

Alternativas al uso de estradiol en programas de IATF en bovinos de carne

F. Cuadro^{1,2}, C. García Pintos^{1,2}, R. Núñez–Olivera¹, C. Brochado¹, F. Fabini³,

C. Abelenda³, J. Buero³, V. Pais¹, C. Caffera², A. Menchaca^{1,2*}

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

2- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Montevideo, Uruguay.

3- Actividad Privada.

* menchaca.alejo@gmail.com

Introducción

Los fármacos en base a estradiol (17 β -estradiol y sus ésteres) son utilizados de rutina en programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en bovinos en la mayoría de los países fuera de la Unión Europea (UE), en particular en Latinoamérica. Solo en los países del Mercosur, estos fármacos se administran cada año en unas 25 millones de vacas que reciben IATF (Menchaca, 2021) lo que genera un gran impacto en la mejora de la ganadería regional. La UE no permite el uso de estos fármacos en sus países y ejerce presión sobre aquellos países que abastecen este mercado de alimentos derivados de animales para que también restrinjan su uso. Como consecuencia, en diciembre de 2020 Uruguay suspendió la importación, elaboración para uso interno, comercialización y tenencia de productos que contengan 17 β -estradiol y sus derivados tipo ésteres (Resolución DGSG N 269/020 y N 263/021). Esta medida había sido aplicada en los países de la UE en 2008 (Directiva 2003/74/CE; Directiva 2008/97/CE; Directiva 81/602/CEE) y como consecuencia también en Nueva Zelanda el mismo año (Menchaca, 2021). Luego de Uruguay, Paraguay ha tomado medidas restrictivas en 2020 (SENACSA N° 635/2020) y recientemente Argentina también ha sufrido restricciones importantes (SENASA-Disposición 54/2022). Frente a la necesidad de generar alternativas al uso de estradiol para los programas de IATF, antes que estos fármacos fueran prohibidos en Uruguay se inició una serie de experimentos en vacas y vaquillonas de carne donde se evaluaron diferentes alternativas tanto al benzoato de estradiol (BE) administrado al iniciar el protocolo para inducir el

recambio folicular, como al cipionato de estradiol (CPE) administrado al finalizar el protocolo para inducir la ovulación en la IATF.

En este trabajo se presentan los principales resultados obtenidos en esta serie de experimentos. En dichos estudios se proponen diferentes protocolos con el objetivo de evitar el uso de estradiol, alcanzar tasas de preñez similares a las obtenidas con los protocolos en base de estradiol, y mantener una técnica simple y fácil de aplicar en el campo que no requiera traer las vacas más de tres veces a las instalaciones. Se resumen entonces los resultados que hemos obtenido en nuestro equipo, que junto con otros estudios que se han comenzado a realizar en Brasil, Argentina y Uruguay pueden contribuir a la búsqueda de una solución frente a la reciente prohibición del uso de las sales de estradiol en la reproducción bovina.

Protocolos en base a estradiol

Los protocolos farmacológicos en base a estradiol y progesterona que controlan el desarrollo folicular y la ovulación para realizar la inseminación sin detectar celo están ampliamente validados y han sido utilizados por más de 20 años en diferentes condiciones en todos los países de Latinoamérica (Bó, 2020). Esta tecnología ha mostrado una creciente tasa de adopción por veterinarios y productores, representando una gran herramienta para incrementar los índices reproductivos en la ganadería bovina e introducir genética superior a través de la inseminación artificial de manera masiva como nunca antes había sido posible. Cada año se inseminan entre el 15 y 20% de las vacas en los países del Mercosur (Menchaca,

ca, 2021), lo que representa unos 25 millones de animales beneficiando de manera significativa a la ganadería de la región.

Los protocolos con estradiol y progesterona consisten en la inserción por 7 a 8 días de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona, junto con la administración i.m. de 2 mg de BE al colocar el dispositivo. Este tratamiento con ambos fármacos combinados inhibe la liberación de LH y FSH, induciendo la atresia del folículo dominante y sincronizando la emergencia de una nueva onda folicular 3 o 4 días más tarde (Bó et al., 1995). En el momento de retirar el dispositivo de progesterona se administra una dosis de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) para asegurar la luteólisis, asociado a una dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) que favorece la ovulación e incrementa la tasa de preñez principalmente en vacas en anestro (Núñez-Olivera et al., 2014). Al finalizar el tratamiento, este protocolo requiere la administración de un inductor de la ovulación que asegure que el folículo preovulatorio alcance la ovulación de manera muy sincronizada en la mayoría de las vacas para realizar la IATF todo el rodeo en un solo día de inseminación. Como inductor de la ovulación durante varios años se utilizó 1 mg de BE administrado 24 h después del retiro del dispositivo (Bó et al., 2002; Martínez et al., 2002). Posteriormente este tratamiento con BE fue reemplazado por otro ester de estradiol, el CPE que administrado al momento del retiro del dispositivo permite sincronizar la ovulación y simplificar el protocolo ya que el número de veces que las vacas se traen a las instalaciones se redujo de 4 a 3 encierros, sin afectar la tasa de preñez (Colazo et al., 2003; Bó et al., 2013). Estos tratamientos en general logran un 50 a 60% de preñez en promedio con resultados consistentes en diferentes condiciones de trabajo (Menchaca et al., 2013; Baruselli et al., 2014; Bó et al., 2018).

Una reciente modificación realizada a estos protocolos de IATF ha sido la prolongación del proestro. Esto estuvo basado en varios trabajos publicados en la década de los 2000s que demostraron que el periodo desde el retiro

del dispositivo intravaginal a la administración del inductor de la ovulación o la inseminación (intervalo denominado como proestro), afecta la tasa de preñez (Bridges et al., 2010). Estos y otros autores, incluido nuestro laboratorio, demostraron que se obtenían mejores resultados con los protocolos de IATF cuando este periodo se prolongaba por algunas horas más. Por este motivo, en los protocolos en base a estradiol se sustituyó la administración de CPE al momento de retirar el dispositivo (con IATF a las 48-56 horas), por una dosis de GnRH administrada a las 60-72 h luego del retiro del dispositivo (atrasando también la IATF a ese momento). En varios estudios realizados en nuestra región, cuando se introdujo este cambio prolongando el proestro, la tasa de preñez en vaquillonas mejoró significativamente en unos 5 a 10 puntos porcentuales (de la Mata et al., 2018; Núñez-Olivera et al., 2022). En todos los países de Latinoamérica donde las sales de estradiol están disponibles, estos protocolos de proestro prolongado como el J-synch son los más utilizados en vaquillonas, mientras que en vacas en anestro aún se mantienen los protocolos convencionales que llevan CPE al momento del retiro del dispositivo.

Protocolos sin estradiol

En aquellos países donde se ha desarrollado la tecnología de la IATF y las sales de estradiol no estaban disponibles, los protocolos han utilizado otras alternativas. El protocolo más emblemático es el Ov-synch por ser el primer tratamiento para IATF desarrollado en EEUU únicamente con el uso de GnRH y PGF_{2α} (Pursley et al., 1995). Consiste en la administración de una dosis de GnRH para inducir el pico de LH, generando la ovulación del folículo dominante y emergencia de una nueva onda folicular que ocurre 1 a 2 días más tarde. Luego de 7 días de iniciado el protocolo se administra una dosis de PGF_{2α} para inducir la regresión luteal, 48 h más se administra una dosis de GnRH y la inseminación se realiza a las 12-16 después de la GnRH (Pursley et al., 1995). Este protocolo aplicado en vacas en anestro nunca fue tan eficaz como los protocolos con

estradiol y progesterona, siendo luego mejorado con el agregado de progesterona exógena (Lambert *et al.*, 2001; Stevenson *et al.*, 2003). La adición del dispositivo con progesterona también permitió una mejor sincronización de la emergencia de la onda folicular y una mejor calidad del ovocito (Consentini *et al.*, 2020). Entre otros ajustes que se fueron proponiendo para este protocolo, uno de ellos fue simplificar el protocolo de 4 a 3 manejos de las vacas, administrando la GnRH y realizando la IATF en el mismo momento. Luego de esta modificación desarrollada en la Universidad del Estado de Colorado, el protocolo pasó a llamarse Co-synch de 7 días (Geary y Whittier, 1998), y probablemente fue el protocolo más utilizado en EEUU durante varios años.

Posteriormente, por las razones indicadas en la sección anterior, en la Universidad del Estado de Ohio se propuso prolongar el proestro en este protocolo acortando el tratamiento con progesterona de 7 a 5 días y alargando el intervalo desde el retiro hasta la GnRH/IATF de 56 h o 72 h (Bridges *et al.*, 2008; 2014; Whittier *et al.*, 2013; Day, 2015). Estos estudios con este nuevo protocolo conocido como Co-synch de 5 días demostraron que los resultados de preñez son superiores a los obtenidos con el protocolo Co-synch de 7 días. Al reducir el tiempo de tratamiento con el dispositivo de progesterona, se evita el efecto negativo del folículo persistente en aquellas vacas que no logran ovular luego de la primera GnRH (Day, 2015). Además, la prolongación del proestro permite mayores niveles de estradiol circulante previos a la ovulación y mayores concentraciones de progesterona en la fase luteal siguiente (Bridges *et al.*, 2014), mejorando el ambiente uterino y el desarrollo embrionario (Bridges *et al.*, 2008; Bridges *et al.*, 2012). El protocolo Co-synch de 5 días ha sido evaluado por nuestro grupo para ser utilizado en Uruguay y países de la región como alternativa a los protocolos con estradiol. Sin embargo, estos protocolos tienen varias dificultades que también deben ser consideradas y se resumen a continuación.

GnRH para inducir la emergencia de la onda

folicular

La eficacia de la GnRH para inducir el recambio folicular y la emergencia de una nueva onda requiere la ovulación del folículo dominante que está presente al inicio del tratamiento. Con los protocolos a base de GnRH, solamente el 26%-56% de las vaquillonas (Martinez *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2011; Colazo y Ambrose, 2011) y el 60% de las vacas de carne (Small *et al.*, 2009) ovulan luego de la primera dosis de GnRH, y por lo tanto la eficacia de la GnRH para inducir la emergencia de una nueva onda es baja. Cuando esta primera GnRH no logra inducir la emergencia de una nueva onda, se favorece la formación de un folículo persistente que tiene algunas desventajas: a) el celo se adelanta y la ovulación muchas veces ocurre antes de la IATF disminuyendo la tasa de preñez (Martinez *et al.*, 2002), y b) el ovocito reinicia la meiosis antes de la ovulación y la fertilidad se ve disminuida (Mihmet *et al.*, 1994; Ahmad *et al.*, 1995). Considerando la baja tasa ovulatoria que se produce en vaquillonas luego de la primera dosis de GnRH, algunos autores han cuestionado si realmente es necesario administrarla (Kasimanickam *et al.*, 2014). Algunos trabajos indican que en vaquillonas no hay diferencia en la tasa de preñez lograda en los animales que reciben o no una dosis de GnRH al inicio del protocolo de sincronización (Colazo y Ambrose, 2011; Cruppe *et al.*, 2014). Sin embargo, hay evidencia que muestra que la tasa de preñez es mayor en aquellas hembras que ovulan luego de recibir GnRH que en las que no ovulan o no son tratadas con GnRH (Colazo y Ambrose, 2011; Abreu *et al.*, 2018). Por lo tanto, en vaquillonas falta determinar con mayor precisión si realmente es necesario administrar una dosis de GnRH al inicio del Co-synch de 5 días.

Doble dosis de PGF2a

Una de las condiciones esenciales para obtener óptimos resultados de preñez en los protocolos de IATF es inducir una luteólisis completa al retirar el dispositivo con progesterona. Se ha demostrado que en los protocolos de

proestro prolongado una sola dosis de PGF2 α no es suficiente para inducir la luteólisis en vacas de carne, esto es debido al menor intervalo de tiempo (solo 5 días) entre la primera GnRH y la inducción de la luteólisis (Souza *et al.*, 2009). Para evitar que el CL recién formado sea refractario a la PGF2 α administrada al retiro del dispositivo, en el protocolo Co-synch de 5 días se propuso administrar una segunda dosis de PGF2 α (Bridges *et al.*, 2008; Kasimanickamet *et al.*, 2009; Whittieret *et al.*, 2013). Se han realizado varios trabajos para establecer la conveniencia de esta segunda dosis de PGF2 α , y la recomendación más frecuente en EEUU es que la segunda dosis debe administrarse con un intervalo de 6-12 h luego de la primera dosis (Bóet *a.*, 2018). Por otro lado, Bridges *et al.* (2012) sobre 2.465 vacas de carne en posparto evaluaron si es necesario administrar dos dosis de PGF2 α en un protocolo Co-synch de 5 días, y reportaron que las tasas de preñez fueron superiores cuando se administraron dos dosis de PGF2 α con un intervalo de 12 h (55%) que cuando se administró una sola dosis (48%) ($P < 0,05$). Estos resultados no difirieron significativamente al compararlos con los resultados obtenidos luego de que las dos dosis de PGF fueron administradas juntas en el momento del retiro del dispositivo, 51% ($P > 0,1$). La recomendación que se hace en EEUU tanto para vaquillonas como para vacas sigue siendo administrar dos dosis de PGF2 α con un intervalo de 6-12 h. Sin embargo esta información aún requiere más estudios para alcanzar un conclusión más clara.

Resultados en Uruguay con protocolos sin estradiol

Vaquillonas

En los últimos años el protocolo J-synchen base a estradiol y progesterona se ha transformado en uno de los protocolos de IATF más utilizado en vaquillonas (de la Mata *et al.*, 2018), y todo nuevo protocolo propuesto debe ser comparado con las estrategias más difundidas en los países de la región. Para evitar el uso de estradiol que requiere este protocolo uti-

lizado en vaquillonas, hemos evaluado diferentes alternativas que permitan obtener resultados similares en la tasa de preñez y mantener a la vez una técnica simple y de fácil aplicación en el campo. En estos estudios hemos mantenido el concepto del proestro prolongado, dado que los resultados con los protocolos tanto en base a estradiol desarrollados en la región así como en base a GnRH desarrollado en EEUU, muestran la ventaja de mantener un proestro prolongado. Evaluamos entonces el uso de GnRH al inicio del protocolo ya que como fue indicado induce la ovulación y el recambio folicular en cierta proporción de las hembras. También evaluamos el uso de progesterona inyectable al momento de colocar el dispositivo intravaginal, dado que esta hormona inhibe la pulsatilidad de LH quitando dicho soporte al folículo dominante, y al inducir altas concentraciones de progesterona (dispositivo + CL + P4 inyectable) podría favorecer el recambio folicular y la emergencia de una nueva onda (Menchaca *et al.*, 2021). Un primer experimento se realizó sobre 1.947 vaquillonas Angus, en seis réplicas, 1.463 de 14 meses con $5,1 \pm 0,5$ de condición corporal (CC, escala 1 a 8) y 59% con CL determinado por ecografía, y 484 de 2 años con $4,9 \pm 0,3$ de CC y 56% con CL al iniciar los protocolos. Las vaquillonas fueron divididas en cuatro grupos experimentales para recibir a) un protocolo J-synch ($n=490$) con una dosis im de BE (2 mg, Gonadiol, Zoetis, Argentina) al momento de colocar un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (DIB 0.5, Zoetis) que se mantuvo durante 6 días; b) un protocolo con una dosis im de GnRH (100 μ g acetato de gonadorelina, GonasynGDR, Zoetis) al colocar el dispositivo intravaginal ($n=481$) que se colocó un día más tarde que en los otros grupos y se mantuvo durante 5 días; c) un protocolo con progesterona inyectable ($n=487$) que recibió una dosis im de esta hormona en solución oleosa (100 mg, Syntex, Argentina) al momento de colocar el dispositivo con progesterona que se mantuvo por 6 días; d) un protocolo sin la administración de ningún fármaco para sincronizar la emergencia de la onda folicular al momento de colocar el dispositivo intravaginal que se mantuvo durante 6 días, actuando como grupo

control (n=489). Los dispositivos se retiraron en un mismo día a todas las vaquillonas a última hora de la tarde, momento en que se administró una dosis im de eCG (200 UI, Novormon, Zoetis) y PGF2 α (500 μ g cloprostenol, Ciclase DL, Zoetis) así como se aplicó pintura en la base de la cola para determinar en el día de la IATF que vaquillonas habían manifestado celo. La IATF se realizó tres días más tarde entre las 64 y 72 h luego de retirar el dispositivo, manteniendo siempre los animales todos juntos en un mismo lote. El día de la IATF, a primera hora de la mañana se evaluó el estado de la pintura y aquellas vaquillonas que habían manifestado celo recibieron la IATF en ese momento (64 h del retiro del dispositivo), mientras que las que no habían manifestado celo se administró una dosis de GnRH en la mañana y la IATF se realizó en la tarde (72 h del retiro del dispositivo). La ecografía se realizó 30 a 35 días después de la IATF. La tasa de preñez fue similar entre el protocolo J-synch y el protocolo con GnRH de 5 días (57%, 281/490 y 55%, 263/481, respectivamente; P=NS), y significativamente menor (P< 0,05) en las vaquillonas que recibieron el protocolo con progesterona inyectable y en las que no recibieron ningún tratamiento al colocar el dispositivo (44%, 216/487; y 44%, 214/489, respectivamente). Estas diferencias se mantuvieron similares y sin interacción (P=NS) entre las vaquillonas de 14 meses y en las de 2 años.

Teniendo en cuenta estos resultados sugerimos que el tratamiento de 5 días con progesterona iniciado con GnRH al colocar el dispositivo es un tratamiento apropiado para realizar IATF en vaquillonas sin utilizar estradiol. Este protocolo lo hemos denominado Split-synch de 5d ya que el día de la IATF los animales se dividen considerando el estado de la pintura/parche, las que manifestaron celo se inseminan sin GnRH, y las que no presentan celo reciben GnRH y se inseminan más tarde. Por este motivo el protocolo es bastante diferente a un Co-synch de 5 días como el propuesto en EEUU, ya que ninguna vaca recibe GnRH al momento de la IATF como se realiza en el protocolo Co-synch.

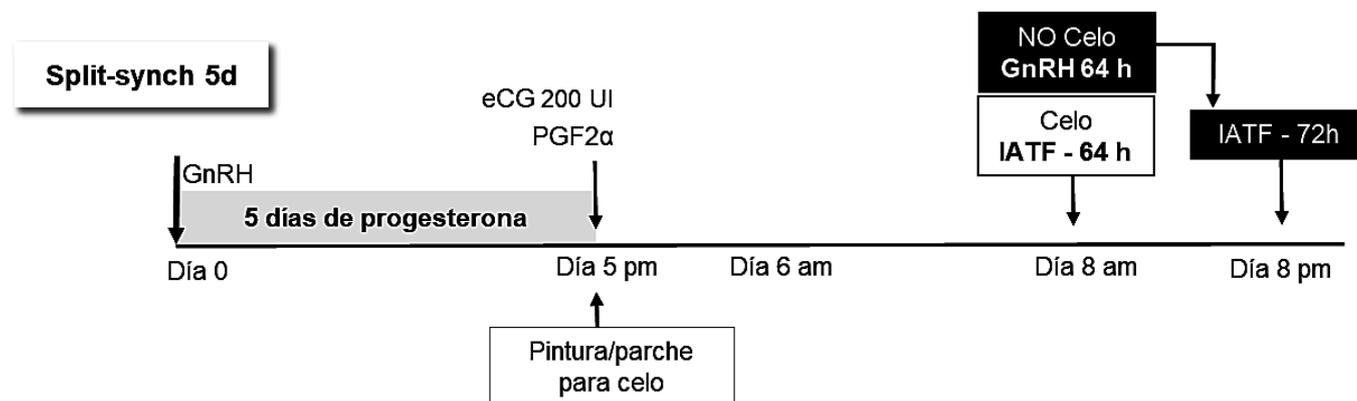
Luego de estos resultados evaluamos diferentes alternativas para mejorar este protocolo Split-synch 5d intentando mejorar la sincronización de onda folicular al inicio del tratamiento, y la luteólisis al final del tratamiento durante el retiro de los dispositivos. El primer objetivo fue determinar el efecto de la dosis de GnRH en el inicio del protocolo Split-synch 5d, sobre la tasa de preñez en vaquillonas. Se realizó un experimento sobre 1.698 vaquillonas Angus, 1.205 tenían 13-14 meses de edad y 4,5 \pm 0,01 de CC y las restantes 493 de 2 años y 5,2 \pm 0,01 de CC. Un 46,7% de las vaquillonas de 13-14 meses y el 71,2% de las vaquillonas de 2 años presentaban CL al momento del inicio de la sincronización estral. El día del inicio del protocolo todos los animales recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0.5, Zoetis) y fueron divididos en tres grupos experimentales, para recibir: una dosis im de GnRH (8,4 μ g acetato de buserelina, Pluserelina, Calier) al colocar el dispositivo con progesterona (n=565); doble dosis de GnRH (16,8 μ g acetato de buserelina, Calier) al colocar el dispositivo (n=574); y otro grupo no recibió GnRH actuando como control (n=557). Cinco días después, en la tarde, se retiraron los dispositivos y se administró 200 UI de eCG (200 UI, Zoetis), una dosis luteolítica de PGF2 α (500 μ g cloprostenol, Zoetis). En este momento se aplicó pintura en la base de la cola para determinar en el día de la IATF que vaquillonas habían manifestado celo. En el día 6, a primera hora de la mañana todas las vaquillonas recibieron una segunda dosis luteolítica de PGF2 α . El manejo de la inseminación se realizó de la misma manera que en el experimento anterior. La ecografía se realizó entre 30 a 35 días después de la IATF. La tasa de preñez fue similar entre las vaquillonas que recibieron GnRH al inicio del tratamiento en una dosis simple o doble (63,5% 359/565 y 64,6%, 371/574, respectivamente; P= NS), mientras que fue significativamente más baja en el grupo que no recibió GnRH (52,4%, 292/557: P< 0,05). Concluimos que en este nuevo protocolo es necesario administrar GnRH al inicio del tratamiento, y no hay diferencia en la tasa de preñez si administramos una dosis simple o doble de buserelina.

Entre otros aspectos que aún no están bien establecidos con estos protocolos cortos es necesario determinar si el CL recién formado por la administración de GnRH es sensible a la PGF2 α . Con el objetivo de evaluar la necesidad de aplicar o no una doble PGF2 α en el momento de retirar los dispositivos, realizamos un experimento sobre 2.132 vaquillonas en 7 réplicas. Al inicio de experimento las hembras tenían en promedio 5,0 \pm 0,01 de CC y 46% tenían CL determinado por ecografía, y todas fueron sincronizadas con un protocolo Split-synch 5d. Al colocar el dispositivo con 0,5 g de progesterona, en 4 réplicas y 1.249 vaquillonas se utilizó acetato de buserelina como análogo de GnRH (8,4 μ g, acetato de buserelina Zoovet, Zoovet) y D+cloprostenol como análogo de PGF2 α 0,150mg (D+cloprostenol, Ciclar, Zoovet), y en 3 réplicas y 883 se utilizó acetato de gonadorelina como análogo de GnRH (100 μ g acetato de gonadorelina, Zoetis) y cloprostenol sódico como PGF2 α (500 μ g cloprostenol, Zoetis). El retiro de los dispositivos se realizó el día 5 a la tarde y todos los animales recibieron una dosis im de eCG (200 UI). En este momento se dividieron en tres grupos experimentales para recibir a) una dosis simple de PGF2 α al retiro del dispositivo (n= 711); b) una dosis doble de PGF2 α al retiro del dispositivo (n= 703); y c) una dosis al retiro y una segunda dosis 16 horas más tarde en la mañana siguiente (n= 718). Junto con el retiro del dispositivo también se aplicó pintura

en la base de la cola para determinar en el día de la IATF que vaquillonas habían manifestado celo, manteniendo siempre los animales todos juntos en un mismo lote. El manejo de la inseminación se realizó de la misma manera que se indicó en los experimentos anteriores con el protocolo Split-synch, dividiendo las vaquillonas para inseminarlas en función del estado de la pintura y administrando GnRH solo a las que no manifestaron celo. Cuando evaluamos la tasa de preñez a los 30-35 días después de la IATF, no se encontró diferencia significativa en los tres grupos experimentales (P=NS) tanto en aquellos lotes que se utilizó buserelina D+cloprostenol, como en los que se utilizó gonadorelina y cloprostenol sódico, y por este motivo los resultados se muestran en conjunto. La tasa de preñez fue 49,4% (351/711) para las vaquillonas tratadas con dosis simple de PGF2 α , 52,5% (369/703) para la dosis doble al retiro, y 49,6% (356/718) para la dosis al retiro y 16 h más tarde (P=NS).

Con esta serie de experimentos que se realizaron sobre 5.777 vaquillonas, podemos concluir que: a) el protocolo Split-synch d5 parece ser la mejor opción para sustituir al protocolo J-synch en esta categoría, b) en el inicio del tratamiento es necesaria la administración de GnRH sin necesidad de aumentar la dosis, y c) administrar una dosis doble de PGF2 α al retirar el dispositivo o una segunda dosis separada

Figura 1. Representación esquemática del Protocolo Split-synch 5d en vaquillonas (Menchaca, 2021). El día 0 las vaquillonas reciben una dosis de GnRH, junto con la inserción de un dispositivo de progesterona que permanece durante cinco días. En la tarde del día 5 se retiran los dispositivos y se administra una dosis luteolítica de PGF2 α , 200 UI de eCG y se aplica pintura o parche para el día de la inseminación. Se identifican aquellas vaquillonas que manifestaron celo. El día 8 a primera hora de la mañana se evalúa el estado de la pintura y aquellas vaquillonas que han manifestado celo reciben IATF en ese momento (64 h del retiro del dispositivo), mientras que las que aún no han manifestado celo se administra una dosis de GnRH en la mañana y la IATF se realiza en la tarde (72 h del retiro del dispositivo).



algunas horas no incrementa la tasa de preñez en vaquillonas. En la Figura 1 se muestra el protocolo Split-synch 5d que recomendamos para vaquillonas.

Vacas con destete precoz

En vacas con destete precoz, al igual que en vaquillonas y a diferencia de las vacas con cría al pie, el protocolo de rutina que utilizábamos desde hace varios años era el protocolo J-synch, con resultados muy consistentes que han sido presentados en varias oportunidades (Menchaca *et al.*, 2017; 2019). Frente a la restricción del uso de estradiol en protocolos para vacas con destete precoz, hemos evaluado diferentes fármacos para el inicio del tratamiento comparando BE, GnRH, progesterona o no administrando ningún fármaco para sincronizar la emergencia de la onda folicular.

En un primer experimento se trabajó sobre 1.474 vacas Angus con 60 a 80 días posparto, 12,5% con CL, $3,7 \pm 0,5$ de CC, en las que se había aplicado un destete precoz en la semana previa al inicio de los protocolos. Al día 0 todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona y se asignaron a cuatro grupos experimentales. Al momento de colocar el dispositivo las vacas del protocolo J-synch (n= 365) recibieron una dosis im de BE (2 mg, Zoetis), las del protocolo Split-synch de 6 días (n= 379) recibieron GnRH (100 µg acetato de gonadorelina, Zoetis), las del protocolo P4-synch (n= 365) recibieron una dosis de 100 mg de progesterona inyectable (Syntex), y las del grupo Control (n= 365) no recibieron ningún fármaco para sincronizar la emergencia de la onda folicular. En todas las vacas el dispositivo con progesterona se retiró el día 6 a última hora de la tarde y se administró una dosis im de eCG (400 UI, Zoetis) y PGF 2α (500 µg de cloprostenol sódico, Zoetis), así como se aplicó pintura para determinar el celo. A diferencia del Split-synch descrito para las vaquillonas anteriormente donde el dispositivo intravaginal lo utilizamos por 5 días, en este caso en las vacas se mantuvo un día más con la hipótesis que el CL al día 6 no requeriría la se-

gunda dosis de PGF α que se recomienda en vacas para los protocolos cortos con GnRH, y se mantendría así un protocolo simple y fácil de aplicar en el campo. La IATF se realizó en todos los grupos de la misma manera que en los experimentos anteriores dividiendo el momento de inseminación. Al día 9 a primera hora de la mañana se evaluó el estado de la pintura y aquellas vacas que habían manifestado celo recibieron la IATF en ese momento (64 h del retiro del dispositivo), mientras que las que aún no habían manifestado celo se administró una dosis de GnRH en la mañana (64 h) y se inseminaron en la tarde (72 h del retiro del dispositivo). La ecografía se realizó 30 a 35 días después de la IATF. La mayor tasa de preñez se obtuvo con el protocolo J-synch que es el único que lleva estradiol (69%, 252/365; $P < 0,05$), sin diferencias significativas para los protocolos Split-synch de 6 días y P4-synch (62%, 233/379 y 55%, 200/365, respectivamente; $P = NS$), y con la menor tasa de preñez para el protocolo Control que no recibió ningún fármaco para sincronizar la emergencia de la onda folicular (48%, 175/365, $P < 0,05$).

Considerando en el experimento previo ninguno de los protocolos sin estradiol alcanzó resultados similares al J-synch, en el siguiente experimento evaluamos otras alternativas a este protocolo. Se realizaron 7 réplicas sobre un total de 1.364 vacas con 60 a 80 días posparto, 8% con CL, $3,1 \pm 0,4$ de CC, y que recibieron destete precoz en la semana previa al inicio de los protocolos. Los animales fueron asignados a tres grupos experimentales: uno recibió el protocolo J-synch (n=282); otro grupo recibió el protocolo Split-synch 5d con una dosis de GnRH (100 µg acetato de gonadorelina, Zoetis) al colocar un dispositivo que a diferencia del experimento anterior se mantuvo durante 5 días (n=283); y un tercer grupo recibió un protocolo P4-synch con una dosis im de progesterona inyectable (Syntex) al momento de colocar el dispositivo intravaginal que permaneció por 6 días. En cinco réplicas la dosis de progesterona inyectable fue 100mg y en dos réplicas fue 50 mg, y los resultados se analizaron separados para aquellas réplicas

con 100 o con 50 mg. En el momento de retirar los dispositivos todas las vacas recibieron 400 UI de eCG y una dosis de PGF2 α , y aquellas del protocolo Split-synch 5d recibieron una dosis adicional de PGF2 α , 8 h antes del retiro. En todas las vacas se aplicó pintura en la base de la cola al retiro del dispositivo para determinar al momento de la IATF si habían manifestado celo. Para cada réplica las vacas se mantuvieron pastoreando todas juntas en un mismo lote y el retiro del dispositivo y la IATF se realizó en el mismo momento para todas las vacas. La IATF se realizó al día 9 en la mañana y en la tarde de la misma manera que se indicó en los experimentos anteriores dividiendo el momento de inseminación según el estado de la pintura. En aquellas réplicas que se utilizó 100 mg de progesterona, la tasa de preñez fue similar entre los protocolos J-synch y Split-synch 5d (70%, 197/282 vs. 71%, 202/283, respectivamente; P=NS), y fue menor en el protocolo con progesterona (58%, 162/279; P <0,05). En las réplicas que se utilizó 50 mg de progesterona, la tasa de preñez también fue similar entre los protocolos J-synch y Split-synch 5d (68%, 119/174 vs. 68%, 116/170, respectivamente; P=NS), y fue menor en el protocolo con progesterona (39%, 69/176; P <0,05). Los resultados de estos experimentos indican que Split-synch 5d es un protocolo recomendable para hacer IATF en vacas de destete precoz sin necesidad de usar estradiol.

Vacas con ternero al pie

En vacas con cría al pie el tratamiento de IATF más usado en aquellos países donde las sales de estradiol están disponibles es el protocolo convencional (Bóet *et al.*, 2020). Este protocolo lleva BE al colocar el dispositivo para sincronizar la emergencia de la onda folicular, y CPE en el retiro del dispositivo para inducir la ovulación siendo necesario principalmente en vacas en anestro (Bosolasco, *et al.*, 2021). Por este motivo, al requerir dos dosis en momentos distintos de dos sales de estradiol, esta categoría de vacas es la que se ve más afectada por la prohibición del estradiol. Considerando además que la gran mayoría de las vacas con cría

al pie están en anestro al iniciar un programa de IATF (Menchaca *et al.*, 2013) requiriendo CPE al retirar el dispositivo, y que esta categoría representa el mayor porcentaje de animales que reciben IATF cada año, el desarrollo de un protocolo alternativo resulta de gran importancia.

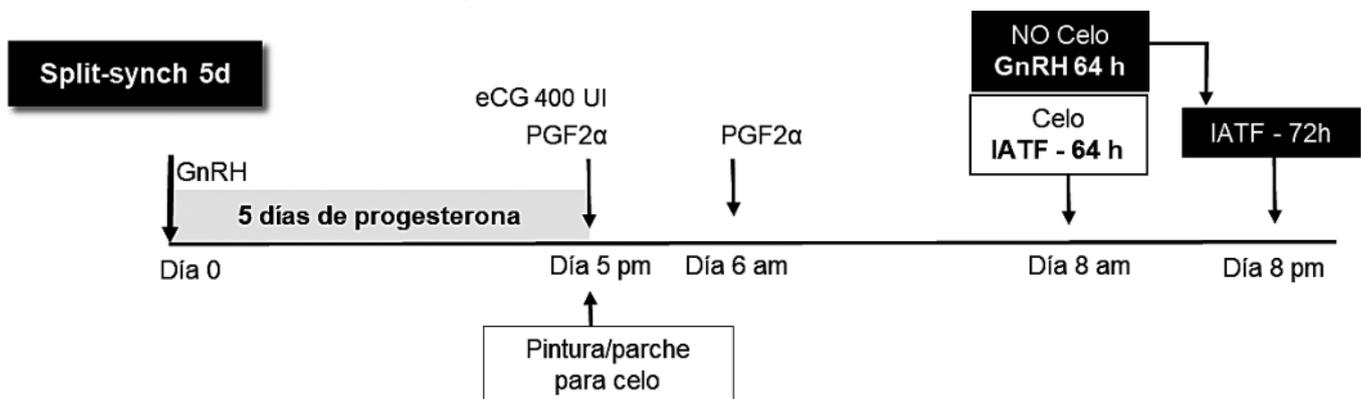
En un primer experimento realizado en vacas con cría evaluamos el uso de progesterona inyectable como alternativa al BE al inicio del protocolo, así como la sustitución del CPE al finalizar el protocolo por GnRH a las 62-64 h más tarde. Se utilizaron 1.011 vacas Angus en tres réplicas que se encontraban con ternero al pie, con 60 a 90 días posparto, 18% con CL determinado por ultrasonografía, y $4,6 \pm 0,6$ de CC. Todas las vacas recibieron un dispositivo con progesterona (DIB 0.5, Zoetis) al día 0 y se asignaron a cuatro grupos experimentales en un arreglo factorial 2x2 para recibir por vía imBE (2 mg, Zoetis) o progesterona inyectable (100 mg, Syntex) al colocar el dispositivo, y CPE (1 mg, Cipiosyn, Zoetis) al retiro del dispositivo al Día 8 am o GnRH 62h luego del retiro del dispositivo que se realizó al día 7 pm. Al momento del retiro del dispositivo en todos los grupos se administró una dosis im de eCG (400 UI, Zoetis) y PGF2 α (500 μ g cloprostenol, Zoetis), y se aplicó pintura en la base de la cola para determinar el día de la IATF si habían manifestado celo. En cada réplica como en todos los experimentos las vacas de los diferentes grupos experimentales permanecieron pastoreando juntas en un mismo potrero. La IATF se realizó al día 10 y las vacas que recibieron CPE (retiro Día 8 am) fueron inseminadas a partir de las 48 h del retiro del dispositivo, mientras que las vacas sin CPE fueron inseminadas a partir de las 62 h. En los cuatro grupos experimentales aquellas vacas que estaban en celo en la mañana del día 10 fueron inseminadas en la mañana, mientras que las vacas que mantenían la pintura (sin celo) se les administró GnRH (100 μ g acetato de gonadorelina, Zoetis) y la IATF se realizó en la tarde. Los cuatro grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente manera: protocolo convencional BE+CPE (IATF con proestro convencional 48h);

protocolo BE+GnRH (IATF con GnRH y proestro largo 62-72h); protocolo P4+CPE (IATF con proestro convencional 48 h); protocolo P4+GnRH (IATF con GnRH y proestro largo 62-72h) siendo este último grupo experimental libre de estradiol. La mayor tasa de preñez se obtuvo en aquellas vacas que recibieron el protocolo convencional con BE+ECP (63%, 159/254; $P < 0,05$) comparado a los otros tres grupos (47 a 53%), con una diferencia de 10 a 16 puntos a favor del protocolo convencional. Cuando se evaluó el efecto principal en el arreglo factorial 2x2, aquellas vacas que recibieron BE tuvieron una mayor tasa de preñez (58%, 293/506) que las que recibieron progesterona inyectable (49%, 247/505; $P < 0,05$), sin efecto significativo ($P = NS$) entre las que recibieron CPE (55%, 276/501) o no recibieron CPE (52%, 264/510) al retiro del dispositivo. En conclusión, no se encontró en este experimento un protocolo alternativo sin estradiol que sea igual de eficaz que el protocolo convencional con BE y CPE.

Dado que los resultados con protocolos de 7 u 8 días sin BE al inicio del tratamiento no fueron satisfactorios, se realizó un siguiente experimento con el objetivo de comparar la tasa de preñez obtenida con el protocolo convencional con BE+CPE frente a dos protocolos a base de GnRH que prolongan el proestro y acortan la duración del protocolo a 5 o 6 días. Se utilizaron 914 vacas Angus multíparas con cría al pie,

60 a 70 días posparto, 16% con CL y $3,0 \pm 0,4$ de CC. Las vacas se asignaron a tres grupos experimentales donde en el día 0 en la mañana un grupo recibió BE (2 mg, Zoetis, im) al colocar un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0.5, Zoetis) por 7 días (protocolo convencional, $n=308$), en otro grupo se administró una dosis im de GnRH (100 μ g acetato de gonadorelina, Zoetis) al momento en el que se colocó el dispositivo que se mantuvo por 6 días (Split-synch 6d, $n=306$), y en otro grupo también se administró GnRH pero al día siguiente al momento de colocar el dispositivo que en este caso se mantuvo por 5 días (Split-synch 5d, $n=300$). Los dispositivos se retiraron el mismo día en todas las vacas, en la mañana para el protocolo convencional o en la tarde para los protocolos Split-synch 6d y Split-synch 5d. Al retiro del dispositivo en las vacas que recibieron el protocolo convencional se administró una dosis im de CPE (1 mg, Zoetis), así como una dosis im de eCG (400 UI, Zoetis) y PGF2 α (500 μ g cloprostenol, Zoetis). Las vacas de los protocolos Split-synch 6d y 5d no recibieron CPE y se les administró 400 UI de eCG (Zoetis), recibiendo una única dosis de PGF2 α (500 μ g cloprostenol, Zoetis) al retirar el dispositivo (Split-synch 6d) o dos dosis de PGF2 α separadas por 16 h (500 μ g cloprostenol, Zoetis) con la primera dosis al retirar el dispositivo (Split-synch 5d). En todas las vacas se aplicó pintura al retirar el dispositivo para determinar al día de la IATF si

Figura 2. Representación esquemática del Protocolo Split-synch 5d para vacas con destete precoz y con cría al pie (Menchaca, 2021). El día 0 las vacas reciben una dosis de GnRH junto con la inserción de un dispositivo de progesterona. En la tarde del día 5 se retiran los dispositivos y se administra una dosis luteolítica de PGF2 α , 400 UI de eCG y se aplica pintura o parche. En la mañana del día 6 (14-16 h del retiro), se administra una segunda dosis de PGF2 α . La IATF se realiza el día 8 entre las 64 y 72 h luego de retirar el dispositivo, a primera hora de la mañana se evalúa el estado de la pintura y aquellas vacas con la pintura borrada o parche activado (en celo) reciben IATF (64 h del retiro del dispositivo), mientras que las que aún no han manifestado celo se administra GnRH en ese momento y la IATF se realiza en la tarde (72 h del retiro del dispositivo).



habían manifestado celo. La IATF se realizó en el mismo día para todos los grupos experimentales, a primera hora de la mañana se evaluó el estado de la pintura y aquellas vacas que habían manifestado celo recibieron la IATF en ese momento (48 h del retiro del dispositivo para el protocolo convencional, y 64 h para los protocolos Split-synch), mientras que las que aún no habían manifestado celo se administró GnRH en ese momento y la IATF se realizó en la tarde (56 h para el protocolo convencional y 72 h para los dos protocolos Split-synch). La tasa de preñez fue similar para el protocolo convencional y Split-synch 5d (65%, 200/308 vs. 67%, 201/300; respectivamente; $P=NS$), mientras que fue menor para el Split-synch 6d (57%, 175/306; $P < 0,05$). Estos resultados indican que el protocolo sin estradiol recomendable para vacas con cría al pie es el Split-synch 5d que permite resultados similares al protocolo convencional con BE y CPE, y que mantener el dispositivo por 6 días en este protocolo Split-synch con una sola dosis de PGF2 α afecta negativamente la tasa de preñez. Los últimos dos experimentos muestran que, como alternativa a los protocolos convencionales con estradiol, sería conveniente utilizar protocolos con GnRH pero con proestro prolongado y que no duren más de 5 días.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos indican que el protocolo Split-synch 5d es una buena alternativa para sustituir los protocolos con estradiol utilizados en los programas de IATF, tanto en vaquillonas como en vacas. Al igual que con el protocolo convencional, con este protocolo también es posible inseminar durante todo el día de IATF, permitiendo organizar lotes grandes de animales para trabajar en programas a gran escala.

En vaquillonas, aplicando este protocolo es necesario administrar una dosis de GnRH al inicio del tratamiento para sincronizar la onda folicular y no es necesario administrar dos dosis de PGF2 α al final del tratamiento. En vacas, la tasa de preñez obtenida con el protocolo

Split-synch 5 d también es similar a la obtenida con el protocolo convencional, y hasta que no se demuestre lo contrario aún se requiere administrar dos dosis de PGF2 α al finalizar el protocolo. Aunque estos estudios ya permiten a los veterinarios trabajar con protocolos sin estradiol en vacas de carne, actualmente se siguen realizando nuevos estudios para ajustar estos protocolos a las condiciones de trabajo en Uruguay y países de la región.

Bibliografía

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.

Ahmad N, Schrick R, Butcher S, Inskeep E. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52: 1129-1135.

Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43: 31–40.

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.

Bó, G.A., Baruselli, P.S., Mapletoft, R.J., 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.* 10: 137-142.

Bó, G.A., Huguenine, E., De La Mata, J.J., Núñez-Oliviera, R., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2018. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Anim. Rep.* vol 15:952-962.

Bó, G.A., 2020. Pursuit of a means of manipulating ovarian function in the cow: an adventure of serendipity, collaboration, and friendship. *Theriogenology* 150: 480-489.

Bosolasco D., Nuñez-Olivera R., de Brun V., Meikle A., Menchaca A. 2021. Estradiol cypionate administered at the end of a progesterone-based protocol for FTAI induces ovulation and improves postovulatory luteal function and uterine environment in anestrus beef cows. *Theriogenology* 162: 74-83.

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 PGF 2α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69:843-851.

Bridges, G.A., Ahola, J.K., Brauner, C., Cruppe, L.H., Currin, J.C., Day, M.L. 2012. Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F $2a$ in the five-day Co-Synch β controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 90:4814-4822

Bridges, G.A., Mussard, M.L., Hesler, 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.

Colazo, M.G., Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60:855-865.

Colazo, 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.

Cruppe, L.H., Day, M.L., Abreu, F.M., Kruse, S., Lake, S.L., Biehl, M.V. 2014. The require-

ment of GnRH at the beginning of the five-day Co-Synch β controlled internal drug release protocol in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 92:4198-4203.

Day, M.L., 2015. State of the art of GnRH - based timed AI in beef cattle. *Anim. Reprod.* 12: 473-478.

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 Synchronization program on ovarian function, uterine environment, and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 30: 1541-1552.

Directiva 2003/74/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial n° L 262 de 14/10/2003 pp. 17-21.

Directiva 2008/97/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial n° L 318 de 28/11/2008 pp. 09-11.

Directiva 81/602/CEE del Consejo. Diario Oficial n° L 222 de 07/08/1981 pp. 32-33.

Disposición 54/2022. Dirección Nacional de Sanidad Animal. <https://www.argentina.gov.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-54-2022-361367>.

Geary, T.W., Whittier, J.C. 1998, Effects of a Timed Insemination Following Synchronization of Ovulation Using the Ovsynch or Co-Synch Protocol in Beef Cows. *The Professional Animal Scientist* 4:217-220.

Kasimanickam, R., M. L. Day, J. S. Rudolph, J. B. Hall, and W.D. Whittier. 2009. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology* 71:762-767

Kasimanickam, R., Firth, P., Schuenemann, G.M., Whitlock, B.K., Gay, J.M., Moore, D.A.

2014. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2 α in a 5-day progesterone-based Co-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology* 81:797-804.

Lima, F.S., Ayres, H., Favoreto, M.G., Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribeiro, E.S. 2011. Effects of gonadotropin releasing hormone at initiation of the 5-d timed artificial insemination (AI) program and timing of induction of ovulation relative to AI on ovarian dynamics and fertility of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 94:4997-5004.

Martinez, M.F., Adams, G.P., Bergfelt, D., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 57:23-33.

Martinez, M.F., Kastelic, J.P., Adams, G.P., Cook, R.B., Olson, W.O., Mapletoft, R.J. 2002. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 57: 1049-1059.

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 *Bostaurus*. 10 Simp. Int. Reprod. Anim. - Córdoba, Argentina 103-133.

Menchaca, A., Núñez-Olivera, de Castro, T., García-Pintos, C., Cuadro, F. 2013. Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. Seminario de Actualización Técnica: Cría Vacuna 229-246.

Menchaca A, Núñez-Olivera R, García-Pintos C, Cuadro F, Bosolasco D, Fabini F, Dutra S, de la Mata J, Bó G. 2017. Efecto de la prolongación del proestro en la fertilidad de los programas de IATF. XII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina.

Menchaca A, Núñez-Olivera R, García-Pintos C, Fabini F, de la Mata J, Huguenine E, Bó G. 2019 ¿Es posible mejorar la fertilidad con protocolos de proestro prolongado? XIII Sim-

posio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina.

Menchaca A. 2021. ¿El adiós al estradiol? Crónica de una muerte anunciada. Memorias de las 10as Jornadas Taurus de Reproducción Bovina.

Mihm M., Baguisi A., Boland M. P., Roche J.F. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102: 123-130.

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.

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

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.

Resolución DGSG N 269/020. Dirección General de Servicios Ganaderos <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca>.

Resolución DGSG N 263/021 Dirección General de Servicios Ganaderos <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca>.

Silva, L.O., Motta, J.C.L., Oliva, A.L., Silva, M.A., Silva, T.J.B., Madureira, G., Folchini, N.P., Alves, R.L.O.R., Consentini, C.E.C., Galindez, J.P.A. 2020. Influence of the analogue and dose of GnRH on the LH release and ovulatory response in *Bos indicus* heifers and cows with high circulating progesterone. *Anim. Reprod.* 17: 36.

Souza, H., Viechnieski, S., Lima, F., Silva, F.F., Araújo, R., Bó, G., Wiltbank, M.C., Baruselli, P.S., 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72: 10-21.

Whittier, W.D., Currin, J.F., Schramm, H., Holland, S., Kasimanickam, R.K. 2013. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day Co-Synch + CIDR or 7-day Co-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology*, 80:963-969.