, A.H., Giordano, J.O., Nascimento, A.B., Vasconcelos, J.M., Surjus, R.S., Carvalho, P.D., Bender, R.W., Sartori, R., 2012b. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim. Reprod.* 9, 231–241.

ANEXO I



Is prostaglandin F2 α administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based treatment for FTAI an effective strategy in *Bos taurus* heifers?

Richard Núñez-Olivera^{a,b}, Federico Cuadro^{a,b}, Alejo Menchaca^{a,b,*}

^a Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay

^b Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Follicle
Ovulation
TAI
Estradiol-17 β
Luteolysis

ABSTRACT

The objective was to evaluate effects of prostaglandin (PG) F2 α administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based treatment period on ovarian response and pregnancy rate (P/AI) in *Bos taurus* beef heifers. Heifers were treated with 500 μ g of cloprostenol administered: a) in two half-doses (250 μ g) at the time of progesterone device insertion and removal (two-PG), or b) in a single dose at the time of device removal (one-PG). In the two-PG group, administration of PG at device insertion resulted in lesser serum progesterone concentrations during the 7-d treatment period ($P < 0.05$). Additionally, diameter of the follicle from which ovulation occurred was greater, and ovulation occurred earlier in the two-PG compared with one-PG group ($P < 0.05$). Fixed-time artificial insemination (FTAI) was performed in 3479 heifers with two times for FTAI (48 compared with 54 h from device removal). There was no effect on P/AI percentage for the PG treatment or the time of FTAI. The FTAI at 54 h resulted in a greater P/AI percentage in the one-PG than two-PG group (70.5%, 253/359 and 63.5%, 254/400, respectively; $P < 0.05$). There were no differences between PG treatments when FTAI was performed at 48 h after device removal. In conclusion, the administration of PG at the time of intravaginal progesterone device insertion results in lesser progesterone concentrations, and an increased size of the follicle from which ovulation occurs, and the time of ovulation is earlier after device removal. The pregnancy rate was not affected by the PG administration at the time of device insertion.

1. Introduction

The market for fixed-time artificial insemination (FTAI) programs is growing in the global cattle industry. Because this technology does not require estrous detection, is effective in estrous cycling and postpartum anestrous females, heifers and suckling cows, is easy to use for producers and practitioners, and is a low-cost and high impact technology, there is a greater use of FTAI by producers than what has traditionally occurred with use of estrous synchrony regimens. Progesterone and estradiol-based protocols are the preferred treatments for FTAI of beef cattle in South America (Bó et al., 2018). The expected pregnancy percentage per AI (P/AI) with use of these FTAI programs averages 50%, and new alternatives have been proposed to increase this outcome. One of the factors affecting fertility appears to be associated with size of the follicle from which ovulation occurs (Perry et al., 2007), probably associated with an increase in the ovulation rate (Sales et al., 2015), ovulation of a more functional oocyte (Dickinson et al., 2016), greater preovulatory

* Corresponding author at: Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay.
E-mail address: menchaca.alejo@gmail.com (A. Menchaca).

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106201>

Received 2 June 2019; Received in revised form 15 August 2019; Accepted 3 October 2019

Available online 08 October 2019

0378-4320/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

estradiol production (Jinks et al., 2012), and greater postovulatory luteal size and progesterone production (Wiltbank et al., 2012a). Different strategies have been utilized to increase pregnancy rate by inducing an increase in diameter of the follicle from which ovulation occurs, enhancing ovulation rate and improving luteal function after ovulation (Núñez-Olivera et al., 2014; Perry et al., 2014). Different strategies to stimulate preovulatory follicular development, therefore, should be undertaken when attempting to improve the effectiveness of FTAI protocols in enhancing pregnancy percentages.

With FTAI protocols, the super-physiological progesterone concentrations at intravaginal device insertion associated with intramuscular (i.m.) estradiol administration is required to ensure follicular regression and emergence of a new wave of follicular development (Adams et al., 2008; Bó et al., 2016). Super physiological progesterone concentrations for too many days after device insertion could suppress luteinizing hormone (LH) pulse frequency affecting dominant follicle development (Bergfeld et al., 1996; Ireland and Roche, 1982). In beef cattle, greater than optimal progesterone concentrations throughout treatment could negatively affect the ovulation rate, and therefore, pregnancy success may be negatively affected (Dadarwal et al., 2013; Martins et al., 2017). In *Bos indicus* beef heifers, lesser circulating progesterone concentrations have been achieved by inducing luteolysis with prostaglandin (PG) F2 α administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based synchronization treatment regimen. This approach resulted in a greater fertility than in heifers with relatively greater progesterone concentrations at the end of the treatment (Carvalho et al., 2008; Meneghetti et al., 2009; Peres et al., 2009). Similar findings have been reported in *Bos indicus* by *Bos taurus* crossbred heifers (Cutaia et al., 2007). Most practitioners have included this strategy in *Bos indicus* heifers. Due to the assumption that this approach to FTAI would have similar effects in *Bos taurus* heifers, this protocol was also incorporated for *Bos indicus* cattle (reviewed by Bó et al., 2016). Because differences in steroid sensitivity and metabolism have been proposed between *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers (Carvalho et al., 2008, 2017; Sartori et al., 2016a, 2016b), the convenience of using treatments to bring about lesser progesterone concentrations with PG administration at the time of progesterone device insertion in FTAI treatment regimens of *Bos taurus* beef heifers has not been assessed for efficacy and requires further investigation.

The main objective of the present study was to evaluate the effect of PGF2 α administered at the beginning of a treatment period with an intravaginal progesterone device and estradiol-based treatment on serum progesterone concentrations, preovulatory follicular growth and fertility in *Bos taurus* heifers. In addition, it was determined if pregnancy percentage was affected by timing of insemination when there was early PG administration using the progesterone-based protocol.

2. Materials and methods

2.1. Animals and management

Two experiments were conducted during the spring beef cattle breeding season in the Southern Hemisphere (October-January, 33°S, Uruguay) in Hereford-Angus crossbred heifers. All heifers were examined using ultrasonography to determine the presence or absence of a corpus luteum (CL; estrous cycling or anestrous heifers, respectively) at the beginning of the treatment period. In each experiment, heifers were all maintained in the same paddock, grazing rangeland pasture produced from crystalline-based soil and had unrestricted access to water and mineral supplement. All experimental procedures involving animals including injections, intravaginal device insertion, blood collection, and ovarian ultrasonographic examinations were approved by the Internal Animal Care Committee of Fundación IRAUy and were conducted in accordance with the guidelines of the National Council of Animal Care (CNEA) of Uruguay.

2.2. Experiment 1

The aim of this experiment was to evaluate the effect of PGF2 α administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based treatment period on serum progesterone concentrations, preovulatory follicle development, diameter of follicle from which ovulation occurred, timing of ovulation and serum estradiol-17 β concentrations. This study was conducted using 2-year-old Hereford heifers ($n = 25$) with a body weight of 299.2 ± 5.0 kg (mean \pm SEM) and body condition score (BCS) of 4.5 ± 0.1 (scale 1 to 8; 1 = emaciated and 8 = obese; (Vizcarra and Wettemann, 1996)). The females were selected 14 d before the experiment from a herd of 150 heifers based on the presence of a CL, and 25 heifers were pre-estrous synchronized using one dose of PGF2 α (500 μ g of cloprostenol sodium, Ciclase DL, Zoetis, Buenos Aires, Argentina) with the aim that all heifers be in the stage of the estrous cycle at 7 to 12 d after the time of ovulation (Day 0 of the experiment). On Day 0, the presence of CL was confirmed using ultrasonography and the heifers were treated with an intravaginal progesterone releasing device (0.5 g, DIB 0.5, Zoetis) that was in place for 7 d and 2 mg of estradiol benzoate (Gonadiol, Zoetis) was administered i.m. at the time of device insertion. The heifers were randomly allocated to one of two experimental groups to receive 500 μ g of cloprostenol sodium in two half-doses (250 μ g each) administered at the time of progesterone intravaginal device insertion and removal (two-PG group; $n = 13$), or in a single dose administered at device removal which was considered to be the control group (one-PG group, $n = 12$). All the heifers were treated i.m. with one dose of 0.5 mg estradiol cypionate (Cipiosyn, Zoetis) and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Novormon, Zoetis) at the time of device removal (Day 7).

2.3. Ultrasonic examinations

Ovarian examinations using ultrasonography were performed daily utilizing a B-Mode ultrasonic device with a linear-array transducer (7.5 MHz, WED-9618 V Well.D, Shenzhen, China). Examinations were conducted by the same operator every 24 h from

the day of device insertion until removal and every 12 h from device removal to the time ovulation was detected to have occurred or until 144 h later, whichever occurred first. All follicles greater than 3 mm in diameter were measured using an internal electronic caliper, video recorded and registered on an individual ovarian map for each heifer. Two images of the largest follicle were measured at its maximum diameters (width and height), and the average was considered for analyses. Ovulation was considered to have occurred when there was disappearance of the largest follicle between two consecutive ultrasonic examinations and confirmed 12 h later.

2.4. Hormonal determinations

Blood samples were collected daily from the beginning of the treatment until 96 h after progesterone device removal from the jugular vein into 10-mL tubes. All samples were centrifuged 1 h after collection at 1000g for 20 min, and serum was stored at -20°C until assayed in the *Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria*, Montevideo, Uruguay. Both serum progesterone and estradiol-17 β concentrations were determined using a radioimmunoassay (RIA) in direct solid phase and liquid phase, respectively, following the recommendations of each commercially available specific kit (DIAsource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium). Serum progesterone concentrations were determined from device insertion until 24 h after device removal, and serum estradiol-17 β concentrations were determined from device removal until the time of detection that ovulation had occurred. Circulating progesterone concentrations were determined in four assays; the sensitivity was 0.262 ng/mL, and the intra-assay coefficients of variation (CVs) for quality Control 1 (0.4 ng/mL) and quality Control 2 (3.0 ng/mL) were 10.2% and 7.4%, respectively. The inter-assay CVs for the same quality controls were 10.8% and 8.7%, respectively. Circulating concentrations of estradiol-17 β were determined after using the ether extraction method utilizing a double antibody RIA. This extraction protocol is routinely used in this laboratory and has been previously reported (Meikle et al., 1997). Samples were analyzed using a duplicate method in one assay, and the sensitivity was 3.5 pg/mL and the intra-assay CVs for quality Control 1 (88 pg/mL) and quality Control 2 (288 pg/mL) were 8.0% and 3.6%, respectively.

2.5. Experiment 2

The aim of this experiment was to evaluate the effect of PGF2 α administration at the beginning of progesterone and estradiol-based treatment on pregnancy rate in *Bos taurus* beef heifers. The study was conducted in 11 replicates on different farms located in Uruguay. A total of 3479, predominantly Hereford-Angus crossbred heifers, with a BCS of 4.5 ± 0.1 (scale 1–8) were used; 2690 of the heifers were 2-years of age (10 replicates), and 789 were 14-months of age (one replicate). In each replicate, the presence or absence of the CL was confirmed in each heifer using ultrasonography at the beginning of the treatment (Day 0). All herds enrolled in the study had similar management as that described in Experiment 1 in rangeland conditions with *ad libitum* access to water, salt and mineral mixture. The heifers were treated using the same progesterone- and estradiol-based treatment regimen described for Experiment 1. Prostaglandin F2 α (500 μg of cloprostenol sodium, Zoetis) was administered in two half doses (250 μg each) at the time of insertion and removal of progesterone intravaginal device (two-PG group) or in a single dose at the time of device removal (one-PG group). Estradiol cypionate and eCG were administered on Day 7 at the time of device removal as described for Experiment 1. Heifers were randomly assigned to be inseminated in the morning or in the afternoon of Day 9 (*i.e.*, at 48 or at 54 h after device removal) in a 2×2 factorial design. Thus, the heifers were treated with PGF2 α at the time of device insertion and removal with FTAI occurring at 48 ($n = 852$) or 54 ($n = 896$) h after device removal or there was treatment with a single dose of PGF2 α at the time of device removal with FTAI occurring at 48 ($n = 835$) or 54 ($n = 896$) h after device removal. Fixed-time AI was performed by two technicians using frozen semen of one or two bulls per replicate, which were assigned equally to each experimental group. Pregnancy diagnosis was determined using ultrasonography 30–35 d after insemination.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using InfoStat software (Di Rienzo et al., 2018). Data were assessed for normality and homogeneity of variance using histograms, q-q plots, and formal statistical tests as part of the univariate procedure. Follicular development, serum progesterone and estradiol-17 β concentrations were analyzed using generalized linear mixed models (GLMMs), including the treatments and time as fixed effects with the interactions, and the animal as a random effect. The type of variance-covariance structures was chosen depending on the magnitude of the Akaike information criterion (AIC) for models conducted when there was heterogeneous compound symmetry, unstructured, autoregressive, spatial power, and first-order ante-dependence. The model with the least AIC was selected. The ovulation rate (heifers ovulated/treated) was analyzed using the Fisher's exact test. In Experiment 2, the pregnancy rate was analyzed using GLMMs, including the effect of PGF2 α treatments (two treatments), the insemination times (48 h and 54 h), the presence/absence of CL (*i.e.*, estrous cycling/anestrus), and the interactions as fixed effects. While the replicate, animal identification, technician for insemination, bull and semen batch were included as random effects. Because the effect of the splitting of PG treatment may be evident only in estrous cycling heifers, data were analyzed with inclusion of all females and including only those females bearing a CL. The 2-year-old and 14-month-old heifers were analyzed separately. Data are presented as mean \pm SEM and the significance level was considered to be $P = 0.05$.

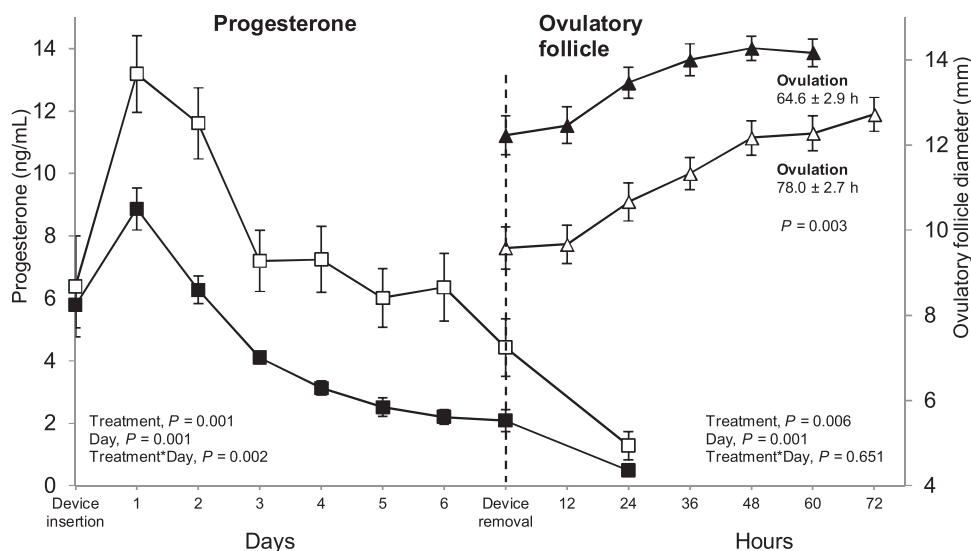


Fig. 1. Mean (\pm SEM) serum progesterone concentrations (left panel) and ovulatory follicle development (right panel) after prostaglandin (PG) F2 α administration in two half doses at device insertion and removal (filled squares/triangles) or in a single dose at device removal (open squares/triangles), with a progesterone and estradiol-based treatment regimen for FTAI being imposed in estrous cycling beef heifers (*Bos taurus*).

3. Results

3.1. Experiment 1

The treatment with PGF2 α at the time of insertion of the progesterone intravaginal device resulted in lesser serum progesterone concentrations throughout the 7-day intravaginal treatment period than the concentrations of the control group (4.2 ± 0.3 compared with 8.0 ± 1.0 ng/mL; $P < 0.01$; Fig. 1). The two-PG treatment group had a larger preovulatory follicular diameter at the time of progesterone device removal (12.2 ± 0.5 mm) compared with females that were treated with a single dose of PG at the time of device removal (9.6 ± 0.5 mm; $P < 0.01$; Fig. 1). In addition, the heifers that were treated the two-PG administrations had a larger follicular diameter at the time of the last ultrasonic assessment before ovulation was detected to have occurred (14.4 ± 0.4 mm compared with 12.8 ± 0.4 mm; $P < 0.05$; Table 1). There were no differences in the mean of estradiol-17 β concentrations from the time of device removal until the time ovulation was detected to have occurred between the experimental treatments ($P = 0.44$; Fig. 2). Heifers in the two-PG group had a lesser time interval from the time of device removal to the time of detection that ovulation had occurred than those heifers treated only at the time of device removal (Table 1). Ovulation rate did not differ for the two treatment groups, and the data for results are shown in Table 1, and distribution of ovulation is depicted in Fig. 2.

3.2. Experiment 2

Pregnancy rates of the 2-year-old and 14-month-old heifers are shown in Table 2. In 2-year-old heifers, overall pregnancy rate regardless estrous cycling or anestrus status, was similar for heifers of two-PG and one-PG treatment group (64.3%, 872/1,356; and 66.5%, 887/1,334, respectively; $P = 0.23$). In 14-month-old heifers, there was a statistical tendency between the two-PG and one-PG treatment group for pregnancy percentage (48.5%, 190/392; and 54.7%, 217/397, respectively; $P = 0.08$). The pregnancy rate was greater in the heifers that had a CL at the beginning of the treatment period than those heifers without a CL (67.1%, 989/1474 compared with 63.3%, 770/1216, respectively; $P < 0.05$), and there was no difference in 14-month-old heifers with and without a

Table 1

Effect of the administration of prostaglandin (PG) F2 α in two half doses at device insertion and removal (two-PG treatment) or in a single dose at progesterone intravaginal device removal (one-PG group) with a progesterone- and estradiol-based treatment regimen being imposed for FTAI in beef heifers (mean \pm SEM).

	Serum progesterone concentrations* (ng/mL)	Follicular diameter at device removal (mm)	Follicular diameter at ovulation (mm)	Follicular growth rate** (mm/d)	Ovulation rate (%)	Interval to ovulation** (h)
One-PG treatment	8.0 ± 1.0	9.6 ± 0.5	12.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2	83.3% (10/12)	78.0 ± 2.7
Two-PG treatment	4.2 ± 0.3	12.2 ± 0.5	14.4 ± 0.4	0.8 ± 0.1	100% (13/13)	64.6 ± 2.9
<i>P</i> -value	0.001	0.001	0.015	0.498	0.425	0.003

* Mean (\pm SEM) during 7-day intravaginal progesterone treatment.

** From device removal to ovulation.

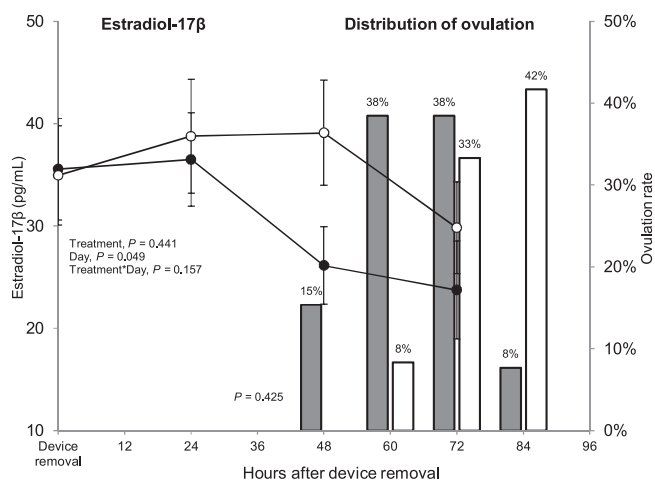


Fig. 2. Mean (\pm SEM) serum estradiol-17 β concentrations (left panel) and ovulation rate (ovulated heifers/treated heifers; right panel) after prostaglandin (PG) F2 α administration in two half doses at device insertion and removal (filled points/bars), or in a single dose at device removal (open points/bars), with a progesterone and estradiol-based treatment regimen for FTAI being imposed in estrous cycling beef heifers (*Bos taurus*).

CL at the time of device insertion (50.0%, 193/386 compared 53.1%, 214/403, respectively, $P = 0.38$). Regarding those heifers that had a CL present at the time of device insertion, pregnancy rate was not affected by the split PG treatment ($P = 0.33$). A tendency ($P = 0.07$) was found for the interaction between treatments and insemination times for 2-years-old estrous cycling heifers. Estrous cycling heifers that were FTAI at 54 h after device removal had a lesser P/AI percentage in the two-PG group than the one-PG group ($P < 0.05$; Table 2). For those heifers that did not have a CL at device insertion, there were no differences in pregnancy rate or insemination times between treatment groups ($P = 0.19$).

4. Discussion

The results of this study indicate that in estrous cycling *Bos taurus* beef heifers the ovarian responses during the progesterone and estradiol-based treatment are affected by PGF2 α administration at the time of progesterone device insertion. Administration of PG at the time of device insertion resulted in lesser progesterone concentrations throughout the period of intravaginal device treatment, increased the diameter of the ovulatory follicle and an earlier time when ovulation occurred relative to the time of progesterone device removal. The pregnancy rate was not affected by the PG administration at the time of device insertion, and consequently there was a lesser fertility when FTAI was delayed to 54 h after device removal.

The positive effect of relatively lesser progesterone concentrations on the growth of the dominant follicle has been clearly documented (Dadarwal et al., 2013; Sirois and Fortune, 1990; Utt et al., 2003), an effect that is mediated by an increase in the frequency of LH pulses (Ginther et al., 2001, 2013a; Ireland and Roche, 1982). Relatively greater progesterone concentrations decrease the frequency of LH pulses (Bergfeld et al., 1996; Ginther and Beg, 2012) and, consequently, suppress follicular growth and result in smaller follicles (Adams et al., 2008; Stock and Fortune, 1993) from which there is sometimes a failure of ovulation to occur. If ovulation from small follicles occurs, there is a lesser fertility, probably due to: a) the development of a smaller CL and subsequently relatively lesser progesterone concentrations than when there is ovulation for relatively larger follicles (Crowe, 2008; Wiltbank et al., 2012b), b) less oocyte developmental competence (Abreu et al., 2018; Lequarre et al., 2005) or c) lesser preovulatory estradiol concentrations that negatively affect uterine programming (Binelli et al., 2017; Bó et al., 2016). The optimal progesterone concentrations for having an endocrine milieu and physiological conditions that results in maximal pregnancy in cattle with use of FTAI protocols has not been clearly established, and the current study contributes novel information in this regard. In the present study, circulating progesterone concentrations in heifers treated with PGF2 α at the time of device insertion and removal were less throughout the device treatment period than in heifers treated with a single PG dose at device removal. This effect promoted preovulatory follicular growth with a greater diameter of the follicle from which ovulation occurred at device removal and at the time of ovulation. Thus, the results of the current study indicate that in estrous cycling *Bos taurus* heifers with the use of this strategy, there was an effective maintenance of optimal progesterone concentrations for promotion preovulatory follicular growth.

In general, the larger the dominant follicle at the end of treatment for FTAI, the lesser the interval to the onset of estrus and ovulation (Adams et al., 2008; Ginther et al., 2013b; Savio et al., 1993). Ovulatory follicle size and its physiological maturity are implicated in contributing to the establishment and maintenance of pregnancy (Lamb et al., 2001). In the present study, the interval from device removal to ovulation was less in heifers that received the split PG treatment. The convenience with use of this treatment regimen is controversial, because the benefit of increased ovulatory size is negated by the earlier time of ovulation as compared to when this split PG treatment regimen is not imposed, which is associated with lesser endogenous estradiol during the preovulatory period (Binelli et al., 2014, 2009) and uterine programming (de La Mata et al., 2018; Sponchiado et al., 2017). Because the interval from device removal to ovulation appears to affect fertility (Bridges et al., 2008), novel strategies to prolong proestrus length have

Table 2

Pregnancy rate obtained after prostaglandin (PG) F2 α administered in two-half doses at device insertion and removal (two-PG treatment) or in a single dose at progesterone intravaginal device removal (one-PG treatment) with a progesterone and estradiol-based treatment regimen being imposed for FTAI; 2-year-old heifer data in the upper panel and 14-month-old heifer data are in the lower panel.

	Two-PG treatment			One-PG treatment			<i>P</i> -value		
	FTAI 48 h	FTAI 54 h	Overall	FTAI 48 h	FTAI 54 h	Overall	PG treatment	Time of FTAI	PG x FTAI
2-year heifers									
With CL (<i>n</i> = 1474)	68.4% (249/364) ^{ab}	63.5% (254/400) ^b	65.8% (503/764)	66.4% (233/351) ^{ab}	70.5% (253/359) ^b	68.5% (486/710)	0.31	0.90	0.07
Without CL (<i>n</i> = 1216)	63.1% (183/290)	61.6% (186/302)	62.3% (369/592)	65.3% (190/291)	63.4% (211/333)	64.3% (401/624)	0.48	0.53	0.93
14-month heifers									
With CL (<i>n</i> = 386)	44.9% (44/98)	47.7% (42/88)	46.2% (86/186)	57.0% (57/100)	50.0% (50/100)	53.5% (107/200)	0.16	0.68	0.33
Without CL (<i>n</i> = 403)	45.0% (45/100)	55.7% (59/106)	50.5% (104/206)	54.8% (51/93)	56.7% (59/104)	55.8% (110/197)	0.28	0.21	0.38

Simple effects are compared only when an interaction was a *P*-value < 0.1; For this case in the same row, a compared with b differs (*P* < 0.05).

been proposed and implemented with some success (Bridges et al., 2010; De La Mata et al., 2018). Thus, this paradoxical effect of the PG treatment at device insertion that occurred in Experiment 1, could have an unknown, if not negative, outcome on fertility.

In the present study, even with the differences in the circulating progesterone concentrations and ovulatory follicle diameter among PG treatment groups, there were similar results in pregnancy rates after FTAI. In the present study, the AI was performed at 48 or 54 h, and the ovulation occurred approximately 64 to 78 h after progesterone device removal (*i.e.*, on average, 10 to 30 h after insemination). In estrous cycling 2-year-old heifers that were treated with the two-PG dose regimen and when FTAI was performed at 54 h after device removal, the pregnancy rate was less than in heifers that were treated with PG only at the time of device removal and FTAI occurred at 48 h. It is hypothesized that the lesser pregnancy rate in heifers where there was FTAI at 54 h was related to a shorter interval from insemination to ovulation. In the two-PG treatment group, however, P/AI percentage was similar to when FTAI was performed at 48 h, and thus this result does not fully support this hypothesis. Based on this finding, it does not appear to be beneficial to treat with the half PG dose at the time of device insertion in *Bos taurus* heifers. Results from previous studies in *Bos indicus* and cross-bred heifers indicated females that had a CL at the beginning of treatment and in which there was relatively greater circulating progesterone concentrations induced by intravaginal device insertion as compared with females not treated with the device could have a lesser growth of dominant follicles, which would negatively affect ovulation and pregnancy rate (Cutaia et al., 2003; Sá Filho et al., 2015; Sales et al., 2015; Vasconcelos et al., 2013). Results of the present study in *Bos taurus* heifers are not consistent with these lines of thought in *Bos indicus* heifers and indicate there was a differentiated effect among these females. Significant differences have been reported in progesterone pharmacokinetics among *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers (Carvalho et al., 2008, 2017). Additionally, when the same progesterone treatment are administered in both genotypes, circulating progesterone concentrations, which suppress follicular growth and lead to lesser pregnancy rates after AI, are greater in *Bos indicus* heifers (Carvalho et al., 2017; Sartori et al., 2016a, 2016b). The differences between the benefit of PG treatment in *Bos indicus* heifers reported previously and the neutral effect in *Bos taurus* heifers that was ascertained in the present study seems to be supported by the differences in progesterone pharmacokinetics reported previously.

The control of circulating progesterone concentrations by the administration of PG at device insertion may also be affected by the amount of progesterone contained in the intravaginal device. Findings in the present study are valid only for treatment with devices containing 0.5 g of progesterone, and in the present study, associated with an eCG treatment at the time of progesterone-device removal. This protocol for FTAI, consisting of an intravaginal device with 0.5 g of progesterone, EB, ECP and eCG, is the most popular treatment in South American countries (Bó et al., 2018), where more than 16 million cows and heifers are inseminated annually using FTAI protocols (Mapletoft et al., 2018). Using this protocol, the administration of a half dose of PG at the time of progesterone device insertion does not appear to be beneficial for enhancing P/AI percentage in *Bos taurus* heifers, and the complete dose is recommended in a single administration at the time of device removal. From a practical perspective, in addition to the easy implementation of the single PG treatment, the longer period (*i.e.*, from 48 to 56 h) for conducting inseminations may be maintained with use of the single PG treatment at the time of progesterone device removal. This is relevant for large-scale FTAI programs with 400 to 500 females per day (insemination am and pm), and in small herds, allows the time of insemination to be more convenient.

5. Conclusions

The administration of PG at the time of insertion of an intravaginal progesterone device (0.5 g) with FTAI results in relatively lesser progesterone concentrations throughout the treatment period as compared with when there is treatment with a single dose of PG at the time of device removal. Consequently, there is a larger size of the ovulatory follicle and shorter interval to ovulation in *Bos taurus* beef heifers treated using the split PG treatment regimen at the time of insertion and removal of the intravaginal progesterone device. Pregnancy rate is not different with use of a split dose of PG at the time of progesterone device insertion and removal as compared with when PG is only administered at the time of device removal, therefore, PG may be administered in a single dose at the time of device removal without detrimental effects on P/AI percentage.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgements

The authors thank Federico Rubio and Diego Rubio for providing animals and facilities, Reynaldo Bonino and Andrés Peñaricano for handling the animals and Romina Artagaveytia and Camila Brochado for technical assistance throughout Experiment 1. This study was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, PR_FMV_3_2016_1_125451), Syntex Uruguay, Fundaciba, and Fundación IRAUy.

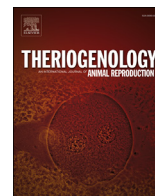
References

- Abreu, F.M., Coutinho da Silva, M.A., Cruppe, L.H., Mussard, M.L., Bridges, G.A., Harstine, B.R., Smith, G.W., Geary, T.W., Day, M.L., 2018. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. *Anim. Reprod. Sci.* 196, 59–68.
- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72–80.

- Bergfeld, E.G.M., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Mariscal, V., Sanchez, T., Kinder, J.E., 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β -estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.* 54, 546–553.
- Binelli, M., Machado, R., Bergamaschi, M.A., Bertan, C.M., 2009. Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. *Anim. Reprod.* 6, 125–134.
- 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., 2017. Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Belo Horiz. 41, 121–129.
- Binelli, M., Pugliesi, G., Hoock, V.V., Sponchiado, M., Ramos, R.S., Oliveira, M.L., França, M.R., D'Alexandri, F.L., Mesquita, F.S., Membrive, C.M.B., 2014. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim. Reprod.* 11, 246–253.
- Bó, G.A., de la Mata, J.J., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86, 388–396.
- Bó, G.A., Huguenine, E., De La Mata, J.J., Núñez-Olivera, R., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2018. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)* 15, 952–962 (Suppl. 1).
- Bridges, G.A., Helsel, L.A., Grum, D.E., Mussard, M.L., Gasser, C.L., Day, M.L., 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69, 843–851.
- Bridges, G.A., Mussard, M.L., Burke, C.R., Day, M.L., 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 208–215.
- Carvalho, J.B.P., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69, 167–175.
- Carvalho, J.B.P., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Soares, J.G., Baruselli, P.S., 2017. Efeito da prostaglandina F 2 α no início do protocolo de sincronização da ovulação em novilhas leiteiras *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bos indicus* X *Bos taurus*. *Bol. Ind. Anim. Nov. Odessa* 74, 122–134.
- Crowe, M., 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl. 5), 20–28.
- Cutaia, L., Peres, L., Pincinato, D., Chesta, P., Ramos, M., Bó, G.A., 2007. Programas de sincronización de celos en vaquillonas de carne: Puntos críticos a tener en cuenta. *Proceedings of the VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba* 1, 77–87.
- Cutaia, L., Tribulo, R., Moreno, D., Bó, G.A., 2003. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 59, 216 (Abstract).
- Dadarwal, D., Mapletoft, R.J., Adams, G.P., Pfeifer, L.F.M., Creelman, C., Singh, J., 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 79, 859–866.
- de La Mata, J.J., Núñez-Olivera, R., Cuadro, F., Bosolasco, D., De Brun, V., Meikle, A., Bó, G.A., Menchaca, A., 2018. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 1541–1552.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2018. InfoStat version 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina Available at <http://www.infostat.com.ar> [verified 20-09-2018].
- Dickinson, S.E., Geary, T.W., Monnig, J.M., Pohler, K.G., Green, J.A., Smith, M.F., 2016. Effect of preovulatory follicle maturity on pregnancy establishment in cattle: the role of oocyte competence and the maternal environment. *Anim. Reprod.* 13, 209–216.
- Ginther, O.J., Bashir, S.T., Mir, R.A., Santos, V.G., Beg, M.A., 2013a. Interrelationships among progesterone, LH, and luteal blood flow during a pulse of a PGF2 α metabolite and functional role of LH in the progesterone rebound in heifers. *Theriogenology* 79, 1110–1119.
- Ginther, O.J., Beg, M.A., 2012. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biol. Reprod.* 86 (Suppl. 6), 1–12 170.
- Ginther, O.J., Bergfeld, D.R., Beg, M.A., Kot, K., 2001. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. *Reproduction* 122, 103–110.
- Ginther, O.J., Pinaffi, F.L.V., Khan, F.A., Duarte, L.F., Beg, M.A., 2013b. Follicular-phase concentrations of progesterone, estradiol-17 β , LH, FSH, and a PGF2 α metabolite and daily clustering of prolactin pulses, based on hourly blood sampling and hourly detection of ovulation in heifers. *Theriogenology* 79, 918–928.
- Ireland, J.J., Roche, J.F., 1982. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *J. Reprod. Fert.* 64, 295–302.
- Jinks, E.M., Smith, M.F., Atkins, J.A., Pohler, K.G., Perry, G.A., MacNeil, M.D., Roberts, A.J., Waterman, R.C., Alexander, L.J., Geary, T.W., 2012. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91, 1176–1185.
- Lamb, G.C., Stevenson, J.S., Kesler, D.J., Garverick, H.A., Brown, D.R., Salfen, B.E., 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79, 2253–2259.
- Lequarre, A.S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbiès-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P., 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63, 841–859.
- Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S., Menchaca, A., Sartori, R., 2018. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)* 15, 1003–1014 Suppl. 1.
- Martins, J.P.N., Acevedo, M.J.T., Cunha, T.O., Piterini, C., Pursley, J.R., 2017. The effect of presynchronization with prostaglandin F 2 α and gonadotropin-releasing hormone simultaneously, 7 d before Ovsynch, compared with Presynch-10/Ovsynch on luteal function and first-service pregnancies per artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 100, 5107–5116.
- Meikle, A., Tasende, C., Rodríguez, M., Garófalo, E.G., 1997. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 48, 1105–1113.
- Meneghetti, M., Filho, O.G.S., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M., 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology* 72, 179–189.
- Núñez-Olivera, R., de Castro, T., García-Pintos, C., Bó, G., Piaggio, J., Menchaca, A., 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 111–116.
- Peres, R.F.G., Júnior, I.C., Filho, O.G.S., Nogueira, G.P., Vasconcelos, J.L.M., 2009. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 72, 681–689.
- Perry, G.A., Swanson, O.L., Larimore, E.L., Perry, B.L., Djira, G.D., Cushman, R.A., 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 15–20.
- Perry, G.A., Smith, M.F., Roberts, A.J., MacNeil, M.D., Geary, T.W., 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 684–689.
- Sá Filho, M.F., Nasser, L.F.T., Penteado, L., Prestes, R., Marques, M.O., Freitas, B.G., Monteiro, B.M., Ferreira, R.M., Gimenes, L.U., Baruselli, P.S., 2015. Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of *Bos indicus* beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 160, 30–39.
- Sales, J.N.S., Carvalho, J.B.P., Crepaldi, G.A., Soares, J.G., Giroto, R.W., Maio, J.R.G., Souza, J.C., Baruselli, P.S., 2015. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. *Theriogenology* 83, 1093–1100.
- Sartori, R., Gimenes, L.U., Monteiro, P.L.J., Melo, L.F., Baruselli, P.S., Bastos, M.R., 2016a. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology* 86, 32–40.
- Sartori, R., Monteiro, P.L.J., Wiltbank, M.C., 2016b. Endocrine and metabolic differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive management. *Anim. Reprod.* 13, 168–181.

- Savio, J.D., Thatcher, W.W., Morris, G.R., Entwistle, K., Drost, M., Mattiacci, M.R., 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *Reproduction* 98, 77–84.
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127, 916–925.
- Sponchiado, M., Gomes, N.S., Fontes, P.K., Martins, T., Del Collado, M., Pastore, A.D.A., Pugliesi, G., Nogueira, M.F.G., Binelli, M., 2017. Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. *PLoS One* 12, 1–23.
- Stock, A.E., Fortune, J.E., 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory parameters. *Endocrinology* 132, 1108–1114.
- Utt, M.D., Jousan, F.D., Beal, W.E., Utt, M.D., Jousan, F.D., Beal, W.E., 2003. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 81, 1562–1567.
- Vasconcelos, J.L.M., Pereira, M.H.C., Meneghetti, M., Dias, C.C., Filho, O.G.S., Peres, R.F.G., 2013. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 10, 206–214.
- Vizcarra, J.A., Wettemann, R.P., 1996. Reproducibility, repeatability, and degree of expertise required to assess body condition score in beef cattle. *Prof. Anim. Sci.* 12, 28–31.
- Wiltbank, M.C., Salih, S.M., Atli, M.O., Luo, W., Bormann, C.L., Ottobre, J.S., Vezina, C.M., 2012a. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim. Reprod.* 9, 242–259.
- Wiltbank, M.C., Souza, A.H., Giordano, J.O., Nascimento, A.B., Vasconcelos, J.M., Surjus, R.S., Carvalho, P.D., Bender, R.W., Sartori, R., 2012b. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim. Reprod.* 9, 231–241.

ANEXO II



Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time

R. Núñez-Olivera ^{a, b}, F. Cuadro ^{a, b}, D. Bosolasco ^{a, b}, V. de Brun ^{b, c}, J. de la Mata ^{d, f}, C. Brochado ^{a, b}, A. Meikle ^c, G.A. Bó ^{d, e}, A. Menchaca ^{a, *}

^a Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay

^b Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^c Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^d Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Córdoba, Argentina

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

^f Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, La Pampa, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2019

Received in revised form

22 March 2020

Accepted 24 March 2020

Available online 28 March 2020

Keywords:

Proestrus

Endometrium

Uterine function

GnRH

Receptors

Estradiol

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration associated to different proestrus lengths for Fixed-time AI (FTAI) in beef heifers. In Experiment 1, pre-pubertal heifers ($n = 46$) received a 6-day estradiol/progesterone-based treatment (J-Synch protocol), and were then allocated into four experimental groups in a 2×2 factorial design, to receive or not receive eCG (300 IU) at the time of intravaginal progesterone device removal, and to receive GnRH at 48 h or 72 h after device removal (to induce shortened and prolonged proestrus length, respectively). Endometrial samples were obtained 6 d after ovulation from the cranial portion of the uterine horn. The eCG administration induced greater serum estradiol-17 β concentrations before ovulation ($P < 0.05$) and greater proportion of heifers bearing a competent corpus luteum after ovulation ($P = 0.054$). Delaying GnRH administration from 48 h to 72 h induced a longer interval from device removal to ovulation (*i.e.*, prolonged proestrus; $P < 0.05$), larger diameter of the ovulatory follicle, and greater progesterone concentrations on Day 10–11 after ovulation. Heifers in eCG + GnRH72h group had more uterine receptors in luminal epithelium than those in eCG + GnRH48h group (PR and ER α), and than those in No eCG + GnRH72h group (PR) ($P < 0.05$). No effect of eCG or GnRH treatments was found in endometrial gene expression of progesterone and estrogen receptors. In Experiment 2, a total of 2,598 heifers received the J-Synch protocol associated or not with eCG administration at device removal, followed by FTAI/GnRH at 60 or 72 h after device removal (*i.e.*, prolonged proestrus protocol). Heifers that received eCG had greater P/AI than those not receiving eCG ($P < 0.05$) and there was an interaction between eCG treatment and time of FTAI. The lowest P/AI was found in those heifers that received FTAI/GnRH at 72 h without eCG treatment at device removal ($P < 0.05$), and no differences were found between the other experimental groups. In conclusion, prolonging the length of proestrus in J-Synch protocol improves ovulatory follicular diameter and luteal function; and the administration of eCG at device removal improves preovulatory estradiol concentrations and luteal function. Finally, P/AI was enhanced by eCG treatment and the improvement was more evident when FTAI/GnRH was performed at 72 h after device removal.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Recent information suggests that in Fixed-time Artificial Insemination (FTAI) programs, the length of the proestrus period (defined as the interval from the time of progesterone fall to

* Corresponding author.

E-mail address: menchaca.alejo@gmail.com (A. Menchaca).

ovulation) affects pregnancy rates per AI (P/AI). The importance of the proestrus length derived from the cumulative analysis of several studies that showed that the more consistent predictor of P/AI in cycling *Bos taurus* cattle was the duration of proestrus, rather than other factors such as follicle diameter or ovulatory follicular age [1,2]. This information led to the development of novel prolonged proestrus protocols in North America [3] and South America [4]. The 6-day J-Synch protocol is a progesterone and estradiol-based treatment that has gained the attention among practitioners and producers in South America, since higher P/AI has been reported than that obtained with the more traditional 7-day protocol [5]. This protocol consists of shortening the progesterone treatment (from 7 or 8 to 6 days) and replacing estradiol cypionate treatment at device removal by the administration of GnRH 72 h later [4,6]. Although previous studies have shown higher P/AI in heifers treated with the J-Synch protocol than those treated with the conventional protocol [5], the timing for GnRH treatment and FTAI in the J-Synch treatment deserves further investigation.

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is a variant of equine luteinizing hormone (LH), differentially glycosylated by the equine trophoblastic cells and has the peculiar property of provoking both follicle-stimulating hormone (FSH) and LH activity in non-equid species [7]. When administered at time of removal of the progesterone intravaginal device, eCG increases circulating concentrations of estradiol [8,9], ovulatory follicular diameter and serum progesterone concentrations after ovulation in anestrus cows [10–12]. For this reason, eCG administration at device removal improves pregnancy rate and is used as a default treatment in conventional protocols for FTAI [4,13]. However, the use of eCG in prolonged proestrus protocols such as J-Synch or 5-day Co-Synch has not been critically evaluated yet. Preliminary data of the current experiment was reported before [14], with promising outcomes about the use of eCG in the J-Synch protocol.

Uterine function is influenced by preovulatory estradiol and postovulatory progesterone concentrations, and the expression of their specific receptors, ER α and PGR respectively [15–17]. Estradiol during proestrus and estrus is involved in the control of physiological processes that contribute to the establishment of pregnancy, including the effect on follicular cells, oocytes, transport of gametes and preparation of the uterine environment [18]. On the other hand, the action of progesterone on the uterus, which depends on both the progesterone concentrations and the presence and quantity of its receptors in the endometrium [19], promotes the histotroph and stimulates embryo development and maternal recognition of pregnancy [20]. Therefore, the measurements of hormone receptors (mRNA expression and protein) in uterus is relevant to determine uterine functionality, and thus, to understand differences in the response to hormonal treatments.

The hypotheses of the present study were that preovulatory follicular growth and postovulatory uterine environment is improved by prolonged proestrus length, and that eCG administration at the end of a 6-day progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch protocol) improves pregnancy rate. Preovulatory follicular growth, circulating steroid hormones concentrations, and uterine expression and presence of steroid receptors was evaluated in *Bos taurus* beef heifers. In addition, it was determined whether the administration of eCG improves P/AI and influences the timing of insemination in large-scale FTAI programs.

2. Materials and methods

2.1. Animals and management

Two experiments were conducted during the spring breeding season of the Southern Hemisphere (November–February, 33 °S,

Uruguay) in Hereford and Angus crossbred heifers. All females were examined by ultrasonography to determine the presence or absence of a corpus luteum (CL) just before the beginning of treatments. In each experiment, heifers were kept together, grazing on rangeland on crystalline-based soil and had unrestricted access to water and mineral supplement. All experimental procedures involving animals and including injections, intravaginal device insertion, blood collection, ovarian ultrasonography, and uterine biopsies were approved by the Internal Animal Care Committee of Fundación IRAUy and were conducted in accordance with the guidelines of the National Council of Animal Care (CNEA) of Uruguay.

2.2. Experiment 1

The aim of this experiment was to evaluate the effect of eCG (300 IU) administration at the end of a shortened progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch) on preovulatory follicle development, ovulatory diameter, timing of ovulation, serum estradiol-17 β and progesterone concentrations, endometrial gene expression and tissue abundance and distribution of uterine ER α and PR in the early diestrus period in pre-pubertal *Bos taurus* beef heifers. This study was conducted on 2-year-old Hereford heifers ($n = 46$) without CL, with a body weight of 309.1 ± 3.3 kg (mean \pm SEM), and body condition score (BCS) 4.0 ± 0.1 (scale 1 to 8; 1 = emaciated and 8 = obese; [21]). Anestrus was determined in all heifers by the absence of CL detected by 2 ultrasonography examinations 10 d apart, just before the beginning of the synchronization treatment. The heifers received a releasing intravaginal silicone device containing 0.5 g of progesterone (DIB 0.5; Zoetis, Buenos Aires, Argentina) that was inserted for 6 d and 2 mg of estradiol benzoate (EB; Gonadiol, Zoetis) by intramuscular administration (i.m.) at device insertion. One dose of 500 μ g of cloprostenol sodium (Ciclase DL, Zoetis) was administered i.m. at device removal. Then, heifers were divided into 4 experimental groups to receive or not 300 IU of eCG (Novormon, Zoetis) administered i.m. at device removal and were further subdivided to receive 100 μ g of gonadorelin acetate (GnRH; Gonasyn GDR, Zoetis) administered i.m. at 48 h or at 72 h after device removal, in a 2 \times 2 factorial design (Fig. 1). The heifers were randomly allocated in each experimental group blocked by ovarian activity (i.e.: at least one follicle >8 mm in diameter or just follicles <8 mm in diameter), body weight and BCS.

2.3. Ultrasound examinations

Ovarian examinations were performed daily by ultrasonography using a B-Mode ultrasound scanner with a linear-array transducer (7.5 MHz, WED-9618V Well.D, Shenzhen, China). Examinations were carried out by the same operator every 12 h from device removal to ovulation or until 144 h later, whichever occurred first. In ovulated heifers, the examinations were then done every 24 h until Day 11 after ovulation. In each examination, all follicles greater than 3 mm in diameter, and the CL was measured using an internal electronic caliper, video recorded, and registered on an individual ovarian map. For each heifer, two images of the largest follicle were measured at its maximum diameters (width and height) and the average was considered for statistical analysis. Ovulation was detected by the disappearance of the largest follicle between two consecutive ultrasound examinations and confirmed 12 h later. To determine the total volume of the CL formed in ovulated heifers, the average of perpendicular diameters (length [L] and width [W]) was calculated with the formula: $V = (4/3) \cdot \pi \cdot r^3$; r was defined as radius, where $r = (L/2 + W/2)/2$, as described previously [22]. If the CL had a central fluid-filled cavity, it was calculated with the same formula and subtracted from the total volume of the CL.

2.4. Hormonal determinations

Blood samples were collected daily from progesterone device removal until 11 d after ovulation from the jugular vein into 10 mL tubes to determine serum estradiol-17 β and progesterone concentrations. All samples were centrifuged 1 h after collection at 1000 X g for 20 min, and serum was harvested and stored at -20°C until assayed in the *Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria*, Montevideo, Uruguay. Both serum estradiol-17 β and progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) in liquid phase and direct solid phase, respectively. Circulating concentrations of estradiol-17 β were determined after using the ether extraction method by a double antibody RIA. This extraction protocol is routinely used in this laboratory and was first reported by Meikle [23], resulting in a recovery of 87% of the original counts per million (cpm). After extraction, samples were analyzed by duplicate in one assay, and in liquid phase RIA following the recommendations of a commercially available specific kit (DIAsource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium). The sensitivity for estradiol-17 β RIA was 4.0 pg/mL and the intra-assay coefficients of variation (CVs) for quality Control 1 (91.6 pg/mL) and quality Control 2 (150.7 pg/mL) provided by the company were 8.0% and 3.6%, respectively. Progesterone concentrations were determined in four assays in direct solid phase RIA following the recommendations of a commercially available kit (MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA). The sensitivity for progesterone RIA was 0.29 ng/mL, and the intra-assay CVs for quality Control 1 (0.6 ng/mL) and quality Control 2 (2.8 ng/mL) were 7.8% and 8.3%, respectively. The inter-assay CVs for the same quality controls were 9.8% and 8.1%, respectively.

2.5. Uterine biopsies

Endometrial samples were obtained 6 d after ovulation from the third cranial portion of the uterine horn, next to the uterine-oviductal junction through biopsy forceps (10366LL, Karl Storz GmbH & Co., Tuttlingen, Germany). In all heifers two samples from ipsilateral uterine horn to the CL and one sample from the contralateral uterine horn, were taken. Endometrial biopsies (one of the ipsi and the contralateral samples) were snap frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis. The remaining sample from the ipsilateral horn was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for immunohistochemistry analysis. All samples after collection were stored until assayed in the *Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria*, Montevideo, Uruguay.

2.6. Isolation and purification of RNA, reverse transcription and quantitative real time PCR

Total RNA from endometrium tissue collected from all heifers was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by precipitation with lithium chloride and DNase-treatment with DNA-FreeTM 180 Kit (Ambion, Austin, TX, USA). Concentration of RNA was determined by measuring absorbance at 260 nm, the purity of all RNA isolates was assessed from 260 to 280 absorbance ratio and the integrity by electrophoresis (1% agarose gel). For each sample, cDNA was synthesized by reverse transcription using the SuperScript III transcriptase (Invitrogen) with oligo-dT primers and 1 μg total RNA added as a template. Sequences and the expected product lengths of primers to amplify cDNA of the target genes *PGR*, *ESR1*, and of the endogenous controls, ribosomal protein L19 (*RPL19*), hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase (*HPRT*) and β -actin (*BACT*), are presented in Table 1. Real-time PCR reactions were performed using 7.5 μL SYBER® Green master-mix

(Quantimix EASY SYG kit, Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), equimolar amounts of forward and reverse primers (200 nM; Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany), and 2 μL diluted cDNA (1:10 in RNase/DNase free water) in a final volume of 15 μL . Samples were analyzed in duplicate in a 72-disk Rotor-GeneTM 197 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Standard amplification conditions were 5 min at 95 $^{\circ}\text{C}$ and 40 cycles of 15 s at 95 $^{\circ}\text{C}$, 40 s at 60 $^{\circ}\text{C}$, and 20 s at 72 $^{\circ}\text{C}$. At the end of each run, dissociation curves were analyzed to ensure that the desired amplicon was being detected and to discard contaminating DNA or primer dimers. Samples of cDNA from eight heifers (two from each group) were pooled to provide an exogenous control and five dilutions (from 100 to 6.25 ng/tube) of this pool were used to perform linear regressions for each gene. The efficiency (E) of the assays was calculated according to the formula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$; [24]; Table 1). Gene expression was measured by relative quantification to the exogenous control and normalized to the geometric mean expression of the endogenous control genes (*RPL19*, *HPRT* and *BACT*), considering the respective efficiencies [25].

2.7. Immunohistochemistry

Tissue abundance and distribution of progesterone and estrogen receptors was visualized in transverse 5- μm sections from uterine horn tissue ipsilateral to the corpus luteum using an avidin-biotin-peroxidase immunohistochemical technique [26]. Tissue sections were dewaxed and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. The sections were then placed in sodium citrate 0.01 M (pH 6.0) and microwaved for 4.5 min to improve antigen exposure. The remainder of the procedure was performed at room temperature. After washing with PBS (0.01 M, pH 7.5), the non-specific activity of endogenous peroxidases was blocked with hydrogen peroxide 3% in methanol for 10 min, and the samples were incubated with normal horse serum (NHS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 60 min in a humid chamber. They were then incubated for 1 h with the primary antibody, mouse monoclonal anti-ER α (Santa Cruz Biotechnology, Los Angeles, CA, USA) and anti-PR (Zymed, San Francisco south, CA, USA) diluted 1:25 and 1:100 in PBS, respectively. The negative controls were generated by replacing the primary antibody with a homologous non-immune IgG at an equivalent concentration (Santa Cruz Biotechnology). After primary antibody binding, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) anti-mouse ER α , and PR, diluted 1:200 in normal horse or goat serum. The Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) was used for protein detection. The location of the bound enzyme was visualized by 3, 3'-diaminobenzidine in H₂O₂ (DAB kit; Vector Laboratories) and then sections were counterstained with haematoxylin and dehydrated before they were mounted.

2.8. Image analysis

Receptor staining intensity was evaluated immunohistochemically in three endometrial compartments; luminal epithelium (LE), glandular epithelium (GE; superficial glandular epithelium next to the uterine lumen), and the intercaruncular stroma (IS). The amount of immunoreactive protein in the different cell types was estimated subjectively by two independent technicians who were blinded to the treatment groups. Ten fields were analyzed for each cell type at a magnification of $\times 1000$ for all heifers. The staining of the nuclei was scored as negative (–), faint (+), moderate (++) or intense (+++) and the extent of staining of each cell type was expressed over a scale of 0–10 [27], where 0 is the absence of staining and 10 is the maximum staining intensity. The average staining intensity was calculated as $(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$,

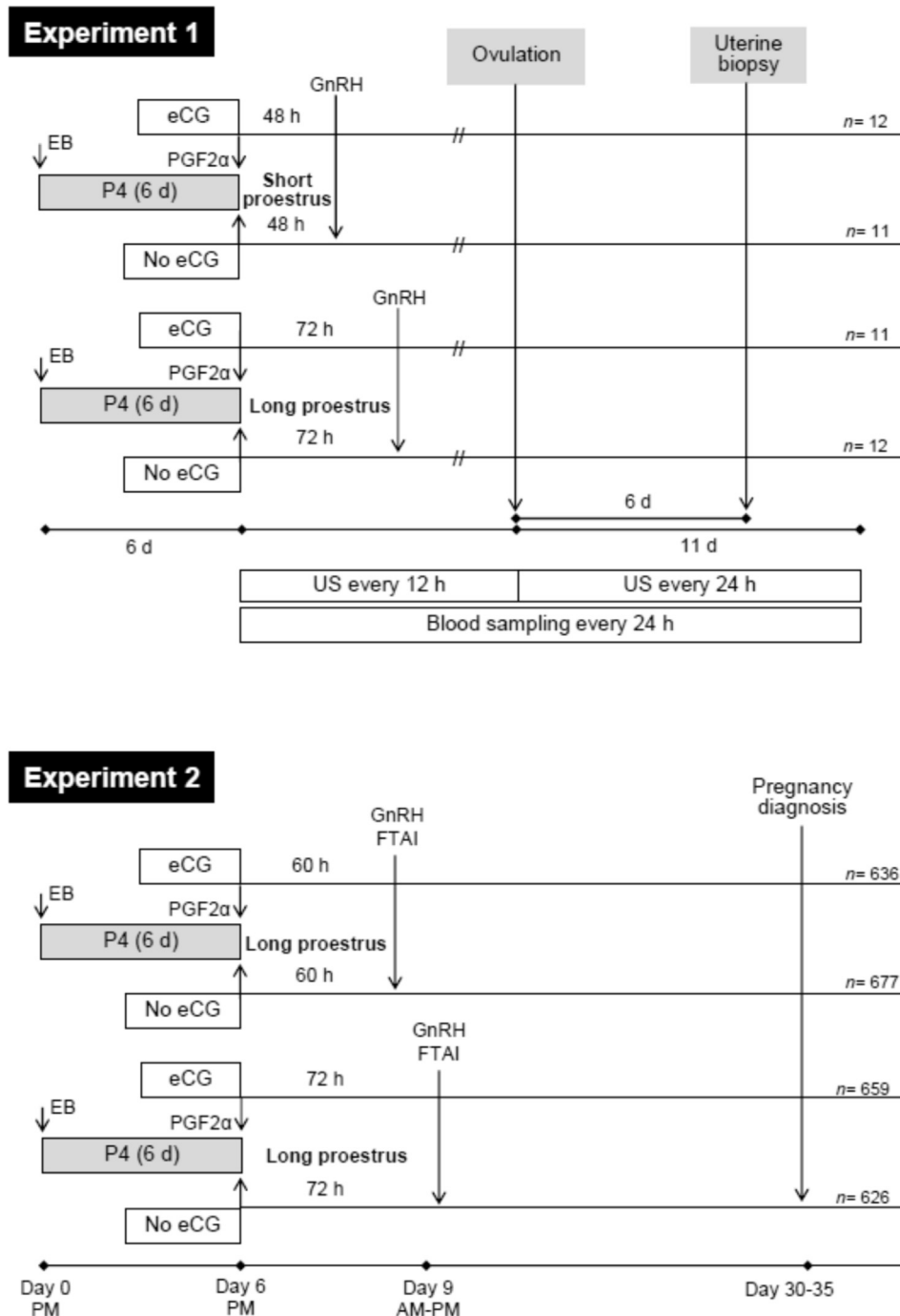


Fig. 1. Schematic representation to study the effect of eCG associated to a prolonged proestrus protocol for FTAI in beef heifers. In Experiment 1, anestrous heifers were allocated into four treatments (2×2 factorial design) to receive or not eCG administration at progesterone intravaginal device removal in the J-Synch protocol (6 d progesterone treatment), associated with a shortened or prolonged proestrus period (GnRH at 48 h or 72 h, respectively). In Experiment 2, a total of 2,598 heifers received or not eCG administration in a prolonged proestrus period induced with the J-Synch protocol with FTAI/GnRH at 60 h or 72 h after device removal. EB: Estradiol benzoate 2 mg; P4: Intravaginal device containing 0.5 g of progesterone; GnRH: Gonadorelin acetate 100 μ g; eCG: Equine chorionic gonadotropin 300 IU; PGF2 α : Cloprostenol sodium 500 μ g; US: Ultrasonography for ovarian examination; FTAI: Fixed-time artificial insemination.

where n is the number of cells in each field exhibiting faint (n_1), moderate (n_2) and intense (n_3) staining [28].

2.9. Experiment 2

The aim of this experiment was to evaluate the effect of eCG administration at progesterone device removal in a prolonged

proestrus protocol for FTAI (J-Synch protocol) on P/AI in *Bos taurus* beef heifers. This study was conducted in 6 replicates in different farms located in Uruguay. A total of 2,598 two-year-old heifers predominantly Hereford, Angus and its crossbreds, with BCS of 4.5 ± 0.1 (scale 1 to 8) were used. In each replicate, the presence or absence of CL was determined in each female by ultrasonography at the beginning of treatment (Day 0). All heifers received the same

shortened progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch protocol) described for Experiment 1. At device removal (Day 6, late afternoon), heifers were randomly assigned to receive or not receive 300 IU of eCG, and then were subdivided to receive GnRH at time of FTAI, which was performed early in the morning or in the afternoon of Day 9 (*i.e.*, at 60 h or at 72 h after device removal, assuming both as prolonged proestrus). Fixed-time AI was performed by two experienced technicians using frozen semen of one or two bulls per replicate, which were assigned equally to each experimental group. All herds enrolled in the study were under a similar management system on rangeland conditions with *ad-libitum* access to water, salt and mineral mixture. Pregnancy was determined by ultrasonography 30–35 d after insemination (Fig. 1).

2.10. Statistical analysis

Data were checked for normality and homogeneity of variance by histograms, q-q plots and formal statistical tests as part of the univariate procedure. Follicular development, serum estradiol-17 β and progesterone concentrations were analyzed by InfoStat software [29] using repeated-measures with generalized linear mixed models (GLMMs), including the animals as random variable, and treatment and day as fixed variables. The model included experimental treatments (eCG treatment and time of GnRH administration), day and their interaction. The ovulation rate (heifers ovulated/treated) was analyzed with Fisher's exact test. For qPCR data, all variables were subjected to analysis of variance using the mixed procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) that included in the model the laterality of reproductive tract in relation to the CL (ipsi or contralateral), treatment (eCG or no-eCG), time of GnRH (48 h or 72 h after progesterone device removal) and the interaction between groups as fixed effects, and PCR plate as a random effect. For immunohistochemistry, the mean staining intensity of the 10 fields was subjected to an analysis of variance using a mixed procedure in SAS, including in the statistical model treatment (eCG or no-eCG), time of GnRH (48 h or 72 h), cell types (luminal epithelium, superficial glandular epithelium and intercaruncular stroma), and their interactions as fixed effects. Tukey-Kramer tests were conducted to analyze differences between fixed effects and their interactions. Pearson correlation coefficients were used to describe relationships between variables. The type of variance-covariance structures was chosen depending on the magnitude of the Akaike information criterion (AIC) for models run under heterogeneous compound symmetry, unstructured, autoregressive, spatial power, and first-order ante-dependence. The model with the lowest AIC was chosen. In Experiment 2, the pregnancy rate was analyzed using logistic regression in GLMMs including the effect of the treatments (eCG or no-eCG), time of FTAI/GnRH (60 h or 72 h after progesterone device removal), the presence/absence of CL as fixed

effects, and their interactions. The replicate, animal ID, technician for AI, bull and semen batch were included as random effects. Data are presented as mean \pm SEM and the significance level were defined for a *P*-value of 0.05.

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. Preovulatory follicular growth and luteal development

On average, 91.3% (42/46) of the anestrous heifers ovulated, which was not affected by the eCG or GnRH treatment (Table 2). The four heifers that did not ovulate were excluded from the ovulatory follicular analysis. No double ovulations were found in eCG and no eCG treated females. Single-point measurements of the largest follicle and CL characteristic are shown in Table 2. As expected, heifers that received GnRH at 72 h after device removal had a longer ($P < 0.05$) proestrus period than those that received GnRH at 48 h after device removal. Proestrus was, on average, 9.7 h longer in the GnRH 72 h than GnRH 48 h group. The distribution of ovulation times is shown in Fig. 2. The mean diameters of dominant ovulatory follicles are shown in Fig. 3. Heifers that received GnRH at 72 h after device removal had a greater ($P < 0.05$) ovulatory follicle diameter than those that receive GnRH at 48 h. The percentage of heifers that ovulated before GnRH administration was greater ($P < 0.05$) in those that received GnRH at 72 h than in those that received GnRH at 48 h (Table 2).

According to ultrasonographic examinations of the CL and progesterone concentrations, two different luteal responses in both treatments groups were found after ovulation: a) heifers bearing a competent CL with a normal luteal phase, and b) heifers showing an early regressing CL, with a short cycle. In those heifers with a competent CL, the luteal echotexture was homogenous and progesterone concentrations were greater than 1 ng/mL during all the experimental period, until 11 days after ovulation. In those heifers that showed an early regressing CL, the luteal parenchyma was detected until five to eight days after ovulation and then, the CL size decreased, and the mean progesterone concentrations fell below 1 ng/mL. A total of 10 heifers had short luteal phases after ovulation, three of them were from the eCG group and seven of them were from the no eCG group (Table 2). The proportion of heifers bearing a competent CL (*i.e.*, serum progesterone concentrations >1 ng/mL on Day 11 after ovulation) over all treated heifers, was 82.6% (19/23) in the eCG groups and 56.5% (13/23) in the no eCG group, respectively ($P = 0.054$; Table 2).

3.1.2. Serum hormone concentrations

Mean serum estradiol-17 β concentrations from device removal to ovulation were affected by eCG treatment ($P < 0.05$), but not by

Table 1
Primer sequences, expected amplicon sizes, and efficiency of the quantitative polymerase chain reaction progesterone receptor (*PGR*), estrogen receptor alpha (*ESR1*), ribosomal protein L19 (*RPL19*), hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase (*HPRT*), and β -actin (*BACT*).

Gene	Accession number	Primer sequences	Length (pb)	Efficiency	References
<i>PGR</i>	Z66555	F: GACAGCACTTCTAGGCGATAT R: TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	1.10	[40]
<i>ESR1</i>	AY033393	F: AGGGAAAGCTCTATTGCTCC R: CCGTGGATGTGGTCTTCTCT	234	1.15	[40]
<i>RPL19</i>	NM_001040516.1	F: CCCCAATGAGACCAATGAAATC R: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	119	1.20	[41]
<i>HPRT</i>	XM_580802	F: TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R: CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	0.84	[42]
<i>BACT</i>	U08283	F: CGAGCAGCATGAAGATC R: CCTCCGATCCACCCGAGTA	64	1.03	[41]

Abbreviations: F, forward; R, reverse.

Table 2

Effect of eCG administration at onset of the proestrus (i.e., at intravaginal progesterone device removal) combined with GnRH at 48 h or 72 h after device removal on ovulatory follicular development in a shortened progesterone/estradiol-based synchronization treatment (J-Synch protocol) in beef heifers.

	GnRH 48 h		GnRH 72 h		P-value		
	eCG	No eCG	eCG	No eCG	eCG x GnRH	eCG	GnRH
Ovulation rate	100% (12/12)	81.8% (9/11)	90.9% (10/11)	91.7% (11/12)	NS	NS	NS
Diameter of the dominant follicle (DF) at device removal (mm)	8.8 ± 0.4	8.0 ± 0.3	8.3 ± 0.3	8.9 ± 0.4	NS	NS	NS
Diameter of the DF at GnRH administration (mm)	12.3 ± 0.5	11.8 ± 0.5	13.6 ± 0.3	13.3 ± 0.7	NS	NS	<0.05
Heifers that reached ovulation before GnRH administration	0% (0/12)	0% (0/9)	30.0% (3/10)	18.2% (2/11)	NS	NS	<0.05
Follicular diameter at ovulation (mm)	13.3 ± 0.4	12.9 ± 0.4	13.6 ± 0.3	13.9 ± 0.6	NS	NS	NS
Growth rate of the DF (mm/d)	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	NS	NS	NS
Interval from device removal to ovulation (h)	82.0 ± 2.0	80.0 ± 2.0	86.4 ± 4.1	94.9 ± 4.1	NS	NS	<0.05
Early regressed CL/ovulation	16.7% (2/12)	22.2% (2/9)	10.0% (1/10)	45.5% (5/11)	NS	<0.1	NS
Normal CL/treated heifers	83.3% (10/12)	63.6% (7/11)	81.8% (9/11)	50.0% (6/12)	NS	0.05	NS

the moment when GnRH was administered (48 h vs. 72 h; $P = 0.325$). Day affected estradiol-17 β concentrations ($P < 0.05$). Serum estradiol-17 β concentrations were greater in heifers that received eCG at device removal (10.1 ± 0.4 pg/mL) compared with those that did not receive eCG (8.7 ± 0.3 pg/mL; $P < 0.05$). Mean serum progesterone concentrations during the 11-day period after ovulation were not different between the treatment groups ($P = NS$), there was an effect of the day ($P < 0.05$) and no interaction of day by treatment ($P = NS$). When the data were compared during the mid-luteal phase (i.e., from Day 8–11 after ovulation), those heifers that received GnRH at 72 h showed higher progesterone concentrations than those that received GnRH at 48 h, with significant difference attained on Day 10 and 11 ($P < 0.05$). Data are shown in Fig. 4 and those heifers that showed early regressing corpus luteum with subluteal progesterone concentrations (<1 ng/mL) were not included in this analysis.

3.1.3. Endometrial gene expression

Endometrial *PGR* mRNA levels were not affected by eCG treatment or GnRH administration time (eCG vs. No eCG: 0.9 ± 0.3 and 1.1 ± 0.3 ; $P = NS$); GnRH administered at 48 h vs. 72 h (1.2 ± 0.3 and 0.9 ± 0.3 ; $P = NS$), nor eCG treatment by GnRH time interaction was found ($P = NS$). There was no effect of horn side relative to the CL

(i.e. ipsilateral or contralateral; $P = NS$) or side by treatment interaction on *PGR* mRNA expression (0.9 ± 0.3 and 1.1 ± 0.3 ; $P = NS$).

Endometrial *ESR1* mRNA levels were not affected by eCG treatment or the time of GnRH administration (eCG vs. No eCG: 1.2 ± 0.5 and 1.0 ± 0.5 ; $P = NS$); GnRH administered at 48 h vs. 72 h (1.2 ± 0.5 and 1.0 ± 0.5 ; $P = NS$), nor eCG by GnRH interaction ($P = NS$). There was no effect of horn side relative to the CL (i.e. ipsilateral or contralateral; $P = NS$) or side by treatment interaction on *ESR1* mRNA expression (1.1 ± 0.5 and 1.0 ± 0.5 ; $P = NS$).

3.1.4. Immunohistochemistry

Progesterone receptor and ER α were localized in the nuclei of the endometrial cells (Fig. 5 and Fig. 6). When specific antibodies were substituted with a nonimmune IgG, the absence of staining confirmed a high specificity of immunostaining.

The total PR-positive area tended to be dependent on cell type ($P < 0.1$), and the interaction for eCG treatment by time of GnRH administration tended to be significant ($P < 0.1$). Tukey-Kramer tests showed that the luminal epithelium presented more PR-positive staining area when compared with intercaruncular stroma (70 ± 6 vs. $58 \pm 6\%$; $P < 0.05$), and glandular epithelium tended to present more PR-positive staining area in comparison with

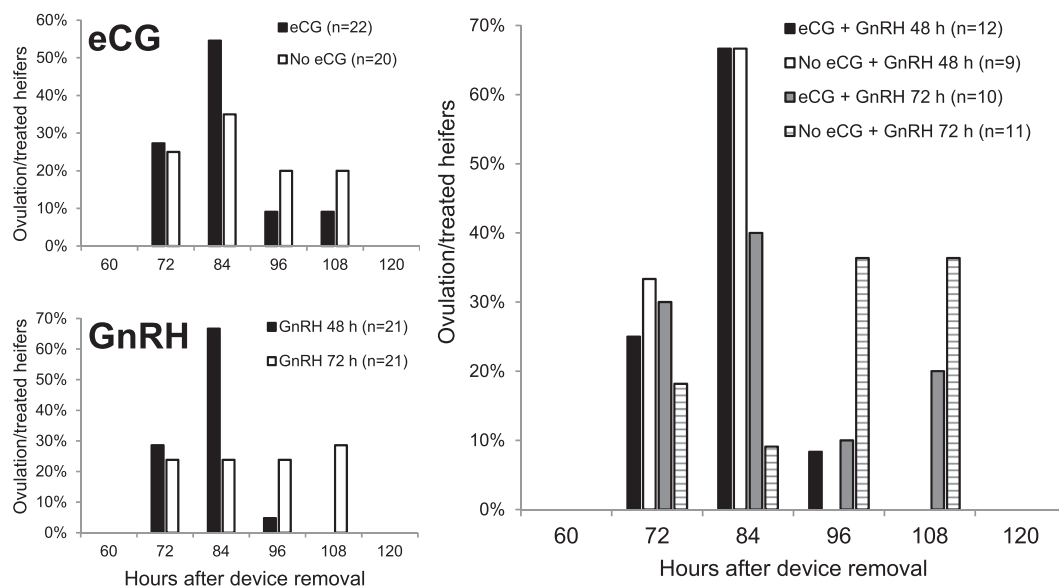


Fig. 2. Distribution of ovulation after intravaginal progesterone device removal in a progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch protocol) for FTAI in anestrous beef heifers. Data are expressed as main effects (left panel) for eCG treatment ($P = NS$) and GnRH treatment ($P < 0.05$); simple effects are shown as descriptive (right panel) since interaction between eCG*GnRH was not significant ($P = NS$).

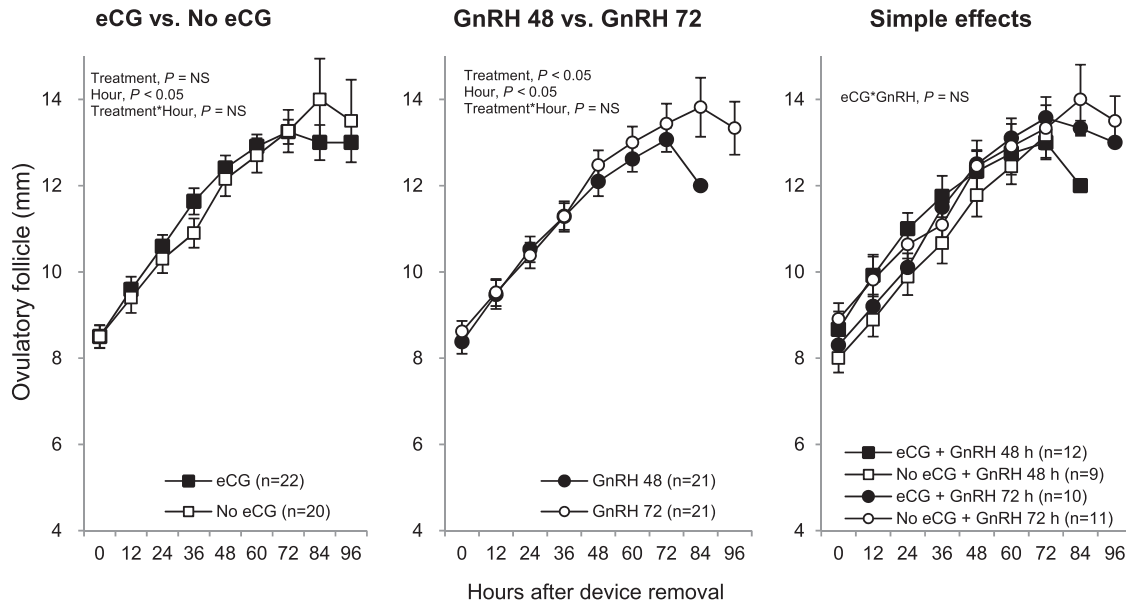


Fig. 3. Diameter of the dominant follicle after device removal in a progesterone and estradiol-based treatment for FTAI (J-Synch protocol) in anestrus beef heifers. Data (mean \pm SEM) are expressed as main effects for eCG treatment (left panel) and GnRH treatment (central panel), and as simple effects (right panel) even though no interaction eCG*GnRH was found.

intercaruncular stroma (68 ± 6 vs. $58 \pm 6\%$; $P < 0.1$). Nevertheless, no differences were found between luminal and glandular epithelium ($P = \text{NS}$). In luminal epithelium, heifers in eCG + GnRH72 group had more PR-positive staining area in comparison with those in eCG + GnRH48 group ($P < 0.05$), and those in No eCG + GnRH72 group ($P < 0.05$; Fig. 7). In addition, heifers in No eCG + GnRH48 group presented more PR-positive staining area than eCG + GnRH48 group in glandular epithelium ($P < 0.05$; Fig. 7).

The total ER α -positive area was affected by cell type ($P < 0.01$), and by the interaction between cell, eCG treatment and time of GnRH administration ($P < 0.01$). The luminal epithelium presented more ER α -positive staining area when compared with

intercaruncular stroma (63 ± 6 vs. $40 \pm 5\%$; $P < 0.01$), and glandular epithelium presented more ER α -positive staining area in comparison with intercaruncular stroma (64 ± 5 vs. $40 \pm 5\%$; $P < 0.01$). As for ER α , in luminal epithelium heifers in eCG + GnRH72 group had more ER α -positive staining area than those in eCG + GnRH48 group (89 ± 13 vs. $37 \pm 12\%$; $P < 0.05$; Fig. 7).

3.2. Experiment 2

Heifers treated with eCG at progesterone device removal had higher P/AI than those not receiving eCG ($P < 0.05$; Table 3). In addition, heifers that were FTAI and treated with GnRH at 60 h had

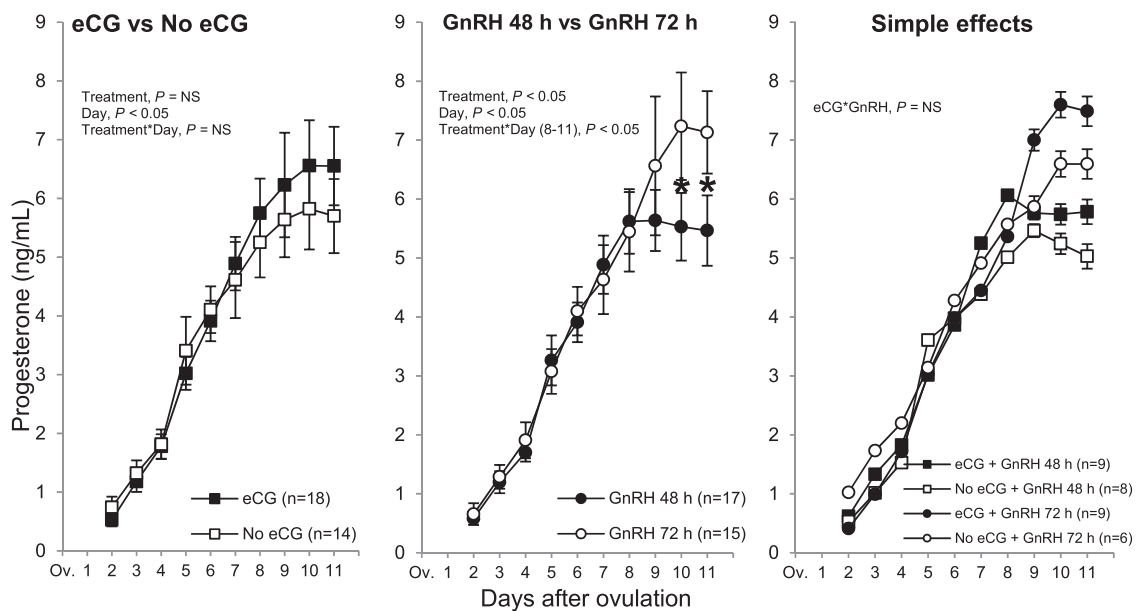


Fig. 4. Progesterone concentrations after device removal in a progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch protocol) for FTAI in anestrus beef heifers. Data are expressed as main effects (mean \pm SEM) for eCG treatment (left panel) and GnRH treatment (central panel), and simple effects (right panel). Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$). No interaction eCG*GnRH was found, and right panel is only illustrative.

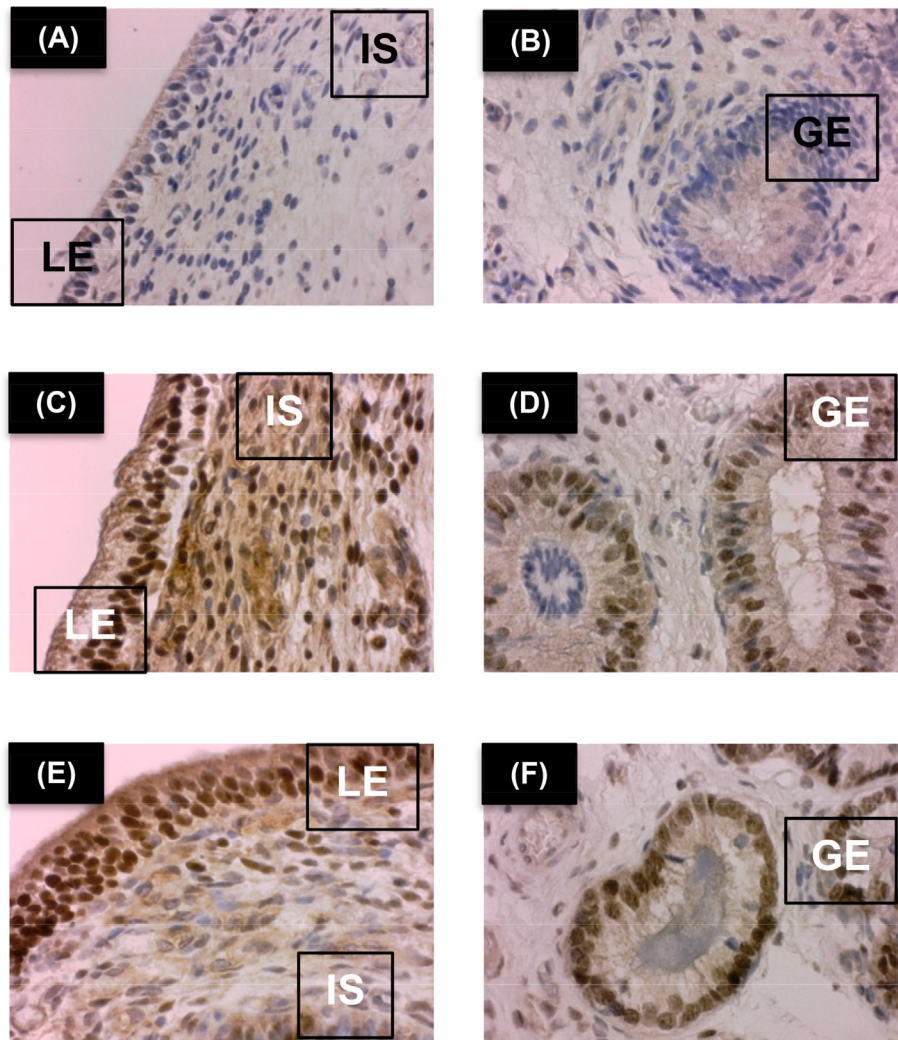


Fig. 5. Immunohistochemical localization of progesterone receptor (PR) in the luminal epithelium (LE), intercaruncular stroma (IS) and glandular epithelium (GE) of negative controls (A, B) in the uterine horn ipsilateral to the CL on Day 6 after ovulation. Samples from eCG treatment (C, D) and the different hours of GnRH administration (E, F), are shown as main effects, respectively. The negative control shown no staining because specific antibodies were substituted with a nonimmune immunoglobulin G (A, B). No differences were found in the mean staining intensity or PR positive area within each factor (eCG and GnRH treatment).

higher P/AI than those treated GnRH and FTAI at 72 h. Finally, there was an interaction between eCG treatment and FTAI/GnRH, due to a lower P/AI in those heifers that were not treated with eCG and were FTAI/GnRH at 72 h than those in other three treatment groups ($P < 0.05$). Greater P/AI occurred in cycling than anestrous heifers ($P < 0.05$) without interaction with eCG treatment nor FTAI/GnRH.

4. Discussion

The current study was conducted to both better define the J-Synch protocol regarding eCG and timing of GnRH, and, to gain understanding on the molecular aspects of uterine biology potentially affected by the treatments. Our findings demonstrate that eCG treatment improved pregnancy rate in heifers when administrated at the end of a 6-day progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch protocol). In addition, extending the length of the proestrus by delaying GnRH administration from 48 to 72 h, resulted in a larger ovulatory follicle with longer time of exposure to endogenous preovulatory estradiol, and greater postovulatory progesterone concentrations. Uterine functionality was affected by the treatments, which contributes with the better understanding of

pharmacological manipulation of reproduction in ruminants. These findings are supported by different approaches based on ovarian examinations by ultrasonography, hormone profiles determinations, uterine protein content, and fertility obtained in FTAI in many females.

Prolonged proestrus based treatments have gained attention among practitioners and producers in North and South America, since higher P/AI than those obtained with the more conventional protocols have been reported in beef cattle [2,6,30]. In a recent study it was demonstrated that the J-Synch protocol was effective in extending the proestrus by shortening the progesterone treatment (from 7 to 8 to 6 d) and by replacing the estradiol cypionate administration at device removal by GnRH at 60–72 h later [5]. In the current study we focused on the comparison among shortened and prolonged proestrus, induced by GnRH treatment at 48 and 72 h after device removal, respectively. The administration of GnRH at 72 h delayed the ovulation, increased ovulatory follicular size, prolonged the exposure period to endogenous estradiol before ovulation, and induced greater progesterone concentrations and uterine PR- and ER α -positive staining area in the subsequent luteal phase. These findings have been associated with greater success in

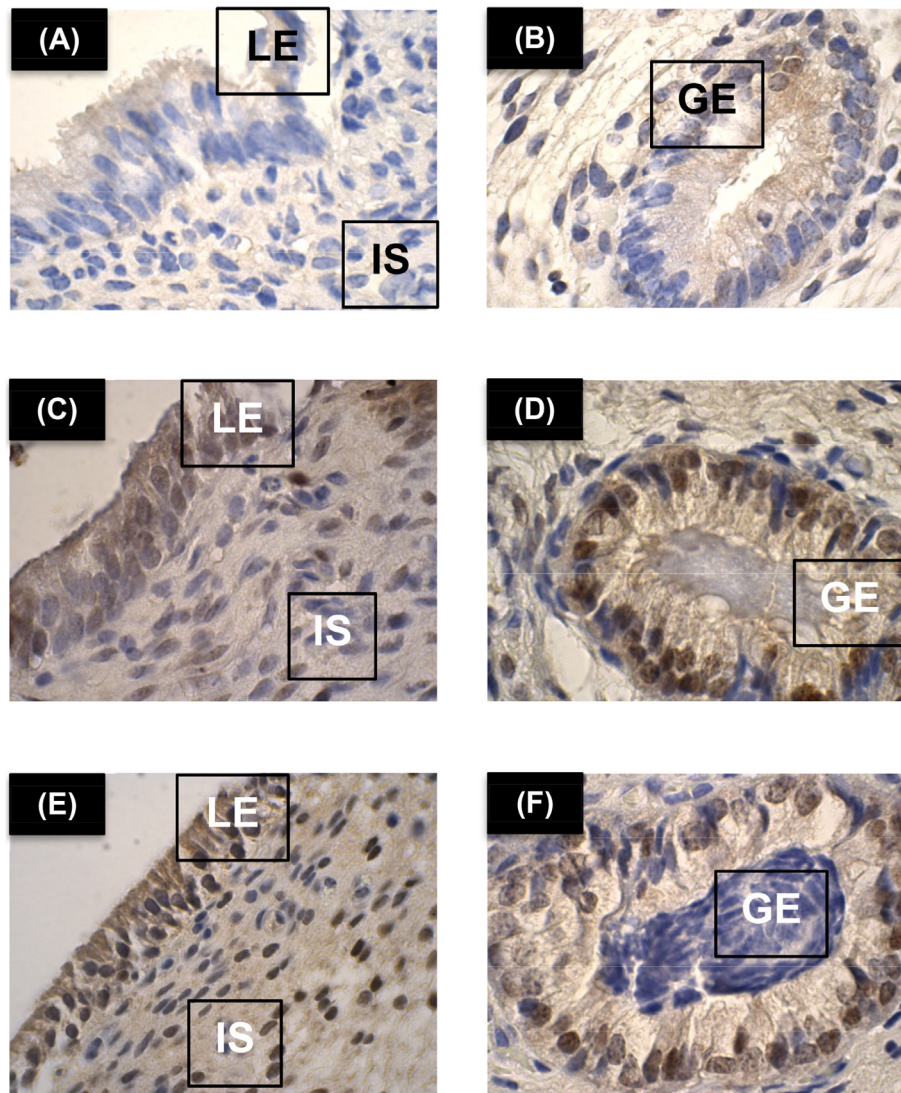


Fig. 6. Immunohistochemical localization of estrogen receptor alpha (ER α) in the luminal epithelium (LE), intercaruncular stroma (IS) and glandular epithelium (GE) of negative controls (A, B) in the uterine horn ipsilateral to the CL on Day 6 after ovulation. Samples from eCG treatment (C, D) and the different hours of GnRH administration (E, F), evaluated as main effects respectively. The negative control shown no staining because specific antibodies were substituted with a nonimmune immunoglobulin G (A, B).

the establishment and maintenance of pregnancy in cattle [19,31,32]. In fact, in a previous study when FTAI was performed following a prolonged proestrus induced with J-Synch protocol (FTAI/GnRH from 60 to 72 h), P/AI was greater than the obtained with the conventional protocol using estradiol cypionate [5]. Furthermore P/AI were reported to be higher when GnRH/FTAI was performed at 48 h, compared to 72 h in heifers treated with the J-Synch protocol and eCG [33]. The current study contributes with explanatory findings related to ovarian function and uterine environment, supporting the convenience of extending proestrus length in FTAI protocols in beef cattle.

The administration of eCG improved P/AI when FTAI was performed at 72 h after progesterone device removal. The greater P/AI induced by the eCG treatment was not influenced by the ovarian status. The difference between eCG-treated and no treated heifers was maintained in cycling and in anestrous animals (*i.e.*, with or without CL at device insertion). The improvement in terms of P/AI reported in several studies, many of them conducted in Uruguay, Argentina and Brazil under similar pasture rangeland conditions (reviewed by Bó and Mapletoft [13,30]), always associated to

conventional progesterone and estradiol-based protocols (7–8 d treatments), supports the use of this gonadotrophin in FTAI programs. The current results extend this practice to heifers subjected to prolonged proestrus protocols.

When administered to anestrous heifers, the treatment with eCG at device removal tended to improve postovulatory luteal function. Although this finding was not sought in the current study, similar results were reported previously in anestrous suckled beef cows [11,12,34] and embryo recipients [10]. Early regression of the CL following a progesterone and estradiol-based protocol in anestrous females was previously documented in postpartum anestrous suckling cows [12]. In that previous study, we demonstrated that even though progesterone and estradiol-based treatments are effective to induce ovulation in most of the anestrous females, some cows were not able to maintain luteal function after ovulation and return to anestrous. These cows showed an increase in progesterone concentrations during the early luteal phase, which fell to undetectable values from 7 to 14 days after ovulation. The same response was found in the current study in pre-pubertal heifers. Altogether, this information supports the idea that progesterone and estradiol

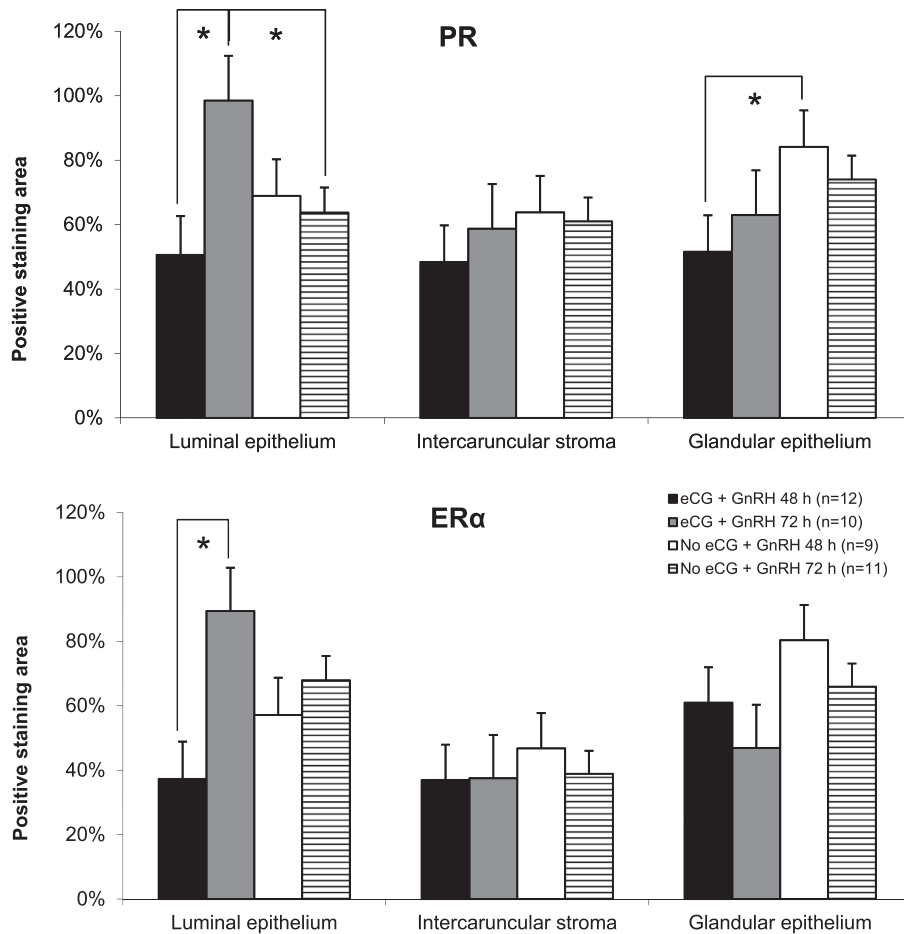


Fig. 7. Staining area of progesterone receptor (PR, upper panel) and estrogen receptor alpha (ER α , lower panel) in the luminal epithelium, intercaruncular stroma and glandular epithelium in the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. Samples were taken 6 d after ovulation by uterine biopsy from the cranial portion of the horn. Data are expressed as mean \pm SEM, and asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$).

are not always effective to overcome the anestrus in all the treated females. This study extends this notion to heifers and demonstrates that the addition of eCG at device removal improves the induction of cyclicity and contributes with the ability of the CL to maintain its function for the establishment of pregnancy. It has been shown that

treatment with eCG modified specific steroidogenesis-related features such as mitochondrial shape and the number of large luteal cells [35] and increased the expression of steroidogenic enzymes (P450 scc , 3 β -HSD and StAR) in the CL [36]. In the current study, the greater proportion of heifers bearing a competent CL in eCG treated

Table 3

Pregnancy rate obtained with eCG administration at onset of the proestrus (i.e., at intravaginal progesterone device removal) in a shortened progesterone/estradiol-based synchronization treatment (J-Synch protocol) with FTAI/GnRH at 60 h or 72 h after device removal in beef heifers. Main effects are shown in the upper panel, and according to interaction ($P < 0.05$) simple effects are shown in the lower panel.

	Treatment	Pregnant/FTAI	For different letters, $P < 0.05$
Main effects			
eCG treatment	With eCG	57.1% (739/1,295)	a
	No eCG	53.1% (692/1,303)	b
Timing of FTAI/GnRH	FTAI 60 h	57.0% (749/1,313)	a
	FTAI 72 h	53.1% (682/1,285)	b
Corpus luteum (CL) status	With CL	57.3% (937/1,636)	a
	No CL	51.4% (494/962)	b
Simple effects			
Interaction eCG x FTAI	eCG + FTAI 60 h	57.9% ^a (368/636)	a
	eCG + FTAI 72 h	56.3% ^a (371/659)	a
	No eCG + FTAI 60 h	56.3% ^a (381/677)	a
	No eCG + FTAI 72 h	49.7% ^b (311/626)	b

No interaction between CL status and eCG or FTAI/GnRH treatments was found ($P = \text{NS}$).

than untreated heifers (82.6% vs. 56.5%, respectively; $P = 0.054$), was influenced by greater induction of ovulation and lower proportion of early regressing CL. This finding explains, at least in part, the improvement in P/AI obtained with the use of eCG at device removal obtained in Experiment 2.

Regarding gene expression of sexual steroids, we found no differences among experimental groups, which is consistent with previous reports [37]. Besides it is known that estrogens during the follicular phase up-regulate both ER α and PR in uterus of most mammalian species [38], and progesterone during the luteal phase down-regulates them, it should be taken into account that mRNA expression not always reflect protein content [26]. Moreover, whole uterine biopsy was used to perform mRNA determinations while specific cell type sensitivity to steroids may differ. Indeed, the increased estradiol-17 β concentrations in the eCG treatment is related with the greater protein content of PR in eCG vs. no eCG when GnRH was administered at 72 h in luminal epithelium. Data is very consistent in showing the relevance of the time of GnRH administration in eCG treated heifers: more PR-positive and ER α -positive staining area were found in the luminal epithelium when GnRH was administered at 72 h compared with 48 h. These data are consistent with the greater E2 concentrations found in the 72 h and eCG treated heifers, and expand the idea that extending the proestrus length enhances the follicle's steroidogenic activity and estradiol concentrations [16,39] that may in consequence affect uterine functionality.

The prolonged proestrus induced by the J-Synch protocol is defined by the administration of GnRH from 60 to 72 h after device removal [4,5]. When eCG was administered at device removal in this prolonged proestrus protocol (Experiment 2), similar P/AI was obtained with FTAI performed at 60 or 72 h (~58 vs. 56%), a finding that confirms previous outcomes (~55 vs. 57%) reported by de la Mata [5]. According with these data, we suggest that the optimal proestrus length in *Bos taurus* heifers may be from 60 to 72 h, which has implications for practitioners applying this technology in commercial operations. From a practical perspective, adding eCG at device removal in the J-Synch protocol allows to perform FTAI from 60 to 72 h after device removal. This wide window for insemination enhances the possibilities of applying FTAI in big, extensively managed herds, since 400 or 500 females may be enrolled per day to receive insemination on Day 9. In this case, the progesterone intravaginal device should be removed in the late afternoon of Day 6 and FTAI is performed on Day 9 from early in the morning to late in the afternoon. Regarding the results obtained in eCG treated heifers, P/AI was similar between those females with FTAI in the morning or in the afternoon. On the other hand, for those small herds with few females, the time of insemination may be programmed as better convenience during Day 9, without affecting fertility. The success of FTAI technology and its growing adoption, is not only related to the acceptable pregnancy rate, but also because it is a user-friendly technology. These kinds of refinements represent a relevant improvement of this technology.

5. Conclusions

This study demonstrates the convenience of eCG administration at device removal and the extending proestrus length by delaying GnRH administration in a shortened progesterone and estradiol-based treatment (J-Synch protocol) in beef heifers. This strategy improves P/AI after FTAI, mainly by inducing greater postovulatory progesterone concentrations with greater proportion of heifers bearing a competent CL. In addition, eCG treatment is related with the greater protein content of PR in luminal epithelium when GnRH was administered at 72 h. These data expand the idea that extending the proestrus length enhances the follicle's steroidogenic

activity that may in consequence affect uterine functionality. FTAI may be performed in a wide period from 60 to 72 h after device removal/eCG administration, with practical implications for applying this technology in large-scale programs.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Credit authorship contribution statement

R. Núñez-Olivera: Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **F. Cuadro:** Data curation, Formal analysis. **D. Bosolasco:** Data curation, Formal analysis. **V. de Brun:** Data curation, Formal analysis. **J. de la Mata:** Data curation, Formal analysis. **C. Brochado:** Data curation, Formal analysis. **A. Meikle:** Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **G.A. Bó:** Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **A. Menchaca:** Data curation, Formal analysis, Writing - original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

The authors thank to Federico Rubio and Diego Rubio for providing animals and facilities, Reynaldo Bonino and Andrés Peñaricano for handling the animals, and Romina Artagaveytia for technical assistance throughout Experiment 1. This study was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, PR_FMV_3_2016_1_125451), Syntex Uruguay, Fundaciba and Fundación IRAUy.

References

- [1] Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 2008;69:843–51.
- [2] Day ML. State of the art of GnRH - based timed AI in beef cattle. *Anim Reprod* 2015;12:473–8.
- [3] Day ML, Mussard ML, Bridges GA, Burke CR. Controlling the dominant follicle in beef cattle to improve estrous synchronization and early embryonic development. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2010;67:405–19.
- [4] Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 2016;86:388–96.
- [5] de La Mata JJ, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Bosolasco D, De Brun V, Meikle A, Bó GA, Menchaca A. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* 2018;30:1541–52.
- [6] Bó GA, Huguenine E, de la Mata JJ, Núñez-Olivera R, Baruselli PS, Menchaca A. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Anim Reprod* 2018;15:952–62.
- [7] Murphy BD. Equine chorionic gonadotrophin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 2012;9:223–30.
- [8] Sheldon IM, Dobson H. Effect of administration of eCG to postpartum cows on folliculogenesis in the ovary ipsilateral to the previously gravid uterine horn and uterine involution. *J Reprod Fertil* 2000;119:157–63.
- [9] Pulley SL, Wallace LD, Mellieon HI, Stevenson JS. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 2013;79:127–34.
- [10] Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer program in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53–72.

- [11] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:479–86.
- [12] Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Bó G, Piaggio J, Menchaca A. Ovarian response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrus beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2014;146:111–6.
- [13] Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS, Menchaca A, Sartori R. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle 2018. *Anim Reprod* 2018;15:1003–14.
- [14] Menchaca A, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Bó GA. Pregnancy rates in beef heifers synchronized with a shortened oestradiol-based treatment that provides for a prolonged proestrus. *Reprod Fertil Dev* 2014;27:96.
- [15] Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod* 2011;85:144–56.
- [16] Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, Papa PC, Bressan FF, Meirelles FV, Silva LA, Nogueira GP, Membrive CMB, Binelli M. Manipulation of the periovulatory sex steroid milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology* 2014;81:861–9.
- [17] Mesquita FS, Ramos RS, Pugliesi G, Andrade SCS, Van Hoeck V, Langbeen A, Oliveira ML, Gonella-Díaz AM, Gasparin G, Fukumasu H, Pulz LH, Membrive CMB, Coutinho LL, Binelli M. The Receptive Endometrial transcriptomic signature indicates an earlier shift from proliferation to metabolism at early diestrus in the cow. *Biol Reprod* 2015;93:1–12.
- [18] Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res* 2012;349:649–64.
- [19] Binelli M, Pugliesi G, de Oliveira Santana Batista E, Martins T, Lopes E, Sponchiado M, Gonella-Díaz A, Oliveira M, Rodríguez 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 Belo Horiz* 2017;41:121–9.
- [20] Spencer TE, Forde N, Lonergan P. Insights into conceptus elongation and establishment of pregnancy in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2017;29:84–100.
- [21] Vizcarra JA, Wettemann RP. Reproducibility, repeatability, and degree of expertise required to assess body condition score in beef cattle. *Prof Anim Sci* 1996;12:28–31.
- [22] Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrus cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004;87:905–20.
- [23] Meikle A, Tasende C, Rodríguez M, Garófalo EG. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 1997;48:1105–13.
- [24] Rutledge RG, Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 2003;31:93.
- [25] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:16–21.
- [26] Meikle A, Forsberg M, Sahlin L, Masironi B, Tasende C, Rodríguez-Pinon M, Garófalo EG. A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reprod Nutr Dev* 2000;40:283–93.
- [27] Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolomé J, Santos JEP. Regulation of embryo survival in cattle. *Reprod Suppl* 2003;61:253–66.
- [28] Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1996;44:11–21.
- [29] Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat 2019. <http://www.infostat.com.ar>.
- [30] Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Maraña D, Baruselli PS. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:223–36.
- [31] Lonergan P, Forde N, Spencer T. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:66–74.
- [32] Sá Filho MF, Gonella-Díaz AM, Sponchiado M, Mendanha MF, Pugliesi G, dos Santos Ramos R, da Silva Andrade SC, Gasparin G, Coutinho LL, Goissis MD, Mesquita FS, Baruselli PS, Binelli M. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrus beef cows. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;8:1–14.
- [33] Núñez-Olivera R, Bó GA, Menchaca A. Association between proestrus length, preovulatory follicular diameter, estrus behavior and pregnancy rate in progesterone-estradiol based treatment J-Synch for FTAI in Bos taurus beef heifers. In: Proc 18th int congr anim reprod (ICAR) tours. vol. 477. Fr Elsevier; 2016. p. 477 (Abstract).
- [34] Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Maraña D, Baruselli PS. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:223–36.
- [35] Rigoglio NN, Fátima LA, Hanassaka JY, Pinto GL, Machado ASD, Gimenes LU, Baruselli PS, Rennó FP, Moura CEB, Watanabe IS, Papa PC. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 2013;79:673–9.
- [36] Fátima LA, Baruselli PS, Gimenes LU, Binelli M, Rennó FP, Murphy BD, Papa PC. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:998–1011.
- [37] Robinson RS, Mann GE, Lammung GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 2001;122:965–79.
- [38] Ing NH, Belen Tornos M. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 1997;56:1205–15.
- [39] Bridges GA, Mussard ML, Helsler LA, Day ML. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology* 2014;81:632–8.
- [40] Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Vázquez MI, Fernández-Foren A, Talmon M, Forcada F, Meikle A. Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reprod Fertil Dev* 2009;21:869–81.
- [41] Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, Avallé MP, Rosenfeld CS, Hearne LB, Roberts RM. Effect of interferon- τ administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology* 2006;147:2127–37.
- [42] Carriquiry M, Weber WJ, Fahrenkrug SC, Crooker BA. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J Dairy Sci* 2009;92:4889–900.

ANEXO III



Association between length of proestrus, follicular size, estrus behavior, and pregnancy rate in beef heifers subjected to fixed–time artificial insemination

R. Núñez–Olivera ^{a, b}, G.A. Bó ^{c, d}, A. Menchaca ^{a, e, *}

^a Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay

^b Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^c Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina

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

^e Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2021

Received in revised form

22 December 2021

Accepted 25 December 2021

Available online 31 December 2021

Keywords:

Follicle

Ultrasonography

Ovulation

Timed artificial insemination

ABSTRACT

This study evaluated the relationship between proestrus length and follicular size, estrous behavior, and pregnancy rate in *Bos taurus* beef heifers subjected to fixed–time artificial insemination (FTAI). A total of 911 heifers received a synchronization treatment protocol for FTAI (J–Synch) consisting of an intravaginal progesterone device for 6 d, estradiol benzoate at the time of device insertion cloprostenol sodium and eCG at device removal and GnRH at the time of FTAI. The presence or absence of a corpus luteum (CL) was determined by ultrasonography at device insertion and all heifers were tail painted at device removal for estrus detection at the time of FTAI. For the establishment of different periods of proestrus length (i.e., interval from device removal to FTAI), GnRH was administered i.m. at 48 h ($n = 308$), 60 h ($n = 290$) or 72 h ($n = 313$) after device removal. The diameter of the largest follicle at the time of GnRH administration was determined by ultrasonography, expression of estrous was determined by percentage of tail paint removal, and FTAI was performed at the time of GnRH administration in all heifers. The diameter of the largest follicle was greater when GnRH/FTAI was performed at 72 or 60 h (12.9 ± 0.2 mm and 12.8 ± 0.1 mm, respectively) than at 48 h (12.2 ± 0.1 mm, $P < 0.05$). The proportion of heifers in estrus tended to be greater when GnRH/FTAI was performed at 72 h (77.0%, 137/178) than at 48 h (68.2%, 122/179; $P = 0.06$), and intermediate at 60 h (71.4%, 120/168). Pregnancy rate tended to be greater in heifers with the longest (72 h: 70.0%, 219/313) than the shortest (48 h: 63.6%, 196/308; $P < 0.1$) proestrus length, while 60 h proestrus length was intermediate (63.1%, 183/290; $P = \text{NS}$). Pregnancy rate was affected by the presence of a CL at device insertion (71.3%, 352/494 in heifers with a CL, vs. 59.0%, 246/417 for those without a CL; $P < 0.01$). For those heifers bearing a CL, pregnancy rate was greater in heifers with a 72 h proestrus length (77.0%, 134/174) than with 48 or 60 h proestrus length (67.7%, 107/158 and 68.5%, 111/162; respectively; $P < 0.05$). In heifers without a CL, proestrus length did not affect pregnancy rate. In summary, extending proestrus length by delaying the interval from device removal to GnRH/FTAI from 48 to 72 h, was associated with a greater diameter of the preovulatory follicle, greater proportion of heifers expressing estrus at the time of FTAI, and greater pregnancy rate in cycling beef heifers.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Although fixed–time artificial insemination (FTAI) in cattle has become applied worldwide, pregnancy rates remain around 50%

likely due to a high proportion of the embryos failing to establish a pregnancy during the first month of gestation [1–3]. This failure has been reported to be influenced by several factors including the length of proestrus, defined as the interval from luteolysis to the onset of estrus [4–8]. In FTAI programs, proestrus is defined as the interval between progesterone (P4) device removal and the administration of GnRH [4]. Proestrus length has been reported to be associated positively with preovulatory estradiol concentrations

* Corresponding author. Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay.

E-mail address: menchaca.alejo@gmail.com (A. Menchaca).

which are necessary for uterine programming, early embryo development and postovulatory progesterone concentrations, promoting the establishment of pregnancy [5,9,10]. Before ovulation, the function of estradiol is related to a number of physiological processes including proliferation of follicular cells, oocyte maturation, transport of gametes and preparation of the uterine environment to support embryo development [11,12].

New strategies in estrus synchronization protocols have been developed to extend the length of proestrus to promote increased preovulatory estradiol concentrations and improve fertility [6,8]. The mechanisms through which manipulations of the prolonged proestrus increase fertility are still being elucidated. The relationship between length of proestrus and estradiol concentrations has also been shown to be related to follicular size and expression of estrus. When the proestrus length was prolonged, the preovulatory follicle achieved a larger size prior to ovulation and this was associated with greater fertility [6]. In addition, estradiol concentrations were greater in females that exhibited estrus, which was associated positively with greater pregnancy success compared with those that did not exhibit estrus [13–17].

Pregnancy rates have been reported to be improved in estradiol/progesterone FTAI programs by utilizing the J–Synch protocol [8]. The J–Synch protocol involves the administration of 2 mg of estradiol benzoate (EB) at the time of insertion of a progesterone device that is removed 6 d later. A single dose of PGF_{2α} is administered at device removal, and GnRH is administered at the time of FTAI, 72 h later (Day 9). In conventional 7- or 8-day estradiol/progesterone-based protocols, estradiol cypionate is often administered at the time of device removal and FTAI is performed 48 h later (*i.e.*, short proestrus). It has been reported that the J–Synch protocol induces greater growth rate of the ovulatory follicle during the interval from device removal to ovulation, greater postovulatory progesterone concentrations, improved uterine function and a greater pregnancy rates compared to conventional protocols [8]. The J–Synch protocol has two important modifications as compared to conventional estradiol/progesterone-based protocols; a prolonged proestrus and the substitution of the estradiol cypionate at progesterone device removal by the administration of GnRH 72 h later, but it remains unclear which of these two modifications affected pregnancy rates.

The objectives of this study were to investigate the effect(s) of different proestrus lengths between 48 and 72 h, on preovulatory follicular diameter, estrus expression at FTAI and pregnancy rate by using GnRH to induce ovulation in beef heifers. We hypothesized that extending the length of proestrus in a 6–day estradiol/progesterone-based treatment protocol promotes preovulatory follicle growth and improves fertility in *Bos taurus* beef heifers.

2. Materials and methods

2.1. Animals and management

The experiment was conducted during the spring breeding season (November–February, 33°S, Uruguay). A total of 911 two–year–old Angus and Hereford heifers, with a body condition score (BCS; mean ± SEM) of 4.5 ± 0.1 (scale 1 to 8; 1 = emaciated and 8 = obese; [18]) belonging to two locations were used. The herds enrolled in the study were similarly managed, grazing native pastures on crystalline–based soil with unrestricted access to water and mineral supplement. This study was performed in accordance with appropriate ethics and standard operating procedures including injections, handling and use of animals, under the approval by the Ethical Committee on Animal Experimentation of Fundación IRAUy (N° 001–2014) and which is in accordance with the guidelines of the National Council of Animal Care (CNEA) of Uruguay.

2.2. Experimental design

The study was conducted in four replicates in which all heifers were examined by ultrasonography to determine the presence or absence of a corpus luteum (CL) at the beginning of treatments (Day 0). The heifers received an intravaginal device containing 0.5 g of progesterone (DIB 0.5, Zoetis, Buenos Aires, Argentina) for 6 d with 2 mg of EB (Gonadiol, Zoetis) administered intramuscularly (*i.m.*) at the time of device insertion. At the time of progesterone device removal (Day 6), all heifers received 500 µg *i.m.* of cloprostenol sodium (Ciclase DL, Zoetis) and 300 IU *i.m.* of eCG (Novormon, Zoetis). To establish the different lengths of proestrus, 100 µg *i.m.* of gonadorelin acetate (GnRH; Gonasyn GDR, Zoetis) was administered at 48 h (Day 8 in the morning; *n* = 308), 60 h (Day 8 in the afternoon; *n* = 290) or 72 h (Day 9 in the morning; *n* = 313) after device removal. Within replicates, heifers were randomly assigned to each experimental group blocked by the presence or absence of a CL and BCS. Fixed–time artificial insemination was performed by two experienced technicians using frozen–thawed semen from one of two bulls per replicate, which were assigned equally to each experimental group. In three of four replicates (*n* = 525), heifers were tail–painted for mounting activity detection (CeloTest, Phibro, Buenos Aires, Argentina) at the time of device removal and estrus expression was recorded at the time of FTAI. All heifers with >30% of the tail paint rubbed off were considered in estrus. The diameter of the preovulatory follicle was determined at the time of FTAI by ultrasonography using a B–Mode ultrasound scanner with a linear–array transducer (7.5 MHz, WED–9618 V Well.D, Shenzhen, China). Examinations of both ovaries were carried out by the same operator and the largest (*i.e.*, preovulatory) follicle was measured using an internal electronic caliper, video recorded, and registered on an individual datasheet. For each follicle, two images were measured at its maximum diameters (width and height) and the average was considered for statistical analysis. Pregnancy diagnosis was determined by ultrasonography 30–33 d after FTAI in all replicates. The experimental design is depicted in Fig. 1.

2.3. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using InfoStat software [19]. The generalized linear mixed models (GLMM) included the animals as a random variable and the treatments as fixed variables. Data were examined for normality and homogeneity of variance by histograms, q–q plots, and formal statistical tests as part of the univariate procedure. The type of variance–covariance structures was chosen depending on the magnitude of the Akaike information criterion (AIC) for models run under heterogeneous compound symmetry, unstructured, autoregressive, spatial power, and first–order ante–dependence. The model with the lowest AIC was chosen. Both Pearson's and partial correlation coefficients were used to describe the relationships between variables. The logistic procedure was used to generate the regression model and determine the intercept and slopes values according to maximum likelihood estimates for each significant continuous order effect. Probabilities were determined according to the following equation: Probability = (e^{logistic equation})/(1 + e^{logistic equation}). Logistic regression curves were constructed according to the coefficients provided by the interactive data analyses from InfoStat software. Polynomial regression was used to select the statistical models according to the significance of the regression coefficients (*P* < 0.05) and by the relation with the coefficient of determination (*R*²). Regression analysis was used to determine the nature of the relationship between each measurement influenced by pregnancy, or occurrence of estrus — linear, quadratic, or cubic. Pregnancy rate was analyzed using logistic regression in GLMM including the effect of the

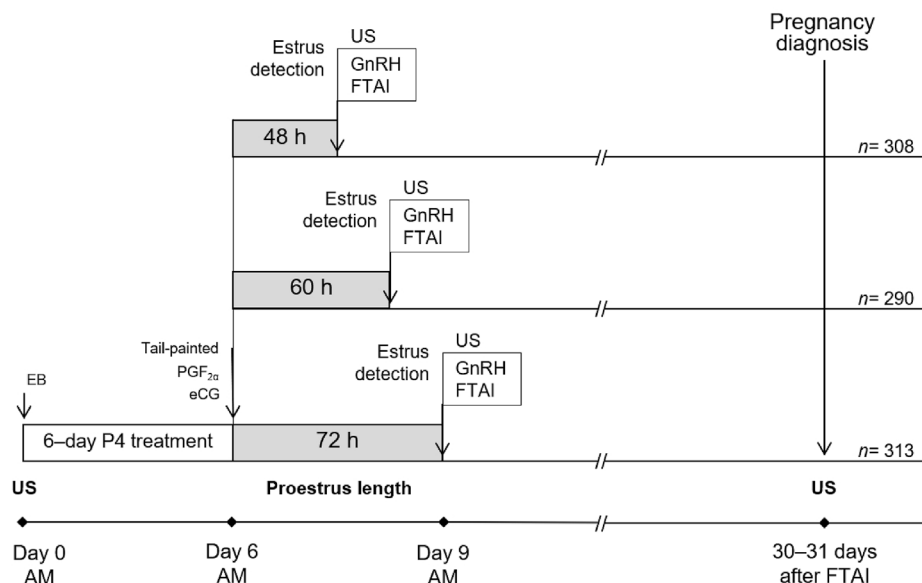


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design to study the effect of the proestrus length prior to fixed-time artificial insemination (FTAI) after a 6-day estradiol/progesterone-based treatment protocol (J-Synch) in beef heifers. Different proestrus lengths were induced by GnRH administration at the time of FTAI 48 h, 60 h or 72 h after progesterone (P4) device removal. GnRH: gonadorelin acetate, 100 µg i.m.; EB: estradiol benzoate, 2 mg i.m.; P4 treatment: intravaginal silicone device containing 0.5 g of progesterone; PGF_{2α}: cloprostenol sodium, 500 µg i.m.; eCG: equine chorionic gonadotropin, 300 IU i.m.; Estrus detection: determined at the time of FTAI by the observation of >30% tail-paint removal; US: ultrasonography examination.

treatments (time of GnRH/FTAI at 48, 60 or 72 h after progesterone device removal), the presence/absence of a CL at device insertion, expression of estrus (i.e., estrus or not estrus), as fixed effects, and their interactions. The replicate, animal identification, inseminator, bull, and semen batch were included as random effects. Adjusted risk (odds ratios) and 95% confidence intervals (CI) were generated during the logistic regression (final model) to estimate the relative pregnancy rate. Data are presented as mean ± SEM and statistical significance was defined at $P < 0.05$, with tendencies when $P < 0.10$.

3. Results

The diameter of the largest follicle at the time of GnRH/FTAI was greater in heifers with a 72 h or 60 h proestrus length ($P < 0.05$) than with a 48 h proestrus length (Table 1). A descriptive histogram of the frequency of different follicular sizes is shown in Fig. 2. The diameter most frequently found in heifers with GnRH/FTAI at 48 h was 12.0 mm (27% of the heifers), at 60 h was 13.0 mm (24%), and at 72 h was 14.0 mm (22%). Estrus expression at FTAI tended to be greater when GnRH/FTAI was performed at 72 h ($P < 0.1$) compared to 48 or 60 h after progesterone device removal (Table 1). In a proportion of heifers (19/178), no large follicle (i.e., >8 mm in diameter) was detected at GnRH/FTAI, but 68.4% (13/19) were pregnant 30 d after FTAI. We assumed that all may have ovulated before administration of GnRH, because the tail-paint was rubbed off, indicating they had expressed estrus. This finding was greater

in heifers in which GnRH/FTAI was performed at 72 h than at 48 or 60 h ($P < 0.05$; Table 1). A positive correlation between the diameter of the largest follicle ($r_{part} = 0.12$) and estrus expression ($r_{part} = 0.28$) was found, which was associated positively with P/AI ($r = 0.30$; $P < 0.01$). Pregnancy rate tended to be greater in heifers in which GnRH/FTAI was performed at 72 h ($P < 0.1$) compared to 48 or 60 h after progesterone device removal (Table 1). Indeed, the probability of conceiving tended to increase 1.07-fold when the heifers were treated with GnRH/FTAI at 72 h compared to 48 h ($P < 0.1$; Table 2). The presence of a CL at device insertion and the expression of estrus behavior increased the probability of pregnancy ($P < 0.05$; Table 2).

At the beginning of the progesterone treatment, a CL was detected in 54.2% of the heifers (494/911). Neither the diameter of the largest follicle at the time of FTAI, nor the expression of estrus were affected by the presence of a CL at the beginning of the synchronization treatment ($P = NS$). A positive relationship was found between estrus expression at FTAI and follicular diameter; the probability of estrus expression increased as follicular diameter increased (Fig. 3, left panel). In addition, the probability of pregnancy was associated positively with the diameter of the largest follicle at FTAI in the 48 h proestrus length group ($P < 0.05$), but not in the 60 and 72 h proestrus length groups (Fig. 3, right panel).

Pregnancy rate was affected by the presence of a CL at the time of device insertion (71.3%, 352/494 vs. 59.0%, 246/417; $P < 0.01$), and a tendency ($P < 0.1$) was observed in the interaction between

Table 1

Effect of different proestrus lengths^a on size of the preovulatory follicle, estrus expression, and pregnancy rate in a 6-day estradiol/progesterone-based synchronization treatment protocol for FTAI (J-Synch) in beef heifers.

Proestrus length ^a	Diameter of the preovulatory follicle at FTAI (mm)	Heifers in estrus at FTAI	Heifers ovulated at FTAI	Pregnancy rate
GnRH/FTAI 48 h	12.2 ± 0.1 ^a	68.2% (122/179) ^c	1.7% (3/179) ^a	63.6% (196/308) ^c
GnRH/FTAI 60 h	12.8 ± 0.1 ^b	71.4% (120/168) ^{cd}	1.2% (2/168) ^a	63.1% (183/290) ^{cd}
GnRH/FTAI 72 h	12.9 ± 0.2 ^b	77.0% (137/178) ^d	10.7% (19/178) ^b	70.0% (219/313) ^d

Different superscripts represent statistical significance within each column: a vs. b, $P < 0.05$; c vs. d, $P < 0.1$.

^a Interval from progesterone device removal to GnRH/FTAI.

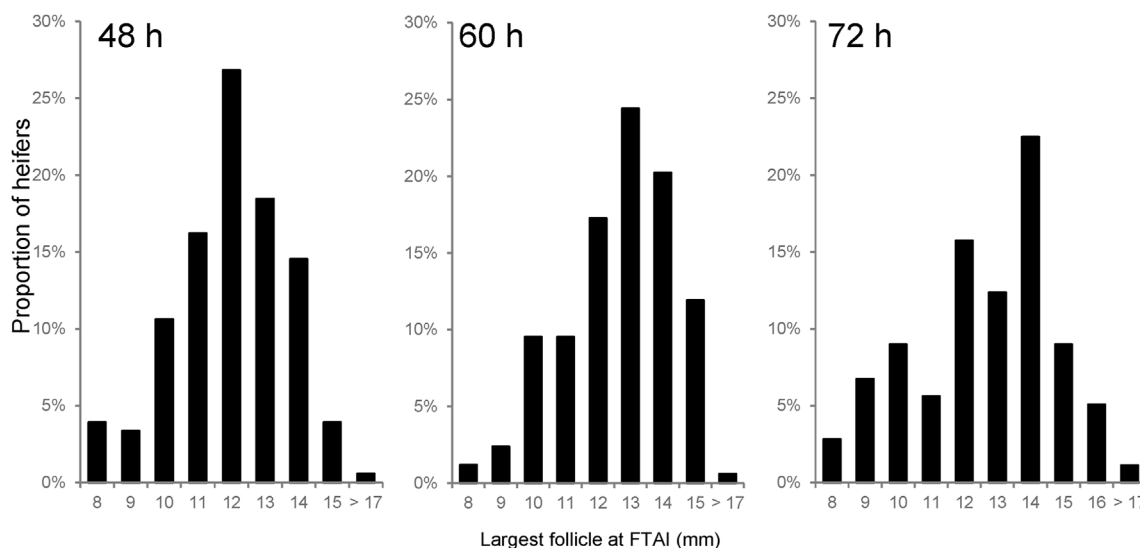


Fig. 2. Descriptive representation of the effect of the proestrus length (i.e., interval from P4 device removal to GnRH/FTAI) on diameter of the largest follicle at the time of fixed–time artificial insemination (FTAI) in beef heifers. The modal value of the diameter of the preovulatory follicle changed from 12.0 mm to 14.0 mm when the proestrus length was extended from 48 to 72 h, and the median diameter was 12.0 mm in those heifers that FTAI was performed at 48 h, and 13.0 mm in those heifers that FTAI were performed at 60 h or 72 h, respectively.

presence of CL, proestrus length, and estrus expression at FTAI. For this reason, pregnancy rates in the three experimental groups are shown separately for heifers with a CL or not bearing a CL at the time of progesterone device insertion (Fig. 4). In those bearing a CL at device insertion, pregnancy rate was greater when GnRH/FTAI was performed at 72 h ($P < 0.05$) than at 48 or 60 h (Fig. 4). In heifers without a CL at the time of device insertion, pregnancy rate did not differ among groups ($P = NS$). When results were analyzed in relation to estrus expression at the time of FTAI, pregnancy rate was greater in heifers that were in estrus compared to heifers not in estrus (63.9%, 242/379 vs. 45.9%, 67/146; $P < 0.01$). In heifers that showed signs of estrus, a greater pregnancy rate was obtained when GnRH/FTAI was performed at 72 h than at 60 h ($P < 0.05$), while it was intermediate at 48 h (Fig. 5). Conversely, pregnancy rate did not differ among groups ($P = NS$) when heifers did not show signs of estrus.

4. Discussion

The current study demonstrates that extending the length of proestrus from 48 to 72 h in a 6–day estradiol/progesterone–based synchronization protocol resulted in a greater ovulatory follicle size, with a greater proportion of heifers exhibiting estrus and an improved pregnancy rate in cycling beef heifers inseminated at a

Table 2
Probability of pregnancy in beef heifers with different proestrus lengths prior to FTAI following treatment with a 6–day estradiol/progesterone–based synchronization protocol (J–Synch). Main effects are shown in the lower panel.

Group	Adjusted Risk	(CI 95%)		P–value
		Inferior	Superior	
GnRH/FTAI 48 h	Reference	–	–	–
GnRH/FTAI 60 h	0.66	0.42	1.03	0.13
GnRH/FTAI 72 h	1.07	0.68	1.69	0.07
Main effects				
No CL	Reference	–	–	–
With CL	1.46	1.01	2.13	0.05
No estrus	Reference	–	–	–
With estrus	1.72	1.14	2.60	0.01

fixed–time. Overall results show a positive association between proestrus length, ovulatory follicle size, estrus expression and fertility in *Bos taurus* beef heifers.

The relationship between follicle diameter and pregnancy rates found in the 48 h proestrus length group is supported by previous reports. The induction of ovulation of small follicles resulted in decreased pregnancy rates and increased pregnancy losses in beef cattle [20–22]. Moreover, premature ovulation of a dominant follicle induced with GnRH reduced the diameter at ovulation, decreasing the subsequent luteal function and fertility [9,23]. In contrast, ovulation of larger follicles resulted in improved fertility [24,25], an effect that was associated with elevated circulating estradiol close to the time of insemination. Although a significant correlation between probability of pregnancy and follicular size was found only in the 48 h proestrus length group, but not in 60 and 72 h groups, follicular size increased as the proestrus length increased; modal follicular diameters were 12 mm for the 48 h, 13 mm for the 60 h, and 14 mm for the 72 h proestrus length groups. We suggest that strategies which promote preovulatory follicular growth (e.g., by prolonging the proestrus length) should be pursued in FTAI protocols.

In this study all heifers received one dose of eCG at progesterone device removal. Administration of FSH/LH–like gonadotropins induce final follicular growth and maturation, resulting in increased secretion of estradiol (reviewed by Allrich [26]). Furthermore, treatment with eCG has been reported to improve pregnancy rate in heifers synchronized with the J–Synch protocol [27]. Overall, these findings support the consideration of those strategies that promote the growth and maturation of the pre-ovulatory dominant follicle increase pregnancy rates following FTAI in beef heifers.

The presence of a larger follicle at the time of insemination was associated with a greater occurrence of estrus. In heifers with a 72 h proestrus, follicular size was larger, and the proportion of heifers expressing estrus was significantly greater than with a 48 h proestrus. These results agree with those of previous studies that have shown a positive association between expression of estrus at the time of FTAI and ovulation and pregnancy rates [16,17,28–31]. Furthermore, studies performed in fixed–time embryo transfer

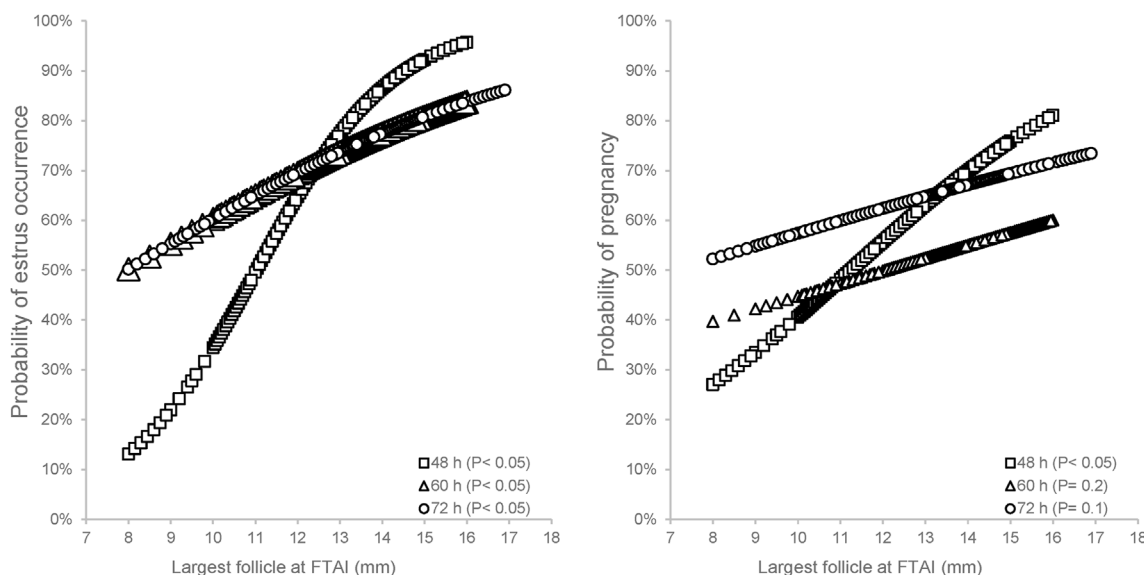


Fig. 3. Probability of occurrence of estrus (left panel) and probability of pregnancy (right panel) according to the diameter of the largest follicle at the time of FTAI in beef heifers subjected to different proestrus lengths (i.e., interval from P4 device removal to GnRH/FTAI: 48 h, 60 h or 72 h).

programs have confirmed that the expression of estrus before ovulation had a positive effect on pregnancy rate [32,33]. Cows that exhibit estrus had longer conceptuses on Day 19 of gestation, a greater chance of embryo survival and improved pregnancy rates [34]. In addition, maintenance of pregnancy seems to be improved by estrus expression before ovulation, since lower embryonic/fetal losses after 30 d of gestation and greater calving rates were observed in recipients that exhibited estrus before ovulation [32]. A positive relationship has also been shown to exist between follicle diameter, estrus expression and preovulatory serum estradiol

concentrations [16,24]. Estradiol production during proestrus has a positive effect on the subsequent luteal phase, the uterine environment, and embryo development [35,36]. Preovulatory estradiol concentrations appear to be critical for programming the uterine environment to receive the embryo prior to maternal recognition of pregnancy [7,16]. Therefore, the lower pregnancy rate observed in heifers induced to ovulate early (e.g., GnRH at 48 h) without expression of estrus, suggests that additional time for final follicular maturation is needed for uterine exposure to high estradiol concentrations. In addition, the positive relationship found

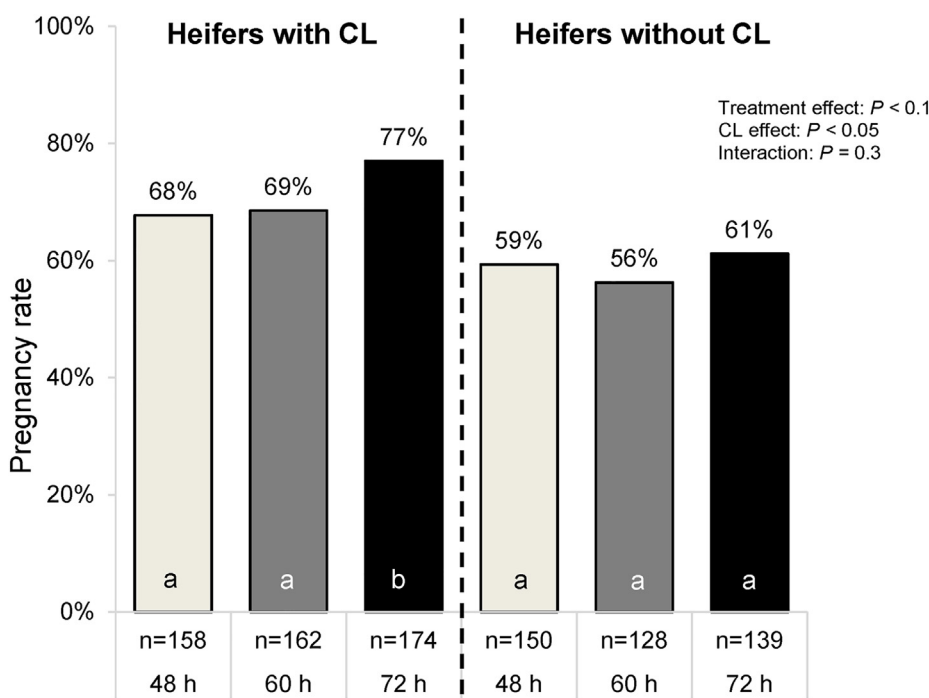


Fig. 4. Pregnancy rate obtained with different proestrus lengths (i.e., interval from progesterone device removal to GnRH/FTAI) in heifers with a corpus luteum (CL; left panel) and without a CL (right panel) synchronized with a 6-day estradiol/progesterone-based treatment protocol for FTAI (J-Synch). ^{ab} denotes differences (P < 0.05) in pregnancy rates for heifers with or without a CL.

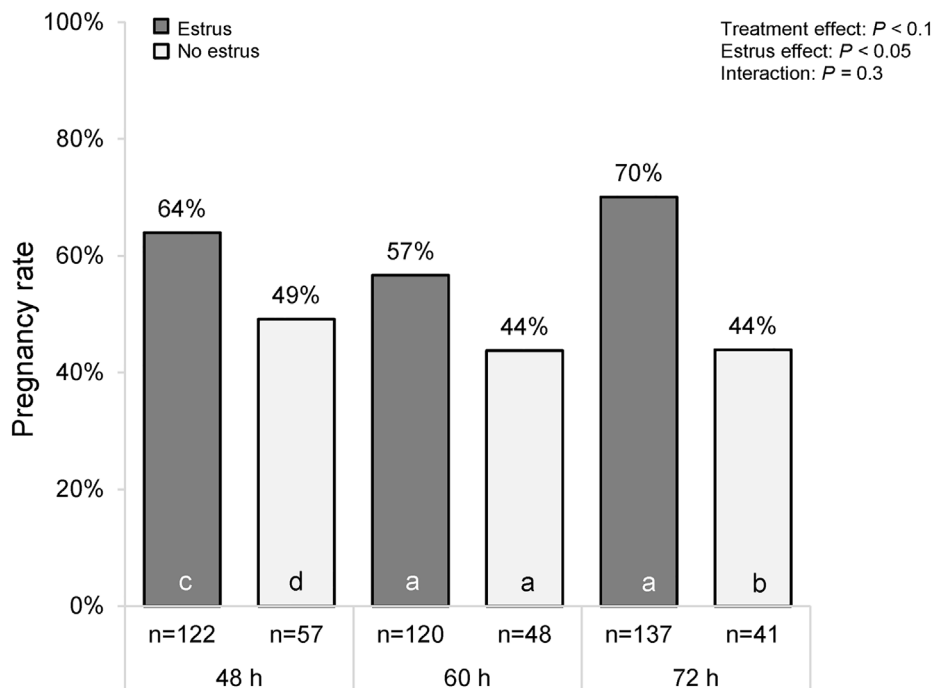


Fig. 5. Pregnancy rate obtained with different proestrus lengths (*i.e.*, interval from P4 device removal to GnRH/FTAI) in heifers that were synchronized with a 6-day estradiol/progesterone–based treatment protocol (J–Synch) that expressed or did not express estrus based on the percentage of tail-paint removal at the time of FTAI (a vs. b, $P < 0.05$; c vs. d, $P < 0.1$).

between pregnancy rate and preovulatory follicular diameter was significant in the shorter proestrus length (Fig. 3), which was overcome, at least in part, when the proestrus length was extended to 72 h. These findings further support the importance of prolonging the window between progesterone device removal and GnRH administration.

Since evidence indicates that increasing the interval from device removal until ovulation benefits fertility, novel strategies to prolong proestrus length have been proposed and implemented with success. The protocols for extending the proestrus length are classified into GnRH/progesterone–based [4] or estradiol/progesterone–based protocols [8]. In GnRH/progesterone–based protocols, it has been reported that reducing the exposure time of the progesterone device from 7 to 5 d and prolonging the interval from progesterone device removal to GnRH/FTAI (*i.e.*, 5 d Co–Synch protocol), increases exposure to elevated circulating estradiol concentrations prior to ovulation, improving pregnancy rates in cows and heifers [4,37,38]. In estradiol/progesterone–based protocols, the J–Synch protocol also improved pregnancy rate in heifers by reducing the progesterone exposure from 8 d to 6 d and prolonging the proestrus from 48 h to 72 h [8]. Although the J–Synch protocol induced greater pregnancy rates than the conventional estradiol/progesterone protocols, it was difficult to determine if the reason for such improvement was due to the lengthening of the proestrus period or the replacement of estradiol cypionate with GnRH to induce ovulation. In the current experiment, all heifers received GnRH and the treatment at 72 h post-device removal resulted in an improved pregnancy rate. Thus, we conclude that the longer proestrus length improved fertility.

5. Conclusions

Extending the proestrus length from 48 to 72 h in a 6–d estradiol/progesterone–based treatment increases the diameter of the largest follicle present at GnRH/FTAI, enhances estrus

expression, and improves pregnancy rate in cycling heifers. These results support the recommendation of applying protocols that result in an extended proestrus length in FTAI programs in *Bos taurus* beef heifers.

CRediT authorship contribution statement

R. Núñez–Olivera: Conceived and designed the analysis, Collected the data, Contributed data or analysis tools, Formal analysis, Writing – original draft. **G.A. Bó:** Conceived and designed the analysis, Contributed data or analysis tools, Formal analysis, Writing – original draft. **A. Menchaca:** Conceived and designed the analysis, Contributed data or analysis tools, Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition and Supervision, Other contribution.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as influencing the impartiality of the research.

Acknowledgments

The authors thank Reuben J. Mapletoft for his criticism and assistance in revising the MS. This study was supported by *Agencia Nacional de Investigación e Innovación* (ANII, PR_FMV_3_2016_1_125451), Syntex Uruguay, Fundaciba and Fundación IRAUy; and Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONCYT PICT 2017–4550) of Argentina. RNO and AM are fellows of *Sistema Nacional de Investigadores* (SNI) of Uruguay.

References

- [1] Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008;43:260–7.

- [2] Bó GA, Huguenine E, de la Mata JJ, Núñez-Olivera R, Baruselli PS, Menchaca A. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Anim Reprod* 2018;15:952–62.
- [3] Campanile G, Baruselli PS, Limone A, D'Occhio MJ. Local action of cytokines and immune cells in communication between the conceptus and uterus during the critical period of early embryo development, attachment and implantation – implications for embryo survival in cattle: a review. *Theriogenology* 2021;167:1–12.
- [4] Bridges GA, Helsler LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF_{2α} from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 2008;69:843–51.
- [5] Bridges GA, Mussard ML, Pate JL, Ott TL, Hansen TR, Day ML. Impact of pre-ovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim Reprod Sci* 2012;133:16–26.
- [6] Day ML. State of the art of GnRH - based timed AI in beef cattle. *Anim Reprod* 2015;12:473–8.
- [7] 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 Belo Horiz* 2017;41:121–9.
- [8] de La Mata JJ, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Bosolasco D, de Brun V, Meikle A, Bó GA, Menchaca A. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* 2018;30:1541–52.
- [9] Dadarwal D, Mapletoft RJ, Adams GP, Pfeifer LFM, Creelman C, Singh J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2013;79:859–66.
- [10] Mesquita FS, Ramos RS, Pugliesi G, Andrade SCS, Van Hoek V, Langbeen A, Oliveira ML, Gonella-Diaza AM, Gasparin G, Fukumasu H, Pulz LH, Membrive CM, Coutinho LL, Binelli M. The receptive rnodometrial transcriptomic signature indicates an earlier shift from proliferation to metabolism at early diestrus in the cow. *Biol Reprod* 2015;93:1–12.
- [11] Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res* 2012;349:649–64.
- [12] Ciernia LA, Perry GA, Smith MF, Rich JJ, Northrop EJ, Perkins SD, Green JA, Zezeski AL, Geary TW. Effect of estradiol preceding and progesterone subsequent to ovulation on proportion of postpartum beef cows pregnant. *Anim Reprod Sci* 2021;227:106723.
- [13] Larimore EL, Amundson OL, Bird SL, Funnell BJ, Kruse SG, Bridges GA, Perry GA. Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *J Anim Sci* 2015;93:2806–12.
- [14] Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5268–73.
- [15] Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci* 2007;85:684–9.
- [16] Perry GA, Cushman RA, Perry BL, Schiefelbein AK, Northrop EJ, Rich JJJ, Perkins SD. Role of preovulatory concentrations of estradiol on timing of conception and regulation of the uterine environment in beef cattle. *Syst Biol Reprod Med* 2020;66:12–25.
- [17] Cedeño AV, Cuervo R, Tribulo A, Tribulo R, Andrada S, Mapletoft R, Menchaca A, Bó GA. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. *Theriogenology* 2021;161:294–300.
- [18] Vizcarra JA, Wettemann RP. Reproducibility, repeatability, and degree of expertise required to assess body condition score in beef cattle. *Prof Anim Sci* 1996;12:28–31.
- [19] Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat versión. Argentina: Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba; 2020. URL, <http://www.infostat.com.ar>.*
- [20] Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F_{2α} for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 2001;79:2253–9.
- [21] Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5268–73.
- [22] Perry GA, Perry BL. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domest Anim Endocrinol* 2008;34:333–8.
- [23] Mussard ML, Burke CR, Behlke EJ, Gasser CL, Day ML. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci* 2007;85:937–43.
- [24] Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD, Cushman RA. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest Anim Endocrinol* 2014;48:15–20.
- [25] Rodrigues AD, Cooke RF, Cipriano RS, Silva LGT, Cerri RLA, Cruppe LH, Meneghetti M, Pohler KG, Vasconcelos JLM. Impacts of estrus expression and intensity during a timed-ai protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in bos indicus-influenced beef cows. *J Anim Sci* 2018;96:236–49.
- [26] Allrich RD. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 1994;77:2738–44.
- [27] Núñez-Olivera R, Cuadro F, Bosolasco D, de Brun V, de la Mata J, Brochado C, Meikle A, Bó GA, Menchaca A. Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time. *Theriogenology* 2020;151:16–27.
- [28] Sá Filho MF, Crespilh AM, Santos JEP, 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.
- [29] Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 2011;76:455–63.
- [30] Richardson BN, Hill SL, Stevenson JS, Djira GD, Perry GA. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. *Anim Reprod Sci* 2016;166:133–40.
- [31] Bó GA, Rogan DR, Mapletoft RJ. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: what we have learned. *Theriogenology* 2018;112:26–33.
- [32] Bó GA, Cedeño A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. *Anim Reprod* 2018;15:224–30.
- [33] Cedeño A, Tribulo A, Tribulo RJ, Andrada S, Mapletoft RJ, Bó GA. Effect of estrus expression or treatment with GnRH on pregnancies per embryo transfer and pregnancy losses in beef recipients synchronized with estradiol/progesterone-based protocols. *Theriogenology* 2020;157:378–87.
- [34] Davoodi S, Cooke RF, Fernandes ACC, Cappelozza BI, Vasconcelos JLM, Cerri RLA. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology* 2016;85:645–55.
- [35] Mann GE, Lamming GE. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Anim Reprod Sci* 2000;64:171–80.
- [36] Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:513–35.
- [37] Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci* 2010;117:208–15.
- [38] 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 five-day CO-Synch + controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology* 2012;77:1624–31.

ANEXO IV



Equine chorionic gonadotropin administration after insemination affects luteal function and pregnancy establishment in postpartum anestrous beef cows



R. Núñez-Olivera^a, T. de Castro^a, G.A. Bó^{b,c}, J. Piaggio^d, A. Menchaca^{a,*}

^a Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay

^b Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Córdoba, Argentina

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

^d Departamento de Bioestadística, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2017

Received in revised form 15 July 2017

Accepted 10 August 2017

Keywords:

Anestrus

PMSG

Gestation

Embryonic losses

Critical period

ABSTRACT

Two experiments were conducted with the aim of determining the effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration on day 14 after insemination on ovarian response and pregnancy establishment in postpartum anestrous beef cows. In both experiments, cows were subjected to a progesterone- and estradiol-based treatment for fixed-time artificial insemination (FTAI) and were randomly allocated into 4 groups to receive or not receive eCG (400 IU) at the time of device removal and/or at 14 d after FTAI. In experiment 1, from day 14 to 22, daily ultrasonographic determinations were performed to monitor ovarian dynamics, and blood was collected to determine hormone concentrations in 60 cows. In experiment 2, confirmation of pregnancy was performed at 30 and 60 d after FTAI in 1,060 anestrous cows assigned to the same experimental design. Cows that received eCG on day 14 after FTAI showed increases in corpus luteum area ($P < 0.01$), follicle diameter ($P < 0.05$), serum progesterone concentrations ($P < 0.01$), and estradiol-17 β concentrations ($P < 0.01$), compared with cows that did not receive eCG on day 14. Pregnancy rate on day 30 was greater in those cows that received both eCG treatments (ie, at device removal and 14 d after insemination) than in those that did not receive eCG treatment ($P < 0.05$). In conclusion, eCG administered on day 14 after FTAI increases serum progesterone concentrations during the critical period of pregnancy in anestrous cows, and this second eCG treatment seems to have a positive effect on achieving pregnancy.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Pregnancy failure is one of the main reasons for low reproductive efficiency in cows, causing serious economic loss. This is particularly true in seasonally calving herds, where it is often too late to rebreed after cows are determined not pregnant, thus resulting in increased culling rates [1]. Embryonic losses as high as 70%–80% in lactating dairy cattle [2,3] and 40%–60% in beef cattle [4,5] have been

reported within the first 3 wk of gestation. An important proportion of these losses in cattle occurs during the critical period of pregnancy, 15–17 d after fertilization [6]. Nutritional constraints, inadequate mating systems, hormonal imbalance (eg, progesterone insufficiency), and/or an inappropriate embryonic signal are the main factors implicated for embryo loss during this period [7]. The corpus luteum (CL) is the main source of progesterone, which is essential for the establishment and maintenance of pregnancy [8]. Therefore, any factor that affects CL function or its life span during early gestation will influence the pregnancy rate and reproductive efficiency in cattle.

* Corresponding author. Tel./fax: +59899687206.

E-mail address: menchaca.alejo@gmail.com (A. Menchaca).

During the early stages of gestation after fertilization, the embryo is responsible for its own survival. Blastocyst elongation, which occurs after hatching, is directly related to interferon-tau (IFN- τ) production by the trophoblast of the growing embryo [9], the latter of which represents the pregnancy recognition signal in ruminants [10]. A clear increase in IFN- τ production that is absolutely required for pregnancy establishment occurs around day 16 [11]. Evidence shows that the production of IFN- τ is positively associated with earlier serum progesterone concentrations [12], and progesterone supplementation during the first days after insemination induces greater IFN- τ production [13] and increases embryo growth before the critical period [14]. Many studies have attempted to improve pregnancy outcome by elevating progesterone after insemination, including treatments with exogenous progesterone or inducing accessory CL with GnRH or human chorionic gonadotropin [15,16]. However, these alternatives have not been successful because they do not provide sustained luteotrophic support and have had only a marginal influence in reducing embryonic losses [17,18].

An alternative to overcome early pregnancy failure in cattle would be to directly stimulate increased progesterone production by the CL. In that sense, preovulatory eCG administration on progesterone device removal in fixed-time artificial insemination (FTAI) treatments induces a larger CL, with greater progesterone concentrations during the following luteal phase in postpartum anestrous *Bos taurus* [19] and *Bos indicus* cows; [20]. Because eCG has been reported to have an FSH- and LH-type effect [21], the administration of this gonadotropin as a luteotrophic agent after ovulation could become a pharmacologic alternative to improve pregnancy outcome. This idea is supported in a previous field trial, in which 400-IU eCG was administered 14 d after FTAI in primiparous anestrous *B indicus* suckled cows, resulted in a greater pregnancy rate than that of eCG-untreated cows [22]. These promising results deserve further investigation because no information is available about the effect of eCG administered after insemination on luteal function in cattle.

The objective of this study was to determine the effect of eCG administration, both on device removal and on day 14 after insemination, on luteal and follicular response during the critical period of pregnancy in postpartum anestrous beef cattle. In addition, the effect of this treatment on pregnancy establishment and maintenance was also evaluated in a large-scale FTAI program.

2. Materials and methods

2.1. Animals and management

Two experiments were conducted during the spring breeding season of the Southern Hemisphere (November–January, 33°S, Uruguay) in multiparous suckling Hereford cows. All cows were scanned by ultrasonography to check the presence or absence of CL (cycling or anestrous cows, respectively) just before the beginning of treatments. In each experiment, cows were kept together, grazing on rangeland of crystalline-based soil with free access to water and mineral supplement. All experimental procedures

involving animals and including injections, intravaginal devices insertion, blood collection, and ovarian ultrasonography were approved by the Internal Animal Care Committee of Fundación IRAUy and certified by the National Council of Animal Care of Uruguay.

2.2. Experiment 1

The aim of this experiment was to evaluate the effect of eCG administration on ovarian function in anestrous cows on day 14 after insemination, associated or not associated with 1 dose of eCG on progesterone device removal. Multiparous suckled Hereford cows ($n = 60$) in anestrous with 60–75 d postpartum and BCS of 3.5 ± 0.1 (mean \pm standard error of the mean [SEM], 1–8 scale; 1 = emaciated and 8 = obese; [23]) were used. Anestrus was determined by absence of CL detected by 2 ultrasonography examinations 10 d apart, just before the beginning of synchronization treatment. The cows received a progesterone-releasing intravaginal silicone device containing 0.5 g of progesterone (DIB 0.5; Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) over 8 d and 1 dose of 2 mg of estradiol benzoate (Gonadiol; Syntex S.A.) administered intramuscularly [i.m.] at device insertion. One dose of 500 μ g of cloprostenol sodium (Ciclaste DL; Syntex S.A.) and 0.5 mg of estradiol cypionate (Cipiosyn; Syntex S.A.) were administered i.m. on device removal. Then, cows were divided into 4 groups to receive or not receive 400 IU of eCG (Novormon; Syntex S.A.) administered i.m. at device removal and/or 14 d after insemination, in a 2×2 factorial design. The cows were randomly allocated in each experimental group blocked by ovarian activity, BCS, and days postpartum. Fixed-time AI was performed 52–56 h after device removal (day 0) with frozen semen of a single series belonging to the same bull. In some FTAI programs in Uruguay, nose plates were placed on all calves to prevent suckling from the day of device insertion until insemination [24]. Pregnancy rate (pregnant/FTAI cows) was determined by ultrasonography 30 d after insemination.

2.3. Ultrasound examinations

Ovarian examinations were performed daily by transrectal ultrasonography using a B-mode ultrasound scanner with a linear-array transducer (7.5 MHz, WED-9618V Well.D, Shenzhen, China). Examinations were performed by the same operator from day 14 to day 22 after insemination. All follicles were greater than 3 mm in diameter, and the CL was measured using an internal electronic gauge, video recorded, and registered on an individual ovarian map for each cow. Two images of the largest follicle and the CL were measured at their maximum diameters. The width and height of the maximum cross-sectional area of the CL were measured to calculate the CL area ($\frac{1}{2}$ its width \times $\frac{1}{2}$ its height \times π as reported by Kastelic et al [25]).

2.4. Radioimmunoassays

Blood samples were collected daily from day 14 to day 22 after insemination from the coccygeal vein into 10-mL tubes to determine serum progesterone and estradiol-17 β

concentrations. All samples were immediately refrigerated (4°C) and centrifuged within 6 h after collection at 3,000 RPM for 20 min [26]. Serum was harvested and stored at –20°C until assayed in the Laboratory of Nuclear Techniques, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Both serum progesterone and estradiol-17 β concentrations were determined in duplicate by RIA in direct solid phase and liquid phase, respectively, following the recommendations of a commercially available specific kit (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). The sensitivity for progesterone RIA was 0.11 ng/mL, and the intra-assay coefficients of variation (CVs) for low (0.5 ng/mL), medium (2 ng/mL), and high (10 ng/mL) quality controls were 8.5%, 7.2%, and 6.0%, respectively. The interassay CV for the same quality controls was 9.9%, 9.5%, and 9.2%, respectively. Circulating concentrations of estradiol-17 β were determined after using the ether extraction method by a double antibody RIA. This extraction protocol, routinely used in this laboratory and reported by Meikle et al [27], resulted in a recovery of 87% of the original counts per million (cpm). The sensitivity for estradiol-17 β assay was 0.55 pg/mL, and the intra-assay CVs for low (1.52 pg/mL) and high (23.63 pg/mL) quality controls were 7.6% and 8.6%, respectively. The interassay CVs for the same quality controls were 8.3% and 8.7%, respectively.

2.5. Experiment 2

Based on the outcome of experiment 1, the aim of experiment 2 was to evaluate the effect of eCG administration on day 14 after insemination, associated or not associated with 1 eCG dose administered at the time of progesterone device removal, on pregnancy establishment in the first month and pregnancy maintenance in the second month after FTAI. The experiment was conducted in a total of 11 replicates performed during 3 yr on 3 different farms, located in different regions of Uruguay. A total of 1,185 multiparous suckling beef cows, predominantly Hereford and Angus 60–90 d postpartum, and BCS of 3.5 ± 0.1 were used. Anestrus was determined by ultrasound examination at device insertion as described in experiment 1, and only anestrous cows were used for the study ($n = 1,060$). All herds enrolled in the study were under a similar management system, on a grazing regimen with ad libitum access to water and salt–mineral mixture. The experimental groups were designed as described for experiment 1. Pregnancies were confirmed by ultrasonography on day 30 and reconfirmed for pregnancy maintenance on day 60 after insemination.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Stata software [28]. Data were checked for normality and homogeneity of variance by histograms, q–q plots, and formal statistical tests as part of the univariate procedure. CL area, follicular development, serum progesterone, and estradiol-17 β concentrations were analyzed using repeated-measures with statistical generalized linear mixed models (GLMMs), including the animals as random effect, and treatment and day as fixed effects. The model

included the experimental treatments (eCG at device removal or eCG on day 14), day and their interactions. A compound symmetry covariance structure for the data based on Akaike information criterion (AIC) was used, and the model with the lowest AIC value was selected. Pregnancy rate was analyzed using logistic regression in the GLMM including the effect of eCG treatments (at device removal or on day 14), date of treatment (11 replicates), year (3 yr), herd (3 herds), and their interactions. Because the objective was to evaluate the effect of the treatment in conditions representative of typical rangelands in South America [29], the study was performed for anestrous cows, whereas cycling cows were excluded of the analysis. Data are presented as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Experiment 1

The CL area and progesterone concentrations determined from day 15 to day 22 were affected by day and eCG treatments, both on day 14 ($P < 0.05$) and at device removal. No interaction between eCG treatment at device removal and eCG on day 14 nor between treatments and day were found ($P = 0.7$); data in Figure 1 show the main effects regarding eCG administration or not on day 14. The values were normalized on day 14, and data for each cow at that moment were taken as the 100% value. Subsequent values were expressed as a percentage of the initial value on day 14.

For cows that became pregnant on day 30 after FTAI, the average progesterone concentrations during this sampling period were greater in cows that received eCG on day 14 (11.0 ± 0.6 ng/mL; $n = 22$) compared with those did not receive eCG at this time (7.2 ± 0.5 ng/mL; $n = 23$; $P < 0.01$), with significant differences on days 15, 16, 17, and 18. The increase in progesterone concentrations for cows that became pregnant on day 30 after FTAI was $20.6\% \pm 5.8\%$ for cows that received eCG on day 14 versus $2.8\% \pm 5.0\%$ for those that did not received eCG at this time. Again, no interaction between eCG treatment at device removal and eCG on day 14 nor a day by treatment interaction was detected ($P = 0.9$).

For nonpregnant cows, luteolysis occurred during the sampling period and the proportion of nonpregnant/total cows was not affected by eCG treatment at device removal or on day 14 (eCG vs no eCG at device removal: 30.0%, 9/30 vs 20.0%, 6/30; $P = 0.4$); eCG vs no eCG on day 14 (26.7%, 8/30 vs 23.3%, 7/30; $P = 0.8$).

The mean diameters of the largest follicle in pregnant cows from day 14 to day 22 after insemination are shown in Figure 2. No differences were found during this period among eCG-treated or untreated cows at device removal ($P = 0.8$) nor on day 14 ($P = 0.9$), and no interaction between eCG treatments nor between treatments and day were found ($P = 0.6$). For further analysis, the cows were divided into 2 groups in relation to the growth status of the dominant follicle on day 14 (ie, in growing phase or in regressing/static phase). Dominant follicle in the growing phase at eCG treatment was defined as those largest follicles in which the diameter on day 15 was larger than on day 14, and the opposite case was considered

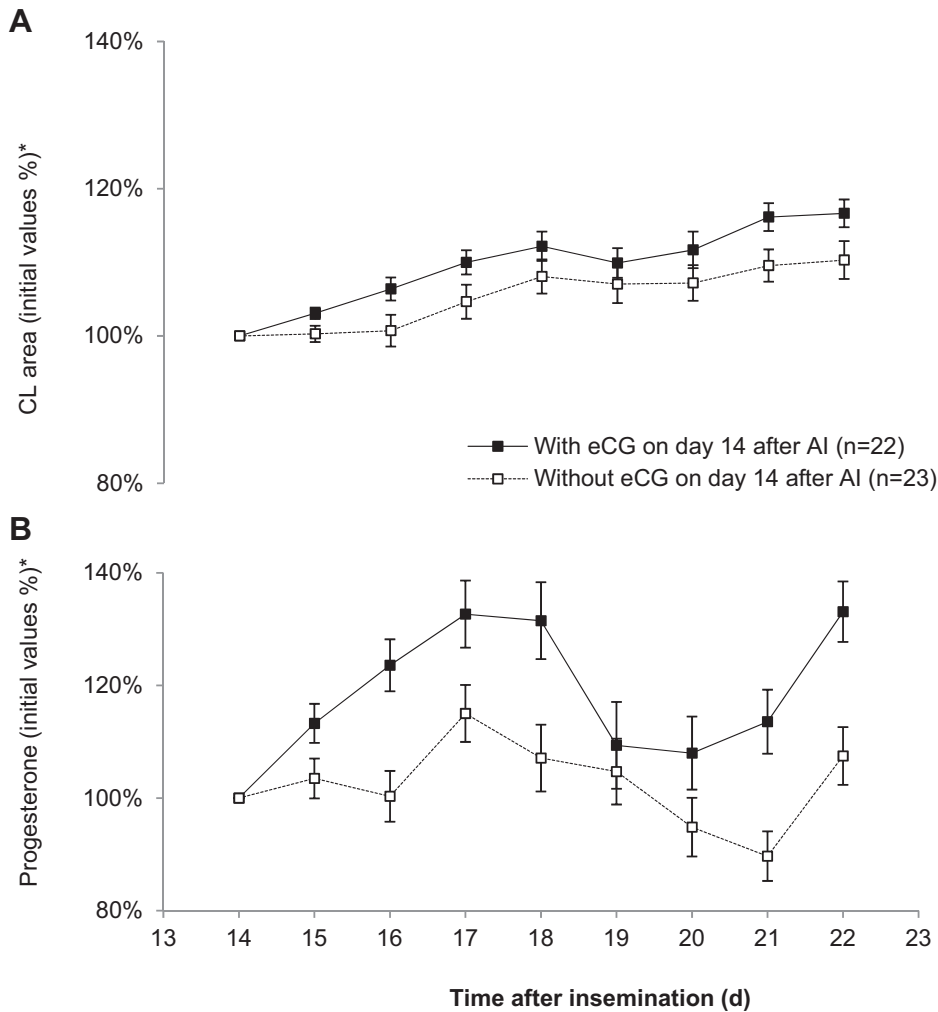


Fig. 1. Corpus luteum area (A) and serum progesterone concentrations (B) during early pregnancy after eCG (400 IU) administration or not on day 14 after insemination in suckling anestrus beef cows. Since no effect of eCG at device removal, nor interaction with eCG treatment on day 14 was found, in both upper and lower panels, data are presented as main effect for eCG treatment or not on day 14 ($P < 0.01$). Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. *Values were normalized on day 14 after insemination and were taken as 100%. Subsequent values were expressed as percentage of the initial value.

the regressing/static phase [30]. For those cows in which their largest follicle was in the regressing or static phase, no effect of eCG administration was found. Conversely, in cows in which the largest follicle was growing at eCG administration on day 14 (with a mean diameter of 8.3 ± 0.3 mm), the treatment increased follicular growth (11.3 ± 0.5 mm on day 17–18; Fig. 2A) compared with cows that did not receive eCG (9.8 ± 0.5 mm on day 17–18; $P < 0.05$).

There was an effect of eCG treatment on serum estradiol-17 β concentrations in pregnant cows from day 14 to day 18 after FTAI. This variable was not affected by eCG treatment at device removal, and no interaction with treatment on day 14 was found ($P = 0.6$). The effect of eCG administered on day 14 on serum estradiol-17 β concentration was greater than that administered on day 16 for cows with eCG vs without eCG (1.8 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 pg/mL, respectively, $P < 0.01$). When the results were analyzed in relation to follicular growth status, the eCG-treated cows in which the largest follicle was in the

growing phase showed greater serum estradiol-17 β concentrations than the untreated cows with the largest follicle in the growing phase (2.4 ± 0.7 vs 0.9 ± 0.1 pg/mL, respectively, $P < 0.05$; Fig. 2C). Similarly, in cows in which the largest follicle was in the regressing or static phase, serum estradiol-17 β concentrations was greater on day 16 in eCG-treated than in untreated cows (1.7 ± 0.3 vs 0.7 ± 0.1 pg/mL, respectively, $P < 0.01$; Fig. 2D).

3.2. Experiment 2

Significant effect of eCG treatment at device removal and on day 14 was found on pregnancy rate ($P < 0.05$), and no interaction was detected ($P = 0.9$). Pregnancy rates were greater in those cows that received eCG at device removal (57.4%, 311/542) than in those that did not receive eCG at device removal (50.0%, 259/518, respectively; $P < 0.01$). In addition, pregnancy rates in cows that received eCG on day 14 was greater than for those that did not receive eCG on

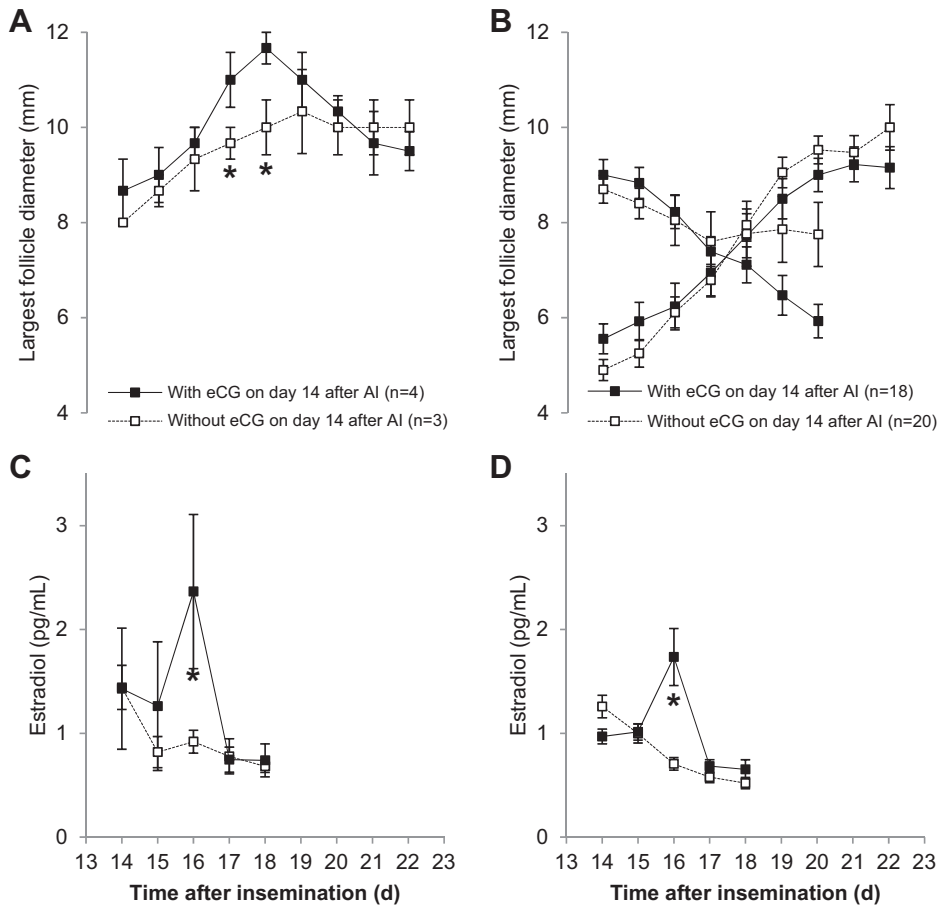


Fig. 2. Largest follicle diameters and serum estradiol-17 β concentrations for pregnant cows. Data were divided into 2 groups in relation to their follicular growth status of the dominant follicle on day 14 (ie, in growing phase [A and C] or in regressing/static phase [B and D], respectively). Main effect is showed for eCG (400 IU) administration or not on day 14 after insemination in suckling anestrus beef cows. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean, and asterisk (*) indicates significant differences ($P < 0.05$).

day 14 (57.0%, 306/537 vs 50.5%, 264/523, respectively; $P < 0.05$). The greatest pregnancy rate was obtained in those cows that received both eCG treatments at device removal and on day 14 after FTAI (61.3%, 168/274) compared to no-eCG-treated control cows (47.5%, 121/255; $P < 0.01$) but did not differ ($P = 0.2$) compared to cows that had eCG administered only at the time of device removal. Pregnancy failure in the second month of gestation (ie, between 30 and 60 d after FTAI) was not different among the experimental groups and was on average 3.5% (20/570, $P = 0.4$; Table 1).

4. Discussion

This study demonstrates that ovarian function during the critical period of pregnancy in anestrus beef cattle is affected by eCG administration on day 14 after insemination. The CL was larger and serum progesterone concentrations were greater in the days following eCG treatment, and serum estradiol-17 β concentrations were increased. In addition, pregnancy rate was significantly improved with double eCG treatment (ie, both at device removal and on

day 14 after FTAI) compared to cows not treated with eCG treated.

The luteal function was improved by eCG administration on day 14. Núñez-Olivera et al [19] showed that eCG treatment at device removal increases ovulatory follicular diameter, ovulation rate, CL area, and serum progesterone concentrations after ovulation, particularly in anestrus *B taurus* beef cows. The current results suggest the success of double eCG treatment at device removal and on day 14 after insemination in FTAI programs in anestrus cows, at least in *B taurus* beef cows. An early increase in progesterone secretion of the CL induced by the first eCG treatment at device removal, previously demonstrated by Núñez-Olivera et al [19], may enhance the uterine environment to stimulate embryo development and IFN- τ production, which in turn would improve maternal recognition of pregnancy [31]. Previous studies showed that an increase in circulating progesterone concentrations during the first week after ovulation effectively stimulates embryo enlargement and IFN- τ secretion, favoring maintenance of pregnancy [14,32,33]. Consequently, high-serum progesterone concentrations during the first 2 wk of gestation are associated with greater pregnancy rates [34,35]. In the

Table 1

Pregnancy rate during the first month after FTAI and pregnancy failure during the second month induced with eCG administration (400 IU) at progesterone intravaginal device removal and/or on day 14 after FTAI in postpartum anestrous beef cattle.

Treatment	Pregnancy rate on day 30 (n = 1,060)	Pregnancy failure from day 30 to 60 (n = 570)
Main effects		
eCG at device removal	57.4% (311/542) ^a	2.9% (9/311) ^a
No eCG at device removal	50.0% (259/518) ^b	4.2% (11/259) ^a
eCG on day 14 after FTAI	57.0% (306/537) ^a	3.3% (10/306) ^a
No eCG on day 14 after FTAI	50.5% (264/523) ^b	3.8% (10/264) ^a
Simple effects		
No eCG-treated cows	47.5% (121/255) ^a	4.1% (5/121) ^a
eCG at device removal	53.4% (143/268) ^{ab}	3.5% (5/143) ^a
eCG on day 14 after FTAI	52.5% (138/263) ^a	4.3% (6/138) ^a
eCG at device removal and day 14	61.3% (168/274) ^b	2.4% (4/168) ^a

Within a column, different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

present study, we proposed and demonstrated that eCG administration just before maternal recognition of pregnancy affected ovarian function and increased progesterone concentrations. This finding is in agreement with a recent report conducted in our laboratory with sheep, in which progesterone concentrations were also increased when eCG was administered on day 10 after FTAI [36]. Therefore, the eCG treatment after insemination appears to be a new alternative to enhance luteotrophic support for the induction of greater endogenous progesterone production during the critical period of gestation in ruminants.

Although eCG treatment induced a luteotrophic action, the improvement in pregnancy rate was only marginal, with an additive effect to the eCG treatment at device removal. The combined treatment of eCG at device removal and 14 d after insemination significantly increased pregnancy rates compared to pregnancy rates in the untreated control group. The effect of eCG at device removal is acting on the preovulatory follicle [19], probably stimulating estradiol production, and the effect of eCG on day 14 is mainly on the CL promoting progesterone production. The positive effect of eCG treatment after insemination on pregnancy rate was also evaluated recently in sheep in a series of experiments conducted in our laboratory [37]. The improvement of pregnancy rates on day 30 was found only in 1 of 2 experiments, and interestingly, this improvement overlapped with greater pregnancy failure from day 30 to day 75 of gestation, and for this reason, the final pregnancy rate did not improve with this strategy. In summary, the available information in cattle and sheep shows a positive effect of eCG treatment on luteal function that has not always translated to an improved pregnancy rate.

The eCG administration on day 14 also increased serum estradiol-17 β concentrations 2 d after treatment, showing that this hormone also exerts a stimulatory effect on follicular activity in a moment that may trigger a luteolytic mechanism. Gonadotropin-like eCG activity in cattle has been reported previously, demonstrating that this hormone has an affinity for FSH and LH ovarian receptors [38]. Many studies performed during the follicular phase have revealed that preovulatory treatment with eCG can affect

ovarian endocrine function [21,39] and increase the amount of mRNA for cytochrome P45017 α resulting in increased estradiol production [40,41]. The greater steroidogenesis promoted by the eCG treatment obtained in our study during early pregnancy was more pronounced in those cows in which the largest follicle was in the growing phase at the time of treatment. This finding may be likely an indicator of luteolysis being triggered than of pregnancy establishment. The well-known role of estradiol in luteolysis (Niswender et al [42]) and the greater presence of estradiol receptors during days 14 to 17 (Meikle et al [43]) show that this strategy deserves further study before its findings are implemented in commercial herds.

The present study also contributes further information about eCG administration at the time of device removal, and the interaction of this treatment with eCG administration after insemination. The improvement in pregnancy rates obtained with eCG administration at the time of device removal being the main effect agrees with previous reports in *B taurus* [44], and *B indicus* cattle [45,46]. In these reports, the addition of eCG in a progesterone and estradiol-based treatment improved pregnancy rates in anestrous beef cattle. Particularly in anestrous *B taurus* beef cows, Núñez-Olivera et al [19], showed that eCG treatment at device removal increases ovulatory follicular diameter, ovulation rate, CL area, and serum progesterone concentrations after ovulation. Differences in pregnancy rates were obtained in the present study with eCG at the time of device removal in anestrous cows. The improvement of 5 to 10 percentage points in anestrus cows is also in agreement with previous reports in *B indicus* cattle [47], in *B taurus* beef cattle with high incidence of postpartum anestrus [46,48,49], and in lactating seasonally calving dairy cows in postpartum anestrous [50,51]. However, other studies of *B taurus* cows with good BCS did not find differences in pregnancy rates [52]. Cows with good BCS treated only with progesterone-releasing devices and estradiol achieved pregnancy rates of 50% or greater [49]. Nevertheless, a consensus exists that the improvement in pregnancy rates with the administration of eCG at the time of device removal is clearly evident in cows with low BCS or in anestrus, more so in primiparous than multiparous cows, in which pregnancy rates after FTAI is around 35% to 40%; the administration of eCG significantly improves these results [20,45]. Since the percentage of cows in postpartum anestrus in grazing herds of South America is around 70%–90%, and cows usually have a compromised BCS at the beginning of the breeding season [44,45], the administration of eCG at the time of device removal for FTAI in anestrus beef cattle is usually recommended.

5. Conclusions

This study demonstrates a positive effect of eCG administration on day 14 after FTAI on serum progesterone concentrations during maternal recognition of gestation in anestrous beef cows. In addition, the combination of eCG treatment at progesterone device removal and on day 14 significantly improved the pregnancy rate compared to the eCG untreated control group. This finding provides new ideas to develop novel strategies that may improve luteal

support and pregnancy establishment in postpartum anestrus beef cattle.

Acknowledgments

The authors thank Federico Rubio and Diego Rubio for providing the animals and facilities and Reynaldo Bonino and Andrés Peñagaricano for handling the animals. This study was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, PR_FMV_2009_1_3111); Syntex Uruguay; and Fundaciba and Fundación IRAUy. The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- [1] Diskin MG, Parr MH, Morris DG. Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:244–51.
- [2] Inskeep EK, Dailey RA. Embryonic death in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21:437–61.
- [3] Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008;43:260–7.
- [4] Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 1980;59:463–8.
- [5] Maurer RR, Chenault JR. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and Nonparous beef cattle. *J Anim Sci* 1983;56:1186–9.
- [6] Binelli M, Thatcher W, Mattos R, Baruselli P. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001;56:1451–63.
- [7] Diskin MG, Waters SM, Parr MH, Kenny DA. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:83–93.
- [8] Wiltbank MC, Salih SM, Atli MO, Luo W, Bormann CL, Ottobre JS, et al. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim Reprod* 2012;9:242–59.
- [9] Demmers KJ, Derecka K, Flint A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 2001;121:41–9.
- [10] Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:65–78.
- [11] Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;49:1–15.
- [12] Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim* 1999;34:269–74.
- [13] Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001;121:175–80.
- [14] Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, et al. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:368–75.
- [15] Wiltbank MC, Souza AH, Giordano JO, Nascimento AB, Vasconcelos JM, Surjus RS, et al. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod* 2012;9:231–41.
- [16] Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013;96:2873–82.
- [17] Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:238–43.
- [18] Nascimento AB, Souza AH, Guenther JN, Costa FPD, Sartori R, Wiltbank MC. Effects of treatment with human chorionic gonadotropin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:818–24.
- [19] Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Bó G, Piaggio J, Menchaca A. Ovarian 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.
- [20] Sales JNS, Bottino MP, Silva LACL, Giroto RW, Massoneto JPM, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2016;86:2290–5.
- [21] Murphy BD. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 2012;9:223–30.
- [22] Cutaia L, Ramos M, Chesta P, Bó GA. Pregnancy rates in suckled beef cows synchronized with progesterone intravaginal devices and receiving eCG fourteen days after breeding. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:168.
- [23] Vizcarra JA, Ibañez W, Orcasberro R. Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la condición corporal de vacas hereford. *Investig Agronómicas* 1986;7:45–7.
- [24] 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.
- [25] Kastelic JP, Bergfeld DR, Ginther OJ. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentrations in heifers. *Theriogenology* 1990;33:1269–78.
- [26] de Castro T, Valdez L, Rodríguez M, Benquet N, Rubianes E. Decline in assayable progesterone in Bovine serum under different storage conditions. *Trop Anim Health Prod* 2004;36:381–4.
- [27] Meikle A, Tasende C, Garófalo EG, Forsberg M. Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci* 1998;54:75–85.
- [28] StataCorp LP, College Station TX. Stata statistical software. TX; 2015.
- [29] Menchaca A, de Castro T, Chifflet N, Alvarez M. Uso combinado de IATF y destete precoz en vacas de cría en anestro posparto. XXXIII Jornadas Uruguayas Buiatría, Ed. Buiatría Uruguay - Paysandú, Uruguay. 2005.
- [30] Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008;69:72–80.
- [31] Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci* 2015;1–10.
- [32] O'Hara L, Forde N, Carter F, Rizos D, Maillo V, Ealy AD, et al. Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2014;26:328–36.
- [33] O'Hara L, Forde N, Duffy P, Randi F, Kelly AK, Valenza A, et al. Effect of combined exogenous progesterone with luteotrophic support via equine chorionic gonadotropin (eCG) on corpus luteum development, circulating progesterone concentrations and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:269–77.
- [34] Lonergan P, Hara LO, Forde N. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Anim Reprod* 2013;10:223–7.
- [35] Lonergan P, Forde N, Spencer T. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:66–74.
- [36] García-Pintos C, Menchaca A. Luteal response and follicular dynamics induced with equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after insemination in sheep. *Small Rumin Res* 2016;136:202–7.
- [37] García-Pintos C, Menchaca A. Pregnancy establishment and maintenance after the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated or not with GnRH after insemination in sheep. *Anim Prod Sci* 2017. <http://dx.doi.org/10.1071/AN16489>. [Epub ahead of print].
- [38] Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev* 1991;12:27–44.
- [39] Liu X, Dai Q, Hart EJ, Barrett DMW, Rawlings NC, Pierson RA, et al. Ultrasonographic characteristics of ovulatory follicles and associated endocrine changes in cyclic ewes treated with medroxyprogesterone acetate (MAP)-releasing intravaginal sponges and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Reprod Domest Anim* 2007;42:393–401.
- [40] Soumano K, Silversides DW, Doizé F, Price CA. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 1996;55:1419–26.
- [41] Soumano K, Lussier JG, Price CA. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotropin versus FSH. *J Endocrinol* 1998;156:373–8.
- [42] Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000;80:1–29.
- [43] Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garófalo EG. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:385–94.
- [44] Menchaca A, Núñez-Olivera R, Wijma R, García-Pintos C, Fabini F, de Castro T. Como mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas *Bos taurus*. 10º Simp Int Reprod Anim, Ed. IRAC - Córdoba, Argentina. 2013. p. 103–33.
- [45] Bó GA, Baruselli PS. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal* 2014;8:144–50.

- [46] Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MCC, Claro Júnior I, Baruselli PS, et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2016;85:792–9.
- [47] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:479–86.
- [48] Cutaia L, Tribulo R, Moreno D, Bó GA. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 2003;59:216.
- [49] Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Marañna D, Baruselli PS. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:223–36.
- [50] Bryan MA, Bó GA, Heuer C, Emslie FR. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronised AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:126–31.
- [51] Bryan MA, Bó G, Mapletoft RJ, Emslie FR. The use of equine chorionic gonadotropin in the treatment of anestrous dairy cows in gonadotropin-releasing hormone/progesterone protocols of 6 or 7 days. *J Dairy Sci* 2013;96:122–31.
- [52] Marquezini GHL, Mercadante VRG, Olson KC, Jaeger JR, Perry GA, Stevenson JS, et al. Effects of equine chorionic gonadotropin on follicle development and pregnancy rates in suckled beef cows with or without calf removal. *J Anim Sci* 2013;91:1216–24.