

EFECTO DEL PROESTRO CORTO Y EL TRATAMIENTO CON GnRH SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN BOVINOS DE CARNE

Cedeño Andrés *^{1,2,4}, Pinargote Luis^{1,3}, Rivera Carlos⁴, Bó Gabriel Amilcar^{1,2}

¹Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Argentina, ²Doctorado en Ciencias, Universidad Nacional de Villa María, Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Córdoba, Argentina. ³Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quevedo, Ecuador. ⁴Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM), Manabí, Ecuador.

Email: mvandresj@gmail.com

Información del artículo Resumen

Tipo de artículo:
Artículo original

Recibido:
dd/mm/aaaa

Aceptado:
dd/mm/aaaa

Licencia:
CC BY-NC-SA 3.0

El objetivo de este trabajo fue de evaluar el efecto de la expresión del celo y el tratamiento con GnRH a las hembras sin celo sobre la tasa de preñez a la inseminación (P/IA) de vacas que fueron sincronizadas con dispositivos de progesterona (P4) y estradiol. Se evaluó el momento de ovulación de las vacas con y sin celo y el momento de ovulación en las que recibieron o no GnRH. Se utilizaron 20 vacas cruce cebú con cuerpo lúteo (CL) y condición corporal entre 2 y 3 (escala 1-5). En el día 0 todas las vacas recibieron 2 mg de estradiol benzoato y un dispositivo con 0,5 g de P4. Luego de 7 días se removieron los dispositivos y se administró 500 µg de Cloprostenol, 400 UI de eCG, 0,5 mg de cipionato de estradiol y pintura en la base de la cola para determinar la presencia de celo. Las vacas fueron revisadas por ultrasonografía cada 12 h desde la remoción del dispositivo hasta el momento de la ovulación. Las vacas que no manifestaron celo fueron distribuidas al azar para recibir o no 100 µg de acetato de gonadorelina. Todos los datos fueron analizando usando el procedimiento de modelos lineales, generalizados y mixtos. Se determinó el momento de ovulación como la hora en la que se observó la desaparición del folículo dominante ovulatorio. El diámetro del folículo dominante no difirió entre los grupos ($P > 0,05$), pero el momento de ovulación fue más anticipado en las vacas con celo ($68,0 \pm 2,5$; $P < 0,05$) que en las vacas sin celo con GnRH ($78,0 \pm 2,6$) y sin celo y sin GnRH ($86,0 \pm 2,0$). En conclusión, las vacas que manifiestan celo posterior al retiro del dispositivo de progesterona tienen una mayor P/IA que las que no manifiestan celo, y en las que no manifiestan celo el tratamiento con GnRH aumenta significativamente la P/IA y disminuye el efecto negativo de la no manifestación del celo.

Palabras clave: Estro- Ovulación- Preñez- Vaquillas de carne – Vacas de carne

Abstract

The objective was evaluate the effect of estrus expression and GnRH treatment on females without estrus on the rate of pregnancy to insemination (P / IA) of cows that were synchronized with progesterone devices (P4) and estradiol. It was to evaluate the ovulation moment of the cows with and without estrus and the ovulation moment in those that received or not GnRH. Twenty 20 cows with zebu cross with corpus luteum (CL) and body condition between 2 and 3 (scale 1-5) were used. On day 0 all cows received 2 mg of estradiol benzoate (Gonadiol, Zoetis, Argentina) and a device with 0.5 g of P4 (DIB, Zoetis). 7 days later the DIBs were removed and 500 µg of Cloprostenol sodium (Ciclase DL, Zoetis), 400 IU of eCG (Novormon 5000, Zoetis), 0.5 mg of estradiol cypionate (ECP, Cipiosyn, Zoetis) and paint were administered. at the base of the tail (CeloTest, Biotay, Argentina) to

determine the presence of heat. The cows were reviewed by ultrasonography (Mindray DP30 Vet Shenzhen, China, 7.5 MHz) every 12 h from the removal of the device until the time of ovulation. Cows that did not show estrus were randomized to receive or not 100 µg of gonadorelin acetate (Gonasyn GDR, Zoetis). The moment of ovulation was determined as the time at which the disappearance of the dominant ovulatory follicle was observed. The diameter of the dominant follicle did not differ between groups ($P < 0.05$), but the ovulation moment was more anticipated in cows with estrus (68.0 ± 2.5 , $P < 0.05$) than in cows without estrus with GnRH (78.0 ± 2.6) and without heat and without GnRH (86.0 ± 2.0). In conclusion, cows that manifest heat after the removal of the progesterone device have a higher P / AI than those that do not show heat, and in those that do not show heat treatment with GnRH significantly increases the P / AI and decreases the negative effect of the non-manifestation of zeal.

Keywords: Estrus-Ovulation-Pregnancy-Beef Heifers-Beef Cows

INTRODUCCIÓN

Un buen programa de IATF es el que genera más vacas preñadas a final del periodo de reproducción y esto es clave para una ganadería exitosa. Por una parte, la detección del celo es el primer paso para obtener una vaca preñada. La detección visual del celo es un desafío de trabajo, es por eso que hoy existen herramientas de detección de celo la cual facilita la aplicación eficaz de la tan fallida detección del celo (Roelofs *et al.*, 2015).

La sincronización del celo, ovulaciones y la inseminación artificial son probablemente las técnicas de la biotecnología reproductiva que más se ajustan a un modelo de programa reproductivo que introduce a un gran número de animales para un manejo más idóneo de las grandes ganaderías de carne (Seidel, 1995; Nasser *et al.*, 2011). Sin duda, la implementación de los protocolos de sincronización ha facilitado a los productores la aplicación de la IA tanto en vaquillonas como en vacas con cría en los distintos campos que se dedican a esta actividad (Bó y Baruselli, 2014).

Uno de los beneficios más prácticos de la sincronización de celo y ovulaciones probablemente sea la eliminación de la tan fallida detección de celo tradicional (Pursley *et al.*, 1995; Pursley and Wiltbank, 2014). Sin embargo, a pesar de que la sincronización de celo evita la detección de los celos, en la actualidad se conoce que se logran menores tasa de preñez en las vaquillonas y vacas que no expresan celo antes de la IA (Sá Filho *et al.*, 2010 and 2011; Thomas *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2016).

Aunque se pueden lograr tasas de preñez aceptables usando IATF, las vaquillas y las vacas que no expresan o no manifiestan celo antes del momento de la inseminación alcanzan tasas de preñez más bajas a la IATF (Thomas *et al.*, 2014 and Perry *et al.*, 2015). Una de las técnicas que se utilizan hoy por hoy para mejorar la performance de los animales que no muestran celo es

la división de la AI en dos horarios dentro de un mismo día de trabajo, lo cual permite inseminar vacas de acuerdo al comportamiento estral después de la sincronización del celo con un protocolo de estro sincronizado (Bishop *et al.*, 2016) y el tratamiento con GnRH para provocar la inducción del folículo reclutado que aún no ha sido ovulado (Pursley *et al.*, 1995).

Por ende, el objetivo del presente estudio fue evaluar el momento de ovulación de las vacas que no muestran celo y que recibieron o no el tratamiento con GnRH y además de evaluar el efecto de la manifestación del celo sobre la tasa de preñez en animales de carne.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue conducida en vacas cebú de carne, en la cual fueron ejecutados en campos dedicados a esta producción en el Ecuador, los mismos se caracterizan por encontrarse con una altitud media de 50 msnm con temperaturas máximas de 35 °C en la época lluviosa y mínimas de 19 °C en la época seca (sin lluvia).

Se efectuó en una sola réplica de trabajo y se utilizaron 20 vacas cruza cebú comercial con cuerpo lúteo (CL) y con una condición corporal mayor a 2 en la escala 1 a 5 (donde 1 representa a flaca y 5 a obesa). En el día del inicio del tratamiento todas las vacas fueron revisadas por ultrasonografía (Mindray DP 30 Vet, 7.5 MHz, Shenzhen, China). Las vacas recibieron en el Día 0, 2 mg de EB (Gonadiol, Zoetis, Argentina) junto con un dispositivo intravaginal de 0,5 g de progesterona (DIB, Zoetis); 7 días después se retiraron los DIB, y se administró 500µg de Cloprostenol sódico (Ciclose DL, Zoetis), 400 UI de eCG (Novormon 5000, Zoetis), 0,5 mg de ECP y pintura en la base de la cola para determinar la manifestación del celo. Las vacas que manifestaron celo a las 48 h de retirados los DIB fueron examinadas por ultrasonografía cada 12 h hasta el momento de la ovulación. Aquellas que no manifestaron celo fueron distribuidas al azar para recibir 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH, Gonasyn gdr, Zoetis) o permanecer como controles no tratados, y fueron

examinadas por ultrasonografía cada 12 h hasta el momento de la ovulación. Todas las vacas fueron inseminadas a las 48 h de retirado el dispositivo.

Ultrasonografía

Al inicio del experimento se realizó ultrasonografía transrectal de tiempo real con transductor lineal 7.5 MHz en modo B (Mindray® DP 50 Vet, Shenzhen, China), con el fin de determinar que animales en ese momento se encontraban aptos para el inicio de las sincronizaciones, verificación de estructuras ováricas y descartar animales con problemas reproductivos (solo animales con folículos <8 mm de diámetro, úteros caídos, cervicitis). Las vacas fueron inmovilizadas en mangas y cepos en donde se les efectuó la ultrasonografía transrectal para registrar todas las estructuras ováricas y el diagnóstico de preñez correspondiente.

Las vacas fueron examinadas por ultrasonografía al día del inicio del tratamiento (Día 0) para determinar estructuras ováricas y, además, fueron examinadas cada 12 h desde las 24 h de la remoción del DIB hasta la ovulación. La ovulación fue definida como el momento en que el FD dejó de observarse. Las estructuras fueron medidas con el software del equipo en el diámetro mayor del folículo dominante (FD). Se efectuaron los diagnósticos de preñez por ultrasonografía a los 30 días de gestación desde la IATF.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados mediante el procedimiento de modelos lineales generalizados y mixtos (GLIMMIX procedure) para familia de datos con distribución no normal (dinámica folicular) y datos binarios (donde 0 es vacía y 1 es preñada) con enlace logit, para determinar la influencia de las distintas variables y sus interacciones sobre la P/IA. El modelo inicial consto de las siguientes variables categóricas como efectos fijos: Celo, Tratamiento con GnRH, Categoría animal (vaca o vaquillona), condición corporal, campo, operador inseminador, raza, estructura ovárica en el Día 0 (CL o FG > 8 mm de diámetro) y sus respectivas interacciones. Fue considerada como variable dependiente o regresora la P/IA (1=preñada, 0=vacía). Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico de InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2019).

Como efectos aleatorios se consideraron las réplicas. Para verificar el modelo final se tuvo en cuenta los valores de AIC y BIC de información (akaike y bayesiano respectivamente). El modelo escogido en cada experimento fue aquel que tuviera AIC menores para cada experimento. Cuando las diferencias fueron significativas se procedió a realizar comparaciones mediante LSD Fisher. Una probabilidad de 0.05 o menos

se consideró estadísticamente significativa, y una probabilidad entre 0.051 y 0.1 fue considerada una tendencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Monitoreo Folicular y tasa de ovulación

Se examinaron por ultrasonografía 20 vacas cebú de cruce comercial. Del total de vacas tratadas, el 30% (6/20) de las vacas entraron en celo a las 40 h y todas lograron ovular (100%). El otro 70 % de vacas (14/20) que no mostraron celo a las 48 h, a la mitad se le administró una dosis de GnRH y la otra mitad permaneció como grupo control. En ambos grupos el 85% de las vacas ovularon (6/7 en ambos grupos).

Por otra parte, a pesar de que el diámetro del folículo dominante no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre los grupos, las vacas que mostraron celo a las 48 h ovularon antes ($P < 0,05$) que las que no mostraron celo. Las que no mostraron celo y recibieron GnRH ovularon antes ($P < 0,05$) que las que no recibieron GnRH (Tabla 1). A pesar que las vacas que mostraron celo se preñaron numéricamente más que las que no mostraron celo, las diferencias no fueron significativas, tal vez debido al número pequeño de animales en este experimento para detectar diferencias en la P/IA.

Tabla 1. Momento de la ovulación y diámetro del folículo dominante ovulatorio (medias \pm EE y rango) en vacas sincronizadas con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol.

Grupo	n	Hora de Ovulación (Rango)	Diámetro del Folículo Ovulatorio	P/IA
En celo	6	68,0 \pm 2,5a (60-72)	15,83 \pm 0,31 (15-17)	4/6 (66,7%)
No celo + GnRH	6	78,0 \pm 2,6 b (72-84)	16,33 \pm 0,33 (15-17)	3/6 (50%)
No celo y no GnRH	6	86,0 \pm 2,0 c (84-96)	16,17 \pm 0,31 (15-17)	3/6 (50%)

El presente estudio comparó básicamente la dinámica de ovulación de las vacas con y sin celo, el momento de ovulación de las vacas sin celo que recibieron el tratamiento con GnRH. En general, las vacas que fueron sometidas a este protocolo de sincronización a base de estradiol y progesterona en el inicio de los tratamiento y 0,5 mg de Cipionato de estradiol al momento de la

remoción de los dispositivos si muestran celo 48 h después de remoción de los dispositivos, tienen una ovulación anticipada y una mayor tasa de preñez que las vacas que no muestran celo en ese momento, y la adición de 100 μ g de GnRH adelanta el momento de ovulación de las vacas sin celo y aumenta significativamente la P/IA.

Numerosos trabajos han demostrado que la no manifestación del celo previo a la IA disminuye la tasa de preñez de las vacas que han sido sincronizadas con un protocolo de IATF tanto en vacas de carne (Sá Filho *et al.*, 2010 and 2011; Thomas *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2016) como en vacas de leche (Lima *et al.*, 2015). Una manera de explicar que se encontró una mayor P/IA tanto en las vacas con celo y las vacas sin celo tratadas con GnRH en esta investigación podría deberse a un mejor alineamiento entre la IA y la ovulación, la cual estaría ocurriendo de manera más sincronizada.

Thomas *et al.* (2014) diseñaron una serie de experimentos con división de la IATF para determinar si la inseminación tardía de las hembras sin manifestación de celo optimizaría la fertilidad. Para ello utilizaron hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) la cual se usa rutinariamente para sincronizar la ovulación en un protocolo de IA para reducir la variación en el momento de la ovulación desde el momento de la remoción del dispositivo de progesterona. Dio como resultado que, entre las vacas y vaquillonas sincronizadas, la ovulación se produjo en un período de 8 h entre 24 y 32 horas después de la administración de GnRH en comparación con un período de 36 horas de 84 a 120 horas después de la PGF y remoción del dispositivo intravaginal y cuando no se administró GnRH (Pursley *et al.*, 1995).

Se corroboró que la presencia o no de celo y el tratamiento con GnRH modifica el momento de la ovulación en las vacas. Las vacas que mostraron celo tuvieron una ovulación entre las 68 \pm 2,5h mientras que las vacas del grupo que no mostraron celo pero que recibió GnRH a las 48 h de retirado el dispositivo ovulo a las 78 \pm 2,6 h de retirado el dispositivo intravaginal. Es decir, más tarde que las que mostraron celo, pero antes de las que no mostraron celo y no recibieron GnRH que lo ovularon a las 86,0 \pm 2.0 h.

Se podría hipotetizar que sería más idóneo realizar la IATF a las vacas que muestran celo a las 48 h de retirado el dispositivo y retrasar la IATF a las vacas que no muestran celo en ese momento ya que van a ovular más tarde, como se ha reportado en vacas lecheras (Tschopp, 2016). Tschopp (2016) en estos trabajos demostró que la división del horario de inseminación y la adición de GnRH en vacas que recibieron IATF utilizando cipionato de estradiol (ECP) como inductor de la ovulación, disminuye la dispersión entre la inseminación y la

ovulación resultando en un adecuado control y sincronización de las ovulaciones.

Esto confirma los resultados obtenidos en este experimento, las vacas que muestran celo ovulan antes y las vacas que no muestran celo retrasan el momento de ovulación. Las vacas que no muestran celo, pero reciben GnRH tienen una ovulación intermedia entre los dos grupos.

Con respecto al diámetro del folículo ovulatorio, no se encontró diferencia entre los grupos. Si bien el grupo de vacas que manifestaron celo a las 48 h del retiro del dispositivo tuvo un diámetro del folículo ovulatorio de 15,8 \pm 0.3 mm, el grupo no celo + GnRH presentó un diámetro de 16,3 \pm 0,3 mm y el grupo no celo y no GnRH tuvo un diámetro de 16,2 \pm 0,3 mm.

Otros resultados encontrados en vacas de leche difieren con los reportados. Tschopp (2016) encontró que las vacas que mostraron celo a las 48 h de retirado los dispositivos ovularon antes y con folículos de mayor diámetro que las que no presentaron celo en ese momento.

Esto se respalda debido a otras investigaciones (Perry *et al.*, 2014) donde se ha podido demostrar que existe una interacción entre el diámetro del folículo preovulatorio, el ambiente hormonal óptimo que se demuestra por la expresión del celo, el establecimiento y el mantenimiento de la concepción. Bridges *et al.* (2012) por su parte han reportaron el efecto de un mejor ambiente hormonal y un mejor ambiente uterino sobre el mantenimiento de la concepción y lo correlacionaron a mayores concentraciones de receptores nucleares de P4 en el epitelio glandular del endometrio. Esta P4 aumenta la concentración de ARNm para receptores de estrógenos (ESR1) en el Día 15,5 pos ovulación, los cuales contribuyen en el éxito de la gestación (Bridges *et al.*, 2012).

El estradiol preovulatorio es importante ya que coordina varios procesos fisiológicos que contribuyen en el establecimiento y mantenimiento de la concepción, incluyendo efectos sobre las células foliculares, el ovocito, el transporte de gametos y la preparación del medio uterino (Dickinson *et al.*, 2016). Además, dentro del folículo ovárico, el estradiol aumenta la mitosis de las células de la granulosa. Las concentraciones séricas de estradiol y el aumento de las concentraciones preovulatorias de estradiol dan como resultado una mayor tasa de concepción (Perry *et al.*, 2007 y 2014).

Thomas *et al.* (2014) en un trabajo realizado en vaquillonas de carne, reportaron una P/IA mas alta de las vacas que manifestaron celo (52,0%) que aquellas sin celo en ese momento (34,0%). Otros autores (Sá Filho *et*

al.,2011) también han evaluado la importancia de la manifestación del celo en la respuesta ovárica y la P/IA en vacas Nelore. En estos estudios las vacas que mostraron celo obtuvieron una P/IA 26,4% mayor (58,5%) que las vacas que no mostraron celo (32,1%).

Sá Filho *et al.* (2011) también evaluaron la eficiencia de la utilización de GnRH en el momento de la IATF para aumentar la tasa de concepción de aquellas vacas que no manifestaron celo después de un protocolo de sincronización. Curiosamente, los resultados demostraron que no hubo un efecto significativo del uso de la GnRH. Probablemente en este trabajo la GnRH no mejoró significativamente las tasas de concepción porque todas las vacas recibieron IATF a las 48 h a diferencia de esta investigación donde las vacas que no mostraron celo recibieron IATF diferida entre 6 y 8 h después de la administración de GnRH.

Estas diferencias tal vez sean debido a que las vacas ovulan recién a las 30 y 36 h después de la GnRH (Pursley *et al.*, 1998), lo que requiere una permanencia de los espermatozoides por un periodo largo de tiempo. Se sabe con anticipación que los picos de LH inducidas por GnRH exógena ocurren más tarde que las que ocurren espontáneamente (Lucy *et al.*, 1986). Por lo tanto, al administrar GnRH a las vacas después de un protocolo de IATF, se espera que las hembras sin celo que responden a esta GnRH exógena ovulen más tarde que las hembras que muestran celo y experimentan su propio aumento de LH endógeno (Lucy *et al.*, 1986). Es por esto que al separar a las vacas sin celo del lote de animales que han expresado celo, para que reciban IATF horas después, se puede determinar con mayor precisión la eficacia de la GnRH administrada horas antes de realizar la IA y por ende mejorar significativamente la P/IA.

CONCLUSIONES

En conclusión, cuando se sincroniza animales para recibir IATF con un protocolo de sincronización a base de estradiol y progesterona en el inicio de los tratamientos y 0,5 mg de Cipionato de estradiol al momento de la remoción de los dispositivos, la IA a las 48 h desde la remoción de los dispositivos de las vacas en celo resulta en una mayor P/IA que el de las vacas sin celo en ese momento, ya que la ovulación ha sido anticipada. Por otra parte, la aplicación de GnRH anticipa la ovulación de las vacas sin celo y en conjunto con una IATF efectuada 6 a 8 h más tarde resultan en una aumentada P/IA en comparación de las vacas que no reciben el tratamiento con GnRH, mejorando de

esta forma el efecto negativo de la no expresión del celo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bishop, B.E., J.M. Thomas, J.M. Abel, S.E. Poock, M.R. Eilersieck, M.F. Smith, D.J. Patterson. 2016. Split-time artificial insemination in beef cattle: I—Using estrous response to determine the optimal time(s) at which to administer GnRH in beef heifers and postpartum cows. *Theriogenology* 2016; 86 (4), 1102 – 1110.
- Bó G.A. and Baruselli P.S. 2014. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal* 2014; 8, 144-150.
- Bridges G.A., Mussard M.L., Pate J.L., Ott T.L., Hansen T.R., Day M.L. 2012. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 133, 16-26.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, F.C.A., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- 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 maternal environment. *Anim. Reprod.* 2016; 13, 209-216
- Lima M.E., Brauner C.C., Freitas V.O., Krause A.R.T., Gularte E.X., Burkert Del Pino F.A., Rabassa V., Corrêa M.N. 2105. Reproductive Responses of Lactating Dairy Cows According to Estrus Behavior and CIDR Uses in a Heatsynch Protocol. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2015; 43, 1256.
- Lucy MC, Stevenson JS. Gonadotropin-releasing hormone at estrus: luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the

- periestrual and postinsemination periods in dairy cattle. *Biol Reprod* 1986; 35:300–11.
- Nasser L.F., Penteado L., Rezende C.R., Sá Filho M., Baruselli P.S. Fixed time Artificial Insemination and Embryo Transfer Programs in Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae* 2011; 39, 15-22.
- Perry G. A., Smith M. F., Roberts A. J., MacNeil M. D., Geary T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 2007; 85, 684–689.
- Perry G. A., Swanson L., Larimore L., Perry B., Djira G. D. 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.
- Perry GA, Smith MF. Management factors that impact the efficiency of applied reproductive strategies. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle* 2015; 208–32.
- Pursley J.R., Mee M.O., Wiltbank M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology* 1995;44: 915–23.
- Pursley J.R., Silcox R.W., Wiltbank M.C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1998; 81, 2139-2144.
- Richardson B. N., Hill S. L., Stevenson J. S., Djira G. D., Perry G. A. 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.
- Roelofs J.B., van Erp-van der Kooij E. Estrus detection tools and their applicability in cattle: recent and perspectival situation. *Anim. Reprod.* 2015; 12, 3, 498-504.
- Sá Filho M.F., Crespilho A.M., Santos J.E.P., Perry G.A., Baruselli P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 120, 23–30.
- Sá Filho M.F., Santos J.E.P., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Baruselli P.S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. *Theriogenology* 2011; 76, 455–463.
- Seidel G. E. Jr. Reproductive biotechnologies for profitable beef production. *Proc. Beef Improvement Federation*, Sheridan, WY, 1995; 28-39.
- Thomas J.M., Lock S.L., Pooock S.E., Ellersieck M.R., Smith M.F., Patterson D.J. Delayed insemination of non-estrous suckled beef cows improves pregnancy rates when using sex-sorted semen in timed artificial insemination. *J. Anim. Sci.* 2014; 92:1745–50.
- Thomas JM, Pooock SE, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson DJ. Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *J Anim Sci* 2014; 92: 4189–97.
- Tschopp J. C. Efecto de La expresión de celos y la adición de GnRH sobre la tasa de preñez en vacas Holando argentino en lactancia sincronizadas con estradiol y dispositivos con progesterona. M.Sc., Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Córdoba. 2016; 37-84.
- Wiltbank M.C., Pursley J.R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 2014; 8, 1170-185.

