



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FERTILIDAD DE VAQUILLAS HOLSTEIN INSEMINADAS CON SEMEN
SEXADO TRATADAS CON GNRH EN LOS DÍAS 5 Y 12
DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROBERTO CARLOS RUIZ SOLÍS

TUTOR PRINCIPAL:

ALEJANDRO VILLA GODOY
(FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

MARÍA TERESA SÁNCHEZ TORRES ESQUEDA
(COLEGIO DE POSTGRUADOS)

JUAN HEBERTH HERNÁNDEZ MEDRANO
(FMVZ-UNAM)

Ciudad Universitaria Cd. Mx. Junio 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Rosalva Solís Lezma y Artemio Ruiz Cárdenas y hermano Erick de Jesús.

Por su apoyo y cariño brindado en cada momento de mi vida.

A mi pareja Alondra Mirella Hernández Sosa

Por su amor y comprensión, así como su apoyo otorgado a diario.

A mi hijo Mateo Sebastián Ruiz Hernández

El cual es una de mis más grandes motivaciones que me llevaron a buscar un crecimiento académico y personal, además de ser mi motor día a día.

A mi tutor el Dr. Alejandro Villa Godoy

Porque sin conocerme me dió la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por todo su apoyo en mi formación profesional y por culminar éste proyecto conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que por medio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), me brindó la oportunidad de crecer profesionalmente y adquirir nuevos conocimientos como Maestro en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada, ya que sin éste apoyo económico no hubiese sido posible finalizar este proyecto de vida.

A todos los miembros del Departamento de Reproducción de la FMVZ, por guiarme e instruirme científicamente, por ser mi segunda casa, así como al posgrado por su apoyo constante e incondicional.

A mi comité tutorial, los doctores María Teresa Sánchez Torres Esqueda y Juan Heberth Hernández Medrano, por sus importantes aportaciones para que este trabajo se realizara de la manera correcta.

A mis sinodales la Dra. Griselda Valdez Magaña y el Dr. Armando Enrique Esperón Sumano por contribuir en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Joel Hernández Cerón, por su tiempo y conocimientos proporcionados a lo largo de mi preparación.

A los profesores con los que tomé clases por sus consejos, conocimientos transmitidos y asesorías externas. Aquellos que me enseñaron sin ser parte de su matrícula

A mis amigos Alfredo (cachas), Isabel (chave), Misael, Claudia. Ya que emprendimos este proyecto juntos, convirtiéndose en mis consejeros y con los cuales me desahogaba, además de apoyarnos en los tropiezos y celebrar los logros académicos y personales. Carlos Quiroz y Carlos (Benito) por sus consejos y su apoyo en difíciles momentos dentro de la maestría.

RESUMEN

FERTILIDAD DE VAQUILLAS HOLSTEIN INSEMINADAS CON SEMEN SEXADO TRATADAS CON GnRH LOS DÍAS 5 Y 12 DESPUES DE LA INSEMINACION

Se probó si la aplicación de GnRH en los días 5 y 12 posteriores al servicio reproductivo aumenta el porcentaje de gestación en vaquillas Holstein de primer servicio, inseminadas artificialmente (IA) con semen sexado. Inicialmente se utilizaron 430 vaquillas de 14 a 15 meses de edad. Las vaquillas se observaron dos veces al día para detectar signos de estro y se IA de acuerdo con el sistema am-pm/pm-am. Posteriormente se depuró la base de datos tomando como criterios de inclusión que el toro participara en ambos tratamientos y la fertilidad del toro; para ello se eliminaron toros considerados como infértiles (0 % de gestación) y subfértiles (> 0 y $\leq 29.2\%$ de gestación), permaneciendo para el análisis estadístico definitivo los datos de 373 vaquillas servidas con semen proveniente de 9 toros fértiles ($>29.2\%$ de gestación). Las vaquillas se asignaron al azar en dos grupos: GnRH (n=205) y testigo (n=168). Las vaquillas del grupo GnRH recibieron dos inyecciones por vía intramuscular de Gonadorelina (100 μg de GnRH), la primera el día 5 y la segunda el día 12 después de la IA. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación transrectal a partir del día 45 después de la IA. La contribución relativa de cada factor para la probabilidad de gestación se determinó mediante análisis de regresión logística. La gestación se consideró como variable dependiente, mientras que el tratamiento (GnRH o testigo), el técnico inseminador (2) y el toro (9) se consideraron como variables independientes. El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 20.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA) de acuerdo al método de Hosmer y Lemeshow (2000). El tratamiento con GnRH no afectó ($p=0.87$) el porcentaje de gestación (34.6%; 71/205) de las vaquillas con respecto a las del grupo testigo (35.7%; 60/168). No se observó efecto de los factores técnico inseminador ni toro ($p>0.05$). Se concluye que la inyección de GnRH en los días 5 y 12 después de la IA no aumenta el porcentaje de gestación en vaquillas Holstein de primer servicio e inseminadas con semen sexado. Además, los factores examinados, toro e inseminador, no contribuyeron a explicar la variación en el porcentaje de gestación de las vaquillas.

Palabras clave: Vaquillas lecheras, porcentaje de gestación, GnRH, semen sexado

ABSTRACT

FERTILITY OF HOLSTEIN HEIFERS INSEMINATED WITH SEXED SEMEN TREATED WITH GnRH ON DAYS 5 AND 12 AFTER INSEMINATION

It was tested whether or not the application of GnRH on days 5 and 12 after the first reproductive service increased the pregnancy rate (PR) in Holstein heifers, artificially inseminated (AI) with sexed semen. Initially, 430 heifers from 14 to 15 months of age were used. Heifers were observed twice a day to detect signs of estrus and were AI according to the am-pm/pm-am system. Subsequently all heifers AI with infertile (0% PR) or subfertile sires (> 0 y $\leq 29.2\%$ PR) were removed from data and only heifers (373) AI with semen from nine fertile bulls (>29.2 PR) remained in the experiment. Heifers were randomly assigned into two groups: GnRH (n = 205) and control (n = 168). Animals of the GnRH group received two intramuscular injections of Gonadorelin (100 μ g of GnRH), the first on day 5 and the second on day 12 after AI. Pregnancy was determined by rectal palpation between 45 and 60 days after AI. The relative contribution of each factor to PR was determined by logistic regression analysis. PR was the dependent variable, whereas treatment (GnRH or control), AI technician (2) and bull (9) were considered as independent variables. Statistical analysis was performed using the SPSS 20.0 package (IBM Inc., Armonk, NY, USA) according to the Hosmer and Lemeshow method (2000). GnRH did not affect (p=0.87) heifers PR (34.6%; 71/205) relative to control animals (35.7%, 60/168). No effects were detected of AI technician or bull (p> 0.05). Our conclusion was that application of GnRH on days 5 and 12 after AI does not affect PR at first service in Holstein heifers inseminated with sexed semen. Besides, factors examined here (bull and AI technician) did not explain variation in PR of heifers.

Key words: Dairy heifers, pregnancy rate, GnRH, sexed semen

ÍNDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Porcentaje de gestación de vacas y vaquillas Holstein	2
2.1.1 Porcentaje de gestación de vacas Holstein	2
2.1.2 Porcentaje de gestación de vaquillas Holstein	4
2.2 Semen sexado	5
2.2.1 ¿Qué es el semen sexado?	5
2.2.2 Porcentaje de gestación de vaquillas Holstein inseminadas con semen sexado	5
2.3 Causas de baja fertilidad en vaquillas Holstein	7
2.3.1 Detección de estros	7
2.3.2 Factores asociados con la inseminación artificial (IA)	7
2.3.3 Uso de semen sexado	9
2.3.3.1 Concentración de espermatozoides en la dosis de semen sexado	9
2.3.3.2 Daño a los espermatozoides causados por el proceso de sexado	10
2.4 Muerte embrionaria	11
2.4.1 Muerte embrionaria temprana	11
2.4.2 Muerte embrionaria tardía	13
2.5 Tratamientos enfocados en disminuir la muerte embrionaria	13
2.5.1 Administración de progesterona después de la inseminación	13
2.5.2 Tratamiento con gonadotropina corionica humana después de la inseminación	15
2.6 Hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias	16
2.6.1 Aplicación de hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias después de la inseminación.	17
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Localización y animales	21
5.2 Tratamientos	22
5.3 Análisis estadísticos	22
6. RESULTADOS	23
7. DISCUSIÓN	25
8. CONCLUSIÓN	28
9. BIBLIOGRAFÍA	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación inversa entre el porcentaje de gestación (PG) y producción de leche por año en vacas Holstein.	3
--	---

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación entre el porcentaje de gestación obtenido con semen sexado y semen no sexado en vaquillas lecheras.	6
--	---

Cuadro 2. Porcentaje de gestación de diferentes estudios donde se aplicó GnRH después de la inseminación artificial en vacas y vaquillas.	19
--	----

Cuadro 3. Clasificación de los toros proveedores del semen sexado utilizado en 430 vaquillas Holstein, así como el desempeño de ellas, independientemente del tratamiento que recibieron (GnRH y testigo).	23
---	----

Cuadro 4. Porcentaje de gestación en toros fértiles proveedores del semen sexado utilizado en 373 vaquillas Holstein.	24
--	----

Cuadro 5. Porcentaje de gestación y Odds Ratio (OR= Razón de probabilidades) de las variables incluidas en el método de regresión logística para vaquillas tratadas con GnRH en los días 5 y 12 después de la inseminación con los toros fértiles que permanecieron en el estudio.	24
---	----

1. INTRODUCCIÓN

La infertilidad en el ganado lechero es un problema multifactorial, asociada con el deficiente desarrollo del folículo, pobre expresión del estro, baja calidad del ovocito, fallas en la fertilización, un ambiente subóptimo del tracto reproductivo para apoyar el desarrollo del embrión e inadecuadas condiciones del semen empleado, lo que se traduce en bajos porcentaje de gestación y/o en el aumento de la mortalidad embrionaria (Rizos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). El porcentaje de gestación de las vaquillas inseminadas con semen convencional es de 60% en comparación al obtenido con semen sexado, el cual es de 45 a 50%, lo que representa del 10 al 15% menos que el obtenido con semen no sexado o convencional (DeJarnette *et al.*, 2009). De acuerdo con lo anterior, al menos el 10% de la infertilidad, puede deberse a fallas en la capacidad de fertilización de los espermatozoides por algún daño sufrido durante el procesamiento de sexado; alternativamente, las bajas concentraciones espermáticas de las dosis de semen sexado (1 a 2×10^6) en comparación con las dosis normales (10 a 20×10^6) (Andersson *et al.*, 2004; DeJarnette *et al.*, 2011), contribuyen a los resultados antes mencionados.

Después de la fertilización, el desarrollo del cuerpo lúteo (CL) y las concentraciones de progesterona (P4) influyen en la supervivencia embrionaria y mantenimiento del CL (Thatcher *et al.*, 1997). La mortalidad embrionaria temprana es una importante causa de infertilidad, ya que en la mayoría de los casos ocurre la fertilización y posteriormente el desarrollo de un embrión; sin embargo éste muere y se reabsorbe por diversos motivos (Mann y Lamming, 1999; Dunne *et al.*, 2000; Geary, 2005). La presentación de muerte embrionaria es cercana al 40% de las pérdidas reproductivas totales, con la mayor parte de los embriones muriendo entre los días 8 y 17 de la gestación (Thatcher, 2001; Diskin y Morris, 2008).

Para reducir la muerte embrionaria se ha planteado la aplicación de GnRH en los días 5 a 6 después de la inseminación, para inducir la ovulación del folículo dominante y la formación de un cuerpo lúteo adicional, lo cual se debería reflejar en un incremento en los niveles de P4 en sangre (Howard *et al.*, 2006).

Sin embargo, este tratamiento ha aportado resultados de fertilidad variables: por ejemplo Martínez et al. (1999) y Bartolome et al. (2005) no encontraron diferencias entre los animales tratados con GnRH y los testigos. En contraste, Willard et al. (2003) y Sterry et al. (2006) observaron un aumento en el porcentaje de gestación en los animales tratados con GnRH.

Otro enfoque para disminuir la mortalidad embrionaria se basa en retrasar la regresión lútea, lo cual permitiría al embrión alcanzar el estado de desarrollo necesario para promover eficazmente el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación (López-Gatius *et al.*, 2006b; Ataman *et al.*, 2011). Para ello se ha utilizado GnRH en los días 12 a 14 después de la inseminación; sin embargo, los resultados en fertilidad también son variables habiéndose observado incrementos en la misma en los animales tratados con GnRH (Peters *et al.*, 2000; López-Gatius *et al.*, 2006b) o ningún cambio en la fertilidad con respecto a los animales testigo (Jubb *et al.*, 1990; Szenci *et al.*, 2006). En la literatura disponible no se encontraron trabajos en los que se hubiera examinado el efecto de la GnRH aplicada de acuerdo a los dos enfoques mencionados. Por lo anterior, el tema central del presente estudio se refiere a los efectos de la GnRH aplicada los días 5 y 12 después de la inseminación en la fertilidad de vaquillas Holstein inseminadas con semen sexado.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Porcentaje de Gestación de vacas y vaquillas Holstein

2.1.1 Porcentaje de Gestación de vacas Holstein

La falla en la gestación es un problema de infertilidad muy importante en los hatos lecheros. La fertilidad de las vacas lecheras ha disminuido en los últimos 50 años (Lucy, 2001), de esta manera durante los años 50-60 se lograba gestar un 65% de las vacas inseminadas mientras que en los años 90 disminuyó a solo el 40% (Figura 1). En el 2010 se calculaba un porcentaje de gestación de alrededor de 35%. Así mismo, la tasa de fertilización en la década de los 80 era del 95%, mientras que actualmente se estima que la tasa de fertilización se ha reducido a 83% (Butler, 1998; Santos *et al.*, 2010).

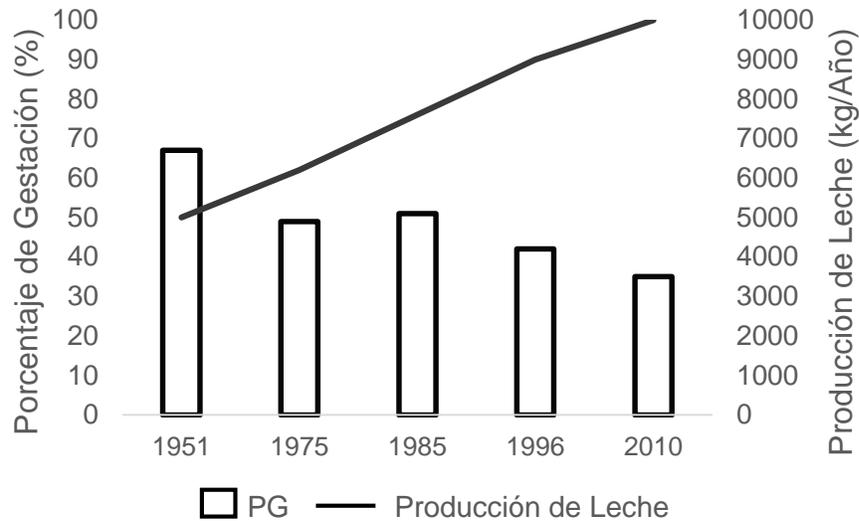


Figura 1. Relación inversa entre el porcentaje de gestación (PG) y producción de leche por año en vacas Holstein (Butler, 1998; Santos *et al.*, 2010).

El desempeño reproductivo de las vacas lecheras se ha visto reducido por diferentes factores como la pobre detección del estro, el estrés calórico, alteraciones metabólicas, balance energético negativo, patologías del puerperio y nivel de producción (Stevenson, 2001; Thatcher *et al.*, 2006). Sin embargo, es claro que la alta producción de leche, ha alterado procesos fisiológicos metabólicos que regulan la reproducción y esto se asocia con un porcentaje de gestación más bajo en comparación al de las vaquillas (Lucy, 2001; Pryce *et al.*, 2004).

El efecto de la alta producción sobre la reproducción ha sido muy discutido, ya que de acuerdo a un estudio de López-Gatius *et al.* (2006a), las vacas que produjeron más leche en el día 50 posparto, tuvieron mejores parámetros reproductivos en comparación con las vacas que produjeron menos leche. No obstante, se ha visto que en las vacas con mayor producción de leche se incrementa el número de ovulaciones múltiples, tienen folículos ovulatorios de mayor diámetro, menores concentraciones circulantes de estradiol (E₂) y progesterona (P₄), muestran estros menos intensos y de corta duración que las de un nivel menor de producción (López *et al.*, 2004; 2005). Esto sugiere que los factores adicionales, tales como los metabolitos, hormonas metabólicas periféricas y factores de crecimiento producidos

localmente, pueden tener un papel modulador (Garnsworthy, 2005; 2007). La evidencia reciente ha demostrado que las respuestas del ovario a señales metabólicas y perfil de nutrientes varían según la etapa del ciclo reproductivo (Garnsworthy *et al.*, 2008).

2.1.2 Porcentaje de Gestación de vaquillas Holstein

Las vaquillas de reemplazo representan una gran parte del costo total de la producción de leche, los productores de leche deben satisfacer las necesidades de reemplazo de sus vacas lactantes a un costo mínimo para mantener la producción del hato (Heinrichs, 1993). En vacas y vaquillas lecheras, la reproducción exitosa es el resultado de una cadena de eventos que incluye: el desarrollo y la ovulación de un ovocito sano, la fertilización, el desarrollo del embrión, la implantación en el útero, el mantenimiento de la gestación y el parto (Garnsworthy *et al.*, 2008).

Aunque la vida productiva, la producción de leche, el desempeño reproductivo y la salud de las vaquillas Holstein está estrechamente relacionada con la edad al primer parto y el peso inmediatamente después del parto (Gabler *et al.*, 2000; Ettema y Santos, 2004), sólo el 2.7% de los hatos lecheros en Estados Unidos alcanzan la meta recomendada de que el primer parto de las vaquillas ocurra entre los 23 y 25 meses, con un peso de 500 a 550 kg (Losinger y Heinrichs, 1997) y que el 90% de las vaquillas gesten en los primeros tres servicios (Cooke *et al.*, 2013; Wathes *et al.*, 2014).

Es común que aproximadamente el 10% de las vaquillas sean animales repetidores, es decir, vaquillas con más de tres servicios de IA con estros sincronizados y que continúen sin gestar (Morales *et al.*, 2000). Así mismo, la fertilidad en las vaquillas no ha cambiado con los años ya que durante el periodo de 1959 a 1985 (Butler y Smith, 1989), después de la primera inseminación gestaron en promedio un 61.7% de las vaquillas IA con semen convencional.

2.2 SEMEN SEXADO

2.1.1 ¿Qué es el semen sexado?

Se denomina semen sexado al que ha sido sometido a un proceso de separación de los espermatozoides de acuerdo a sus cromosomas X o Y, seleccionando y envasando en una pajilla los espermatozoides de un género deseado (McCulloch, 2012; Abdalla, 2014). Esta tecnología se aplica en ganado lechero, para incrementar la proporción de crías de sexo femenino con una precisión del 90% (Seidel y Garner, 2002; DeJarnette *et al.*, 2009; Espinosa-Cervantes y Córdova-Izquierdo, 2013).

2.2.2 Porcentaje de gestación de vaquillas Holstein inseminadas con semen sexado

Cada vez más productores de leche producen vaquillas de reemplazo en la propia unidad productiva para evitar la introducción de nuevas enfermedades al hato (Borchersen y Peacock, 2009). La rentabilidad de utilizar semen sexado en programas de IA, depende en gran medida del porcentaje de gestación obtenido (Cabrera, 2009; Abdalla, 2014), por lo tanto es conveniente revisar el efecto que el uso de semen sexado tiene en la fertilidad de vaquillas. Al efectuar un análisis de los trabajos disponibles en los que se empleó semen sexado, el porcentaje de gestación promedio obtenido en vaquillas es de 45.5%, mientras que en las vaquillas inseminadas con semen no sexado es de 60% y el rango va del 5% al 29% de pérdidas atribuibles al uso de semen sexado (Cuadro 1); consecuentemente, considerando 13 artículos publicados entre los años 1999 a 2015, la baja promedio del porcentaje de gestación debido al uso de semen sexado en vaquillas es de 14.5% menos que con el semen no sexado. Por lo tanto, una mayor proporción de vaquillas resulta afectada negativamente en su porcentaje de gestación.

Es conveniente mencionar que en los trabajos revisados se utilizaron diferentes métodos de manejo, tales como: diferentes concentraciones de espermatozoides (2 a 6×10^6), el sitio donde se depositó el semen (cuerpo del útero o cuernos uterinos) y el uso o no de la sincronización del estro o de la ovulación, mientras que en otros trabajos el servicio de inseminación se aplicó a estro detectado (Cuadro1).

Aun así, los autores recomiendan que se dé prioridad a la inseminación de vaquillas con semen sexado, debido a que son más fértiles y el porcentaje de gestación promedio en vaquillas servidas con semen sexado (45.6%) (Cuadro 1) es similar a la reportada en vacas servidas con semen no sexado (48.5%) (Bodmer *et al.*, 2005; Seidel y Schenk, 2008; Rasmussen *et al.*, 2013; Karakaya *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Comparación entre el porcentaje de gestación obtenido con semen sexado y semen no sexado en vaquillas lecheras.

Semen sexado	Semen no sexado	Referencia
60% (59/98)	67% (20/30)	Seidel <i>et al.</i> , 1999
59% (63/107)	82% (45/55)	Seidel <i>et al.</i> , 1999
33.3% (9/27)	59.3% (16/27)	Bodmer <i>et al.</i> , 2005
43% (90/209)	47% (46/98)	Kurykin <i>et al.</i> , 2007
44% (215/486)	60% (74/124)	Seidel y Schenk, 2008
53.5% (n=221)	67% (n=112)	Seidel y Schenk, 2008
45% (n=29)	56% (n=25)	DeJarnette <i>et al.</i> , 2009
49.3% (273/554)	62% (112/181)	Borchersen y Peacock, 2009
46.6% (n=504)	54% (n= 165)	Borchersen y Peacock, 2009
53% (19/36)	58% (15/26)	An <i>et al.</i> , 2010
45% (n=41.39)	65% (n=41.39)	De Vries, 2010
38% (n=2319)	55% (n=2282)	DeJarnette <i>et al.</i> , 2011
38% (191/508)	43% (198/459)	Lucena <i>et al.</i> , 2014
34% (144/426)	63% (203/325)	Abdalla, 2014
43% (32/74)	63% (127/200)	Kochoski <i>et al.</i> , 2015
44.4% (n=418)	58% (n=627)	Frijters <i>et al.</i> , 2009
Media = 45.5%	Media = 60%	

2.3 Causas de baja fertilidad en vaquillas Holstein

2.3.1 Detección de estros

La baja eficiencia en la detección de estros o el diagnóstico erróneo del estro es el problema que más afecta la reproducción en vaquillas Holstein (Helmer *et al.*, 1985; Senger, 1994). Las vaquillas lecheras permiten la monta homosexual, en promedio, 17 veces durante el estro, y el estro dura en promedio 12 horas, medido de la primera a la última monta (Fricke, 2003). A diferencia de las vacas en lactación, las vaquillas están menos expuestas a factores que disminuyen la expresión del estro, por lo tanto las vaquillas reciben poca atención por parte de los trabajadores, lo que resulta en baja eficiencia en la detección de estros (50 a 60%) (Wilmut y Hunter, 1984; Maatje *et al.*, 1997). Con una rutina de observación de las vaquillas en períodos de 30 minutos durante la mañana y tarde, es posible detectar en estro hasta un 70% de las vaquillas (Stevenson *et al.*, 1997; Fricke, 2003), mientras que la observación de al menos dos horas en la mañana (0600 a 0800 horas) y dos por la tarde (1700 a 1900 horas), permite detectar hasta 90% de las vaquillas en estro (Ranking *et al.*, 1992; Rivera *et al.*, 2004).

Es así como la mala detección del estro no solo afecta la fertilidad a través de la disminución del número de vaquillas inseminadas, sino que también lo hace mediante la alteración de la relación temporal entre el momento de la inseminación y la ovulación (Head, 1992; Nebel *et al.*, 1994). Por lo tanto, la detección eficaz y precisa del estro y el momento de IA, siguen siendo los principales retos para mejorar la eficiencia reproductiva y económica de muchos hatos lecheros (Foote, 1978; Senger, 1994).

2.3.2 Factores asociados con la inseminación artificial (IA)

El tiempo de la inseminación con respecto al estro, manejo del semen y la técnica de IA son importantes, ya que los errores en estos procedimientos tienen efectos acumulativos en la reproducción del hato (Lucy, 2001). La técnica de inseminación empleada es un factor que hay que considerar, ya que es frecuente que los técnicos inseminadores modifiquen los protocolos de descongelación del semen y de higiene (Zarco-Quintero, 1990), tomando en cuenta que con el uso de semen sexado los

porcentajes de gestación son inferiores a los obtenidos con semen convencional (DeJarnette *et al.*, 2008), los errores antes mencionados podrían reducir aún más el porcentaje de gestación.

La hora de la IA tiene una influencia importante en los porcentajes de gestación, y los intervalos más largos de la ovulación para la IA (es decir, más cerca del momento de la ovulación) han aumentado la probabilidad de gestación en vaquillas (Schenk *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2010). Rankin *et al.* (1992) investigaron las inseminaciones realizadas durante la fase ovulatoria en vaquillas lecheras en un período de tres años y encontraron que el intervalo entre el inicio del estro y la ovulación tuvo un efecto significativo en el porcentaje de gestación, ya que en estas condiciones el ovocito envejece y ocurren cambios en la formación de glucoproteínas en la zona pelúcida, por lo cual el ovocito pierde la capacidad para bloquear la polispermia, dando origen a muerte embrionaria temprana, debido a anomalías genéticas (Zarco-Quintero, 1990; Dransfield *et al.*, 1998).

Desde hace más de 50 años se ha aplicado el programa de inseminación AM-PM y PM-AM, lo que significa que los animales que presentan el estro en la mañana son inseminados en la tarde y las de la tarde se inseminan en la mañana siguiente (Trimberger, 1948). En un estudio realizado por Underwood *et al.* (2010), las vaquillas fueron sincronizadas, los estros se observaron dos veces al día y se inseminaron con semen sexado con el sistema AM-PM y PM-AM. Los resultados arrojaron bajos porcentajes de gestación lo que puede deberse a que las primeras inseminaciones pueden haber sido demasiado temprano con relación a la ovulación, consecuentemente los espermatozoides funcionalmente fueron incapaces de alcanzar el sitio de la fertilización o pudieron haber muerto antes de la ovulación. Por otra parte, en la segunda IA, cerca de la hora prevista de la ovulación, los espermatozoides pudieron haber llevado a cabo una capacitación deficiente o incompleta, por lo que fueron incapaces de fertilizar al ovocito (King, 1985). Alternativamente, estos espermatozoides pudieron haber fertilizado un ovocito que se encontraba en un estado de maduración avanzada, lo cual conduce a la

reducción de la calidad del embrión, y por ello a una bajo porcentaje de gestación (Hunter, 1985).

2.3.3 Uso de semen sexado

El semen sexado es una herramienta valiosa para los ganaderos, no solo para los productores de leche sino también de carne, aunque la fertilidad con dicho tipo de semen sea relativamente baja (Schenk *et al.*, 2009). La disminución en la fertilidad debido al uso de semen sexado se debe, principalmente, a dos factores limitantes:

- La baja concentración de espermatozoides en la dosis de semen sexado (Andersson *et al.*, 2004; Cerchiaro *et al.*, 2007).
- Los daños causados a los espermatozoides por el proceso de sexado (Garner, 2009; Arruda *et al.*, 2012; Healy *et al.*, 2013).

A continuación se examinan las causas de baja fertilidad con el uso de semen sexado.

2.3.3.1 Concentración de espermatozoides en la dosis de semen sexado

Se atribuye como principal causa del descenso en el porcentaje de gestación a la baja concentración de espermatozoides por dosis de semen sexado, ya que en estudios iniciales se reportó un porcentaje promedio de gestación de 45.6% en vaquillas Holstein después del primer servicio con semen sexado que contenía 2×10^6 espermatozoides por dosis, mientras que fué de 60.4% en vaquillas inseminadas con semen convencional que tenía 15×10^6 espermatozoides por dosis. En cuanto a la pérdida de embriones se reportó un 5.6% (1/18) en vaquillas servidas con semen sexado (Bodmer *et al.*, 2005). Así pues, la baja concentración de espermatozoides por pajilla (2×10^6), en comparación con los ($15-40 \times 10^6$) espermatozoides contenidos en una pajilla con semen no sexado, pueden explicar el impacto negativo en la fertilidad cuando el semen sexado es utilizado para IA o programas de superovulación y transferencia de embriones (Andersson *et al.*, 2004; Cerchiaro *et al.*, 2007; Chebel *et al.*, 2010). Por razones económicas, el número de espermatozoides sexados en una dosis se reduce de 20×10^6 a 2×10^6 , y esto disminuye los porcentajes de gestación en un 14.8% en vaquillas (Cuadro 1).

Es de destacar que los porcentajes de gestación también se ven reducidos empleando concentraciones más elevadas de espermatozoides sexados por dosis (10×10^6), en comparación con los resultados obtenidos con la misma concentración de espermatozoides por dosis de semen no sexado (Cabrera, 2009; Cuadro 1). Se ha documentado que al utilizar dosis de 10×10^6 tanto en semen sexado como en no sexado para IA, los porcentajes de gestación resultaron ligeramente menores en el semen sexado, con los inconvenientes adicionales de que la comercialización de semen sexado en esta concentración no es rentable, o al menos no lo fué al inicio de la década (DeJarnette *et al.*, 2011).

2.3.3.2 Daño a los espermatozoides causado por el proceso de sexado

Varios estudios han demostrado que el proceso de sexado del semen por la técnica de citometría de flujo puede promover alteraciones en la funcionalidad de la membrana, así como en las características de motilidad y morfología espermática (Sartori *et al.*, 2004; Seidel y Schenk, 2008; Arruda *et al.*, 2012; Healy *et al.*, 2013). Durante el sexado, los espermatozoides son sometidos a procesos químicos y físicos, como lo son (Garner y Seidel, 2003):

- Dilución e incubación con el colorante H-33342
- Exposición a la presión del citómetro y flujo hidrodinámico
- Excitación al rayo láser
- Expulsión a 80-100 km/h,
- Estiramiento al romperse el flujo en gotitas
- Exposición a campo electrostático que afecta el potencial de membrana de las mitocondrias
- Nueva dilución y congelamiento

La disminución de viabilidad de los espermatozoides y el daño a la membrana espermática después del proceso de sexado pueden ser el resultado de alteraciones a los que los espermatozoides están expuestos antes, durante, o después del paso a través del citómetro de flujo (Boe-Hansen *et al.*, 2005; De Graaf *et al.*, 2009; Rath *et al.*, 2009; Seidel, 2009; Arruda *et al.*, 2012).

2.4 Muerte embrionaria

La muerte embrionaria es reconocida como la principal causa de fallo reproductivo en el ganado, ya que resulta en un menor número de becerros nacidos, progreso genético más lento y es una fuente importante de pérdidas económicas a los productores de ganado (Dunne *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2004).

La muerte embrionaria se refiere a las pérdidas de gestaciones que ocurren durante los primeros 42 días de gestación en bovinos de carne y de leche (Ayalon, 1978; Berg *et al.*, 2010), siendo el período más crítico de la gestación el que corresponde al tiempo en que ocurre el reconocimiento materno del embrión, proceso durante el cual el embrión transmite una señal a la madre mediante la secreción del interferón-tau (INF τ), sustancia que inhibe el proceso de luteólisis (BonDurant, 2007; Geary *et al.*, 2013). Por lo anterior, la mortalidad embrionaria se divide a su vez en dos categorías y son clasificadas como mortalidad embrionaria temprana y mortalidad embrionaria tardía (Geary, 2005; Diskin *et al.*, 2006).

Los principales factores que contribuyen a la pérdida embrionaria en general, son procesos fisiológicos y endocrinológicos susceptibles después del servicio, tales como: las primeras etapas de la división embrionaria (días 2-3), la transición de mórula a blastocisto (días 5 al 8) (Sartori *et al.*, 2004), durante el reconocimiento materno de la gestación la secreción y recepción de señales (días 14 al 18) (Inskeep y Dailey, 2005), y durante la placentación (días 28 hasta 45); así como otros factores metabólicos, ambientales, infecciosos e iatrogénicos (BonDurant, 2007).

2.4.1 Muerte embrionaria temprana

La muerte embrionaria temprana es la pérdida del embrión antes de los 17 días posteriores a la IA (Thatcher *et al.*, 1986). A partir de la fertilización en el día 1 hasta el día 16, aproximadamente el 30% de los embriones se pierden, dentro de estos días hay dos procesos críticos: la transición de mórula a blastocisto y el reconocimiento materno de la gestación (Diskin *et al.*, 1980; Dunne *et al.*, 2000).

Los datos de ocho estudios, coinciden en que el promedio de mortalidad embrionaria temprana en vacas lecheras es de 31% (Peters, 1996; Thatcher *et al.*, 2001; Morris y Diskin, 2008; Berg *et al.*, 2010) y en vaquillas lecheras y de carne se reportó un 27.5% (Diskin *et al.*, 1980; Dunne *et al.*, 2000; Sreenan *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2010). Todos los autores previamente citados concluyen que la muerte embrionaria temprana es la principal causa de falla reproductiva. Por ejemplo, se encuentra una menor proporción de embriones alargados (10 cm a 16 días después de la inseminación) en vaquillas con insulina baja en relación al glucagón (Mann *et al.*, 2003). La esteroidogénesis ovárica después de la fertilización podría desempeñar un papel en el desarrollo del embrión. Un aumento de la secreción de 17 β -estradiol o una alteración en la morfología del endometrio hace que la producción de folículos que se encuentran en una etapa más avanzada de la maduración en el momento de la ovulación este relacionada con el mecanismo de muerte embrionaria (Ayalon, 1978; McNeill *et al.*, 2006; Geary *et al.*, 2013).

El establecimiento de la gestación depende de un equilibrio entre el tiempo de desarrollo del mecanismo luteolítico en la madre y la producción de interferón tau por el embrión y este se produce en el día 16 (Thatcher *et al.*, 1997). El INF τ es el factor responsable del reconocimiento materno de la gestación en bovinos y es secretado por el trofoblasto del embrión en crecimiento, para bloquear el proceso de luteólisis (Okuda *et al.*, 2002). Este proceso se logra al inhibir en el endometrio la expresión de receptores para estrógenos y oxitocina, evitando de esta manera la liberación de la PGF 2α (Spencer *et al.*, 2004). El embrión podría morir al producir pocas cantidades de INF τ y no lograr inhibir la luteólisis por fallas genómicas o por tener algún grado de degeneración al momento que debe darse la señal de reconocimiento de gestación (Thatcher *et al.*, 1997; Hansen, 2002). Por tales razones, se considera que la relación entre la P4 y el INF τ es importante ya que una rápida elevación de los niveles de P4 después de la ovulación puede promover la maduración del endometrio uterino y acelerar el crecimiento del embrión en desarrollo (Barnes, 2000).

2.4.2 Muerte embrionaria tardía

La mortalidad embrionaria tardía es aquella que se presenta entre los días 17 y 42 de la gestación, es decir, después del reconocimiento de la gestación. El porcentaje de pérdidas embrionarias en esta etapa en vacas es del 5 hasta el 33%, siendo el promedio de 8.5% (Smith y Stevenson, 1995; Forår *et al.*, 1996; Vasconcelos *et al.*, 1997; Silke *et al.*, 2001; Humboldt 2001; Inskeep, 2002; Diskin *et al.*, 2006) y en vaquillas tiene una incidencia de 4 hasta 9.3%, en promedio 6.4% (Alexander *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 2001; Silke *et al.*, 2001; Sreenan *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005).

Cuando la supervivencia del embrión se extiende más allá de la etapa de reconocimiento materno de la gestación, la regresión lútea se retrasa, lo que resulta en mayor tiempo en retornar al estro y por lo tanto aumentan los días abiertos. En conclusión, aunque el grado de pérdida embrionaria tardía es inferior a la pérdida embrionaria temprana (Diskin *et al.*, 2011) no debe dejarse a un lado ya que ambas tienen importancia y determinan el porcentaje de gestación (Maxwell y Johnson, 1999; Adams *et al.*, 2008; Cerri *et al.*, 2009; Diskin *et al.*, 2011).

2.5 Tratamientos enfocados en disminuir la muerte embrionaria

En la práctica existen varios tratamientos a nivel de campo para mejorar la fertilidad, y tienen como objetivo incrementar el porcentaje de gestación en vacas y vaquillas, disminuyendo la mortalidad embrionaria (Thatcher *et al.*, 2000; Lucy *et al.*, 2004; Thatcher *et al.*, 2006; Khoramian *et al.*, 2011).

2.5.1 Administración de progesterona después de la inseminación

La progesterona (P4) juega un papel clave dentro de la fertilidad del ganado y es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Geisert *et al.*, 1992). Una vaca o vaquilla con bajas concentraciones de P4, se relaciona con un pobre desarrollo embrionario, bajas concentraciones de INFT y pérdidas embrionarias (Mann y Lamming, 2001).

La primera condición se asocia con ciclos estrales cortos (generalmente de 8 a 12 días) en los que las vacas tienen un CL de corta duración debido generalmente a luteólisis temprana, lo cual puede aumentar la incidencia de ovulación de folículos persistentes, cuyos ovocitos ya "envejecieron" (Ahmad *et al.*, 1995; Geary, 2005). Estos ovocitos son fertilizables, pero el resultado es una tasa elevada de muerte embrionaria temprana la cual suele ocurrir antes de la etapa de 16 células y no ocurre el reconocimiento materno de la gestación; además de que se presentan concentraciones de P4 bajas (Shaham-Albalancy *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005) y de que obviamente se reduce el porcentaje de gestación (Ahmad *et al.*, 1995; Geary, 2005; Perry *et al.*, 2005).

El uso de progesterona después de la IA, ha sido propuesto como una estrategia para mejorar la fertilidad, pero no siempre ha dado resultados claros. Algunos datos sugieren que la suplementación con P4 intravaginal puede reducir la incidencia de la pérdida de gestación durante el período embrionario temprano (López-Gatius *et al.*, 2004; Alnimer y Lubbadah, 2008). No obstante, en otros estudios la suplementación de P4 post-inseminación redujo el porcentaje de gestación en vacas y vaquillas lecheras (Bissinoto *et al.*, 2015). En vaquillas de carne, la suplementación de P4 a partir del día tres no indujo un cambio en la recuperación de embriones viables (Carter *et al.*, 2008); es más, en un meta-análisis realizado por Mann y Lamming. (1999) es evidente un efecto positivo del tratamiento con P4 en hatos de baja fertilidad durante la primera semana después de la IA, pero no durante la segunda y tercera semana. Finalmente, en algunos artículos, los autores intentan explicar la heterogeneidad del efecto de los suplementos de P4 observados en la literatura y describen las condiciones fisiológicas en los que la P4 suplementada aumenta la fertilidad en vacas (Macmillan y Peterson, 1993; Mann *et al.*, 2006; Larson *et al.*, 2007; Bisinotto *et al.*, 2015), mas no se encontraron trabajos en los que se intente explicar lo mismo en vaquillas, con excepción del de Carter *et al.* (2008), quienes a pesar de haber inducido un crecimiento acelerado del embrión, no aumentaron el número de embriones viables. Lo anterior indica que no es posible confiar en tratamientos de P4 después de la IA, debido a lo poco predecible que son los resultados en términos del porcentaje de gestación. Es conveniente

generar información con el efecto del uso de otras hormonas en la fertilidad de las hembras bovinas.

2.5.2 Tratamiento con gonadotropina coriónica humana después de la inseminación

Varios investigadores han estudiado el efecto del tratamiento con la gonadotropina coriónica humana (hCG) después de la inseminación (Sianangama y Rajamahendran, 1996; De Rensis *et al.*, 2010). La hCG tiene una actividad similar a la LH y ocupa los receptores para LH en la membrana de las células del cuerpo lúteo, activa segundos mensajeros y aumenta la síntesis de P4 (Santos *et al.*, 2001). En el ganado bovino ha sido utilizada para aumentar la fertilidad ya que además de incrementar la síntesis de P4 en el CL formado a partir del folículo que ovuló (Nishigai *et al.*, 2001), puede inducir la formación de un cuerpo lúteo accesorio que incrementa las concentraciones circulantes de P4 (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz, *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001) y promueve el recambio folicular (Walton *et al.*, 1990), que alarga la duración de la fase lútea, lo que presumiblemente resulta en el incremento en los porcentajes de gestación (Hanlon *et al.*, 2005; De Rensis *et al.*, 2010).

En algunos trabajos se ha demostrado el aumento del porcentaje de gestación como consecuencia de la administración de hCG cuando se aplica en el día 5 ó 6 después de la IA, observando un incremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona de los días 8 a 17 (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz *et al.*, 1998; De Rensis *et al.*, 2008); lo que aparentemente favoreció la supervivencia embrionaria y el aumento del porcentaje de gestación en vaquillas de leche y de carne (Fricke *et al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1996; Diaz *et al.*, 1998). Por el contrario en algunas investigaciones se han reportado nulos efectos de la hCG exógena cuando se aplica en los días 4 ó 5 después de la inseminación, ya que no afectó la tasa de mortalidad embrionaria (Leslie *et al.*, 1986; Tefera *et al.*, 2001; Hanlon *et al.*, 2005). En otros estudios se ha reportado que cuando se administra hCG en los días 11 a 12 después de la IA, los resultados no son favorables ya que no se tiene un incremento en los porcentajes de gestación (Walton *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1996;

Funston *et al.*, 2005). Los trabajos publicados acerca de los tratamientos de hCG los días 4 a 5 u 11 a 12 post IA demuestran que este enfoque no es adecuado, ya que no se han encontrado resultados favorables en la fertilidad de vaquillas de sistemas de producción de leche y carne de manera consistente.

2.6 Hormona Liberadora de Gonadotropinas Hipofisarias

Por ser esta la hormona que se utilizó en este estudio, se ampliará la información relacionada con ella. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) fue aislada en 1971 por Schally y Guillemin (Conn y Crowley, 1991); es un decapeptido sintetizado por neuronas ubicadas en el área preóptica y ventromedial del hipotálamo. A través de los axones de dichas neuronas, la GnRH se libera en el sistema porta hipotálamo-hipofisario y por esta vía se desplaza hacia la adenohipófisis (Kaiser *et al.*, 1997; Tanriverdi *et al.*, 2003), donde actúa en los gonadotropos, quienes bajo su influencia sintetizan las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) y las liberan al torrente sanguíneo. (Thatcher *et al.*, 1993a; D'Occhio *et al.*, 2000). Los efectos biológicos de la GnRH se producen durante una hora aproximadamente; y su vida media es de unos 5 a 10 minutos (Goodman y Gilmans, 1990).

La GnRH es secretada en dos patrones principales: el pulsátil que corresponde al modo tónico de secreción de gonadotropinas hipofisarias (Turkstra y Meloen, 2006); y el de liberación fásica, que corresponde a la oleada o descarga preovulatoria de gonadotropinas (Freeman, 2006). Las gonadotropinas LH y FSH son hormonas glucoproteicas diméricas, que poseen una subunidad α común mientras que poseen distintas subunidades β , las cuales confieren las acciones biológicas específicas de cada gonadotropina (Kaiser *et al.*, 1997). La secreción pulsátil de LH es regulada por retroalimentación negativa de pequeñas cantidades de estrógenos provenientes del ovario, los que comunican en especial al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, lo que permite a su vez una adecuada producción de esteroides gonadales (E_2 y P_4) (Sainsbury, 2000; Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002), que modulan la secreción de LH por inhibición de la actividad del pulso generador de GnRH, produciendo un efecto de retroalimentación negativa que

disminuye los niveles de LH, lo cual mantiene una secreción de LH y esteroides de tipo tónico o basal (Fink, 1988; Turkstra y Meloen, 2006). El segundo sistema de secreción ocurre con mayores concentraciones de estrógenos las cuales actúan mediante retroalimentación positiva e inducen la liberación de GnRH lo que resulta en una oleada de LH, de amplitud y frecuencia suficiente (Herbison, 1997; Haughian y Wiltbank, 2002) para estimular la maduración final del folículo dominante, la ovulación (Chenault *et al.*, 1990) y la posterior luteinización de las células de la granulosa y de la teca; las cuales, por la inhibición de la acción de enzimas fosfolipasa A y ciclooxigenasa, con lo que únicamente se lleva a cabo la biosíntesis de progestinas, a partir de las células del folículo que ovuló y que se han transformado en células lúteas (Mee *et al.*, 1993).

2.6.1 Aplicación de hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias después de la inseminación artificial

Se han realizado evaluaciones de tratamientos con la aplicación de GnRH después de la IA con la finalidad de reducir las pérdidas embrionarias (Herbert y Trigg, 2005; Franco *et al.*, 2006). En estudios previos se ha demostrado que la administración de GnRH 5 ó 6 días después de la IA induce la ovulación y/o la luteinización de los folículos dominantes de la primera oleada folicular, a través del estímulo de la secreción de FSH y LH, lo que resulta en el desarrollo y formación de un cuerpo lúteo accesorio (Kerbler *et al.*, 1997; Thatcher *et al.*, 2001; Bartolome *et al.*, 2006). Lo anterior permite el surgimiento de una nueva oleada folicular entre tres y cuatro días después del tratamiento, con el subsecuente surgimiento de un nuevo folículo dominante durante un período de 7 días (Thatcher *et al.*, 1993b; Diskin *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 2006). Otro enfoque consiste en aplicar GnRH en la mitad del ciclo, entre los días 11 y 14 posteriores a la inseminación (Jubb *et al.*, 1990). Con esta aplicación de GnRH se busca disminuir los niveles de estradiol en sangre mediante la ovulación y luteinización de los folículos dominantes presentes en el ovario (López-Gatius *et al.*, 2006b; Ataman *et al.*, 2011), de esta forma se sincroniza el reclutamiento de una nueva oleada folicular (Diskin *et al.*, 2002; E. Dirandeh, 2009), o bien durante los días que se lleva a cabo el reconocimiento materno de la

gestación, se inhibe la existencia de un folículo con la capacidad de sintetizar estrógenos que contribuyan al mecanismo de luteólisis (Díaz *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2006) y por lo tanto reducir el porcentaje de muerte embrionaria (Ryan *et al.*, 1994; Hansen, 2002). Esto llevó a Peters *et al.* (2000) a realizar un meta-análisis de los trabajos publicados, concluyendo que de acuerdo con el riesgo relativo, la probabilidad de que una vaca quedara gestante se incrementa por un factor de 1.33 que representa un 0 a 22% en vacas tratadas con GnRH entre los días 11 a 14 post IA.

Como se observa en el Cuadro 2, los resultados con GnRH son inconsistentes, ya que en 13/22 reportes, la GnRH aumentó, el porcentaje de gestación; no obstante, en 6/22 trabajos no se registraron efectos (Jubb *et al.*, 1990; Rettmer *et al.*, 1992b; Bartolome *et al.*, 2005; Szenci *et al.*, 2006;) y en 3/22 de ellos, la GnRH disminuyó el porcentaje de gestación (Leslie *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1994; Franco *et al.*, 2006). La inconsistencia se da independientemente del periodo post IA en que se haya aplicado la hormona, ya que en 16 trabajos la GnRH se aplicó entre los días 11 a 14, en 9 de los cuales aumentó el porcentaje de gestación, en 4 no hubieron efectos y en 3 disminuyó dicha variable. Similarmente, cuando la GnRH se administró entre los días 4 y 6 post IA, en 4 trabajos aumentó el porcentaje de gestación, pero en 2 de ellos no hubo efectos.

Es decir, en el 66.7% de los estudios en que se aplicó la GnRH 4 a 6 días post IA fue efectivo el tratamiento, mientras que en el 56.3% de las veces que se aplicó la hormona entre los días 11 a 14 post IA se logró aumentar el porcentaje de gestación. Si bien la inconsistencia en los resultados se podrían deber al producto utilizado o a su dosis, también es factible que con la administración de GnRH en un solo período solo se corrija parte de las causas de infertilidad; es decir, si se aplica los días 4 a 6 post IA, solamente en los animales donde hubieran bajos niveles de P4, posiblemente casos de vaquillas repetidoras, se resolvería, mientras que si el problema predominante fuera la incapacidad del embrión para evitar la luteólisis y con esto el reconocimiento materno de la gestación, la aplicación de la hormona en los días 11 a 14 podría darle solución.

Una posibilidad, es abordar la problemática de infertilidad en forma integral y aplicar la GnRH en los primeros 4 a 6 días y de nuevo entre los días 11 a 14 después de la IA. Este razonamiento nos dirigió a la hipótesis y objetivos que a continuación se enuncian.

Cuadro 2. Porcentaje de gestación de diferentes estudios donde se aplicó GnRH después de la inseminación artificial en vacas y vaquillas.

Día de la aplicación del tratamiento	% de gestación testigo	% de gestación GnRH	Dosis de GnRH	Referencia
4	55.7 (53/95)	53.3 (48/90)	250 µg Gonadorelina	Leslie <i>et al.</i> , 1986
11-13	54.8 (560/1022)	54.6 (561/1028)	10 µg Buserelina	Jubb <i>et al.</i> , 1990
12	42.4 (219/516)	51.1 (257/503)	10 µg Buserelina	Ryan <i>et al.</i> , 1991
12	62.3 (341/547)	60.6 (339/559)	10 µg Buserelina	Ryan <i>et al.</i> , 1994
12	59.1 (13/22)	68 (17/25)	10 µg Buserelina	Muir <i>et al.</i> , 1998
12	40 (11/27)	44 (23/52)	10 µg Buserelina	Tefera <i>et al.</i> , 2001
15	44.4 (87/196)	43.5 (91/209)	100 µg Cystorelin	Bartolome <i>et al.</i> , 2005
5	44.4 (87/196)	47.7 (102/214)	100 µg Cystorelin	Bartolome <i>et al.</i> , 2005
11	29.3 (36/123)	21.5 (26/121)	100 mg de GnRH	Franco <i>et al.</i> , 2006
14	12.7 (30/236)	20.3 (49/241)	100 mg de GnRH	Franco <i>et al.</i> , 2006
12	20.6 (89/431)	35.4 (152/429)	100 µg Cystorelin	López-Gatius <i>et al.</i> , 2006b
5	31.1 (33/106)	45.5 (40/88)	100 gr de GnRH	Sterry <i>et al.</i> , 2006
12	59.1 (26/44)	59.6 (28/47)	50 µg Gonavet	Szenci <i>et al.</i> , 2006
5-6	29.6 (8/27)	26.9 (7/26)	20 µg Buserelina	Khoramian <i>et al.</i> , 2011
6	17.3 (52/300)	22 (66/300)	100 µg Gonadorelina	Dirandeh, 2014
12	17.3 (52/300)	19 (57/300)	100 µg Gonadorelina	Musilová <i>et al.</i> , 2014
15 ^a	45 (100/222)	43 (96/223)	100 µg Cystorelin	Lewis <i>et al.</i> , 1990
12 ^a	40 (20/50)	62.1 (64/103)	100 µg Buserelina	Lajili <i>et al.</i> , 1991
11-13 ^a	58 (11/19)	58 (11/19)	200 pg Acetato de Fertirelina	Rettmer <i>et al.</i> , 1992b
11-14 ^a	23.8 (190/798)	25.5 (198/775)	200 µg Buserelina	Rettmer <i>et al.</i> , 1992a
5 ^a	57.1 (4/7)	62.8 (5/8)	8 mg Buserelina	Schmitt <i>et al.</i> , 1996
11 ^a	19.7 (14/71)	25.6 (20/78)	100 mg de GnRH	Franco <i>et al.</i> , 2006

*Literales (a) para vaquillas tratadas con GnRH

3 HIPÓTESIS

La administración de GnRH en los días 5 y 12 posteriores a la inseminación artificial con semen sexado, aumenta el porcentaje de gestación en vaquillas lecheras.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Determinar el efecto de la aplicación de GnRH los días 5 y 12 posteriores a la inseminación artificial en la fertilidad de vaquillas inseminadas con semen sexado.

4.2 Específicos

Determinar el porcentaje de gestación en vaquillas inseminadas con semen sexado tratadas con GnRH los días 5 y 12 posteriores a la inseminación.

Evaluar si los factores técnico inseminador y toro proveedor de semen, afectan el porcentaje de gestación en vaquillas tratadas con GnRH los días 5 y 12 posteriores a la inseminación artificial con semen sexado.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización y Animales: El presente trabajo se realizó en un hato lechero del estado de Aguascalientes, Ags. El clima de la región es semiseco, con una temperatura media anual de 17.4°C y una precipitación pluvial media de 526 mm. Las vaquillas estuvieron alojadas en cubículos de libre acceso y recibieron una dieta basada en ensilado de maíz, heno de alfalfa y concentrado comercial. El estudio se realizó con 430 vaquillas Holstein inseminadas con semen sexado, con una edad de entre 14 y 15 meses. Las vaquillas se observaron dos veces al día durante la mañana y la tarde para detectar signos de estro. La inseminación la realizaron dos técnicos, por medio del sistema am-pm / pm-am después de la primera observación del estro. Se utilizó semen sexado de 12 toros. Posteriormente se depuró la base de datos tomando como criterio de inclusión que el toro del que provenía el semen sexado participara en ambos tratamientos. Adicionalmente se clasificaron los toros como:

- a) Infértiles (0% de porcentaje de concepción),
- b) Fértiles (aquellos cuyo porcentaje de gestación fué superior a la media más 2 desviaciones estándar, calculada a partir de datos provenientes de 13 artículos en los que se reporta el porcentaje de gestación de vaquillas IA con semen sexado. En estudios previos se ha reportado que los toros fértiles son aquellos que muestran porcentajes de gestación $\geq 29.2\%$; (Seidel *et al.*, 1999; Bodmer *et al.*, 2005; Kurykin *et al.*, 2007; Seidel y Schenk, 2008; Borchersen y Peacock, 2009; DeJarnette *et al.*, 2009; Frijters *et al.*, 2009; An *et al.*, 2010; De Vries, 2010; DeJarnette *et al.*, 2011; Lucena *et al.*, 2014; Abdalla, 2014; Kochoski *et al.*, 2015), y
- c) Subfértiles (> 0 y $< 29.2\%$ de porcentaje de concepción).

5.2 Tratamientos: Las vaquillas se dividieron al azar en dos grupos: GnRH (n=205), en el cual los animales recibieron una inyección por vía intramuscular de 100 µg de Gonadorelina (GnRH nativa) el día 5 y una segunda inyección el día 12 después de la inseminación, y el grupo Testigo (n=168) cuyos animales no recibieron tratamiento alguno. El diagnóstico de gestación se realizó a partir del día 45 post-IA por palpación transrectal.

5.3 Análisis estadísticos: La contribución relativa de cada factor para la probabilidad de gestación se determinó mediante análisis de regresión logística. La gestación se consideró como variable dependiente, mientras que el tratamiento (GnRH o Testigo), el técnico inseminador (2 técnicos) y el toro (12 originalmente y luego 9 fértiles; Cuadro 5) se consideraron como variables independientes. El análisis de regresión logística se efectuó con el paquete SPSS 20.0 (IBM Inc., Armonk, NY, EUA) de acuerdo al método de Hosmer y Lemeshow (2000). Adicionalmente, en el un subconjunto de datos correspondientes a los 9 toros considerados como fértiles, se analizó la variable toro por medio de tabla de contingencias (X^2).

6. RESULTADOS

Cuando se realizó el primer análisis con la base original de datos, el tratamiento con GnRH no afectó ($p=0.94$) el porcentaje de gestación en vaquillas con respecto al grupo testigo (GnRH= 34.2%; 78/228 vaquillas; Testigo= 32.6%; 66/202 vaquillas). Igualmente, en el modelo inicial el porcentaje de gestación no fue afectado por el técnico inseminador ($p > 0.05$) ni por el toro ($p > 0.05$). Sin embargo, cuando se analizó a detalle la fertilidad en los toros, se observó que uno de ellos era infértil, dos más fueron considerados subfértiles y nueve toros resultaron ser fértiles (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de los toros proveedores del semen sexado utilizado en 430 vaquillas Holstein, así como el desempeño de ellas, independientemente de si recibieron o no tratamiento de GnRH.

Variable	Clasificación de los toros		
	Infértiles	Subfértiles	Fértiles
Toros, número	1	2	9
Servicios, número	18	48	374
Servicios por toro, número	18	24	41.5
Tasa de gestación, %	0	21.4	37.2
Rango de tasa de gestación, %	-	16.7-26.2	30-50

* Se consideró como toro fértil aquel que presentó una tasa de concepción $\geq 29.2\%$ (ver texto para más detalles). Se clasificó como toro infértil a aquel que tuviera 0% de gestaciones y los subfértiles fueron aquellos con ≥ 1 pero $< 29.2\%$ de gestaciones.

En el análisis final se eliminaron los toros infértiles y subfértiles, manteniendo sólo los toros fértiles ($n=9$) (Cuadro 4), no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los toros.

Cuadro 4. Porcentaje de gestación en toros fértiles proveedores del semen sexado utilizado en 373 vaquillas Holstein

Número de Toro	Servicios, número	Gestantes, número	No Gestantes, número	Gestantes, %	Odds ratio
1	32	13	19	40.6	1.214
2	50	15	35	30	0.728
3	75	27	48	36	0.947
4	61	21	40	34.4	0.968
5	50	15	35	30	0.713
6	58	21	37	36.2	0.968
7	17	6	11	35.2	0.925
8	6	2	4	33.3	1.587
9	27	11	16	40.7	Referencia

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$)

El conjunto final de datos se analizó por regresión logística (Cuadro 5) y al igual que en el modelo inicial, al analizar los datos correspondientes a las vaquillas inseminadas con semen de toros fértiles, se observó que el porcentaje de gestación no fue afectado por el tratamiento ni por el técnico.

Cuadro 5. Porcentaje de gestación y Odds ratio (OR= Razón de probabilidades) de las variables incluidas en el modelo de regresión logística para vaquillas tratadas con GnRH en los días 5 y 12 después de la inseminación con los toros fértiles que permanecieron en el estudio.

Variable	Clasificación	N	% Gestación	Odds ratio	IC 95%	P
<u>Tratamiento</u>	GnRH	205	34.6 (71/205)	1.034	0.672-1.59	0.879
	Testigo	168	35.7 (60/168)	Referencia		
<u>Técnico</u>	1	112	32.1 (36/112)	0.808	0.497-1.31	0.391
	2	261	36.3 (95/261)	Referencia		

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la aplicación de dos inyecciones de GnRH, en los días 5 y 12 posteriores a la IA, no incrementó el porcentaje de gestación en vaquillas de primer servicio inseminadas con semen sexado. Estos son los primeros datos derivados de un experimento en que se ha aplicado más de una vez la GnRH o sus análogos después de la IA en vaquillas, por tanto, no es posible comparar los resultados aquí generados con otros derivados de tratamientos similares. No obstante los resultados aquí reportados apoyan los de estudios previos en los cuales, no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de gestación de vaquillas tratadas con una sola aplicación de GnRH o sus análogos (días 5-6, Schmitt *et al.*, 1996; o días 11-13, Rettmer *et al.*, 1992a; Lewis *et al.*, 1990; Franco *et al.*, 2006).

Se esperaba que las vaquillas que recibieran la doble aplicación de GnRH tuvieran un mayor porcentaje de gestación que las Testigo al día 45, porque se especuló que con este enfoque se resolverían los problemas fisiopatológicos que no se corrigen con una sola aplicación de GnRH, ya sea en los días 4 a 6 u 11 a 14 post IA; ya que la evidencia experimental (Cuadro 2) indica que el tratamiento con GnRH en los días 4 a 6 u 11 a 14 después de la IA aumenta o no altera el porcentaje de gestación en hembras bovinas y que en ocasiones, al aplicar la hormona en los días 11 a 14 post servicio, decrece dicha variable de respuesta (Cuadro 2). Sin embargo, no sucedió así y los problemas asociados con la baja tasa de gestación en las vaquillas, persistieron.

Al respecto, Peters *et al.* (2000) realizaron un meta-análisis de artículos en los que se reportan resultados de la tasa de gestación en hembras bovinas tratadas una sola vez con GnRH o sus análogos entre los días 11 y 14 después de la IA, encontrando una gran variación, ya que la tasa de gestación en animales tratados con GnRH fue sumamente variable, de 0 a 22%. Por tanto, como se indicó en el párrafo anterior, la GnRH también puede reducir el desempeño reproductivo. Esta gran variación en respuesta a la GnRH se atribuye a factores, tales como la edad y condición corporal de las vaquillas (Seidel y Schenk, 2008), tipo de estro (sincronizado hormonalmente o natural), al grado de desarrollo folicular y a las

características de las oleadas foliculares de las vaquillas (Ginther *et al.*, 1989; Knopf *et al.*, 1989; Peters *et al.*, 2000; Sartori *et al.*, 2001; Franco *et al.*, 2006). En estas condiciones, y considerando la naturaleza diversa de factores que pueden modular la respuesta a una o dos aplicaciones de GnRH después de la IA, es explicable que los resultados aquí generados no contribuyan a aclarar el por qué en ocasiones la GnRH aplicada los días 5 a 6 u 11 a 12 después del servicio, incrementa el porcentaje de gestación y porqué en otras no lo hace, ya que desafortunadamente, en el presente trabajo no hubo disponibilidad de datos que pudieran contribuir a explicar dicha variación, tales como la condición corporal, el peso corporal y la edad exacta de los animales, entre otros. Consecuentemente este tópico permanece sin aclarar.

Por otro lado, existen varios estudios que muestran que una de las fuentes más importantes de variación en el porcentaje de gestación de vacas y vaquillas inseminadas con semen sexado es el factor toro (Seidel y Schenk, 2008; Underwood *et al.*, 2010; DeJarnette *et al.*, 2008). Seidel y Schenk. (2008) atribuyen la gran variación en fertilidad cuando se usa semen sexado a que los espermatozoides de algunos toros toleran menos el estrés del proceso de sexado que de otros. No obstante, existen trabajos efectuados con semen sexado en los que no se ha encontrado una diferencia significativa entre toros donadores del semen (Schenk *et al.*, 2009; Funston y Meyer, 2012). Quizá una causa de los resultados contrastantes es que la mayoría de los toros destinados a experimentos de semen sexado han sido seleccionados por la buena calidad del semen, según lo determinado por ensayos *in vitro* (Seidel y Schenk, 2008).

Independientemente de las ausencia de variación entre toros en nuestro estudio, es factible que existan descuidos tanto por parte del personal que labora en el establo como por los profesionales que prestan asesoría especializada al mismo, ya que no se percataron después de 18 ó 48 servicios que algunos toros eran infértiles o subfértiles. De manera similar, no se contó con suficiente información del origen del semen, ni fué posible examinar muestras de semen proveniente de algunas pajillas de los diferentes toros aquí utilizados.

Consecuentemente no se puede saber si el semen de los toros subfértiles e infértiles era defectuoso de origen (empresa comercializadora de semen y/o distribuidores) o bien si ocurrió un mal manejo del semen a nivel de establo. Lo anterior es posible, ya que en estudios donde los investigadores que procesaron el semen sexado y se involucraron de manera importante en la ejecución del experimento en cuatro hatos comerciales, las condiciones de manejo, incluyendo la calidad en la detección del estro, fueron factores críticos que influyeron en el porcentaje de gestación, de tal manera que las diferencias entre granja y granja fueron mucho mayores que cualquier otro efecto asociado con el procedimiento de sexado del semen (Seidel y Schenk, 2008).

Debido a la inconsistencia observada en la gran cantidad de trabajos aquí revisados en los que se aplicó una sola vez la GnRH y de la ausencia de respuesta con la doble aplicación de la hormona en el presente estudio, es posible proponer que las relativamente bajas tasas de gestación obtenidas con semen sexado son adjudicables al semen, y que consecuentemente los esfuerzos para incrementar la fertilidad cuando se insemina con dicho tipo de semen, deberán enfocarse a mejorar la tecnología de sexado y no a corregir supuestos problemas en las hembras inseminadas.

8. CONCLUSIONES

Se concluye que la inyección de GnRH aplicada en los días 5 y 12 después de la inseminación artificial con semen sexado, no aumenta el porcentaje de gestación en vaquillas Holstein de primer servicio, inseminadas con semen sexado. Además, los factores toro e inseminador, no contribuyeron a explicar la variación en el porcentaje de gestación de las vaquillas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, H. (2014). Fertility of Commercial Sexed Semen and the Economic Analyses of its Application in Holstein Heifers. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 2, 535-542.
- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., and Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72-80.
- Ahmad, N., Schrick, F. N., Butcher, R. L., and Inskeep, E. K. (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction* 52, 1129-1135.
- Alexander, B. M., Johnson, M. S., Guardia, R. O., Van de Graaf, W. L., Senger, P. L., and Sasser, R. G. (1995). Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology*, 43, 551-556.
- Alnimer, M. A., and Lubbaddeh, W. F. (2008). Effect of progesterone (P4) intravaginal device (CIDR) to reduce embryonic loss and to synchronize return to oestrus of previously timed inseminated lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 107, 36-47.
- An, L., Wu, Z. H., Wu, Y. F., Zhang, X. L., Liu, X., Zhu, Y. B., Cheng, W. M., Gao, H. M., Guo, M., and Tian, J. H. (2010). Fertility in single-ovulating and superovulated dairy heifers after Insemination with low dose sex-sorted sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 45, e344-e350.
- Andersson, M., Taponen, J., Koskinen, E., and Dahlbom, M. (2004). Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology* 61, 1583-1588.
- Arruda, R., Celeghini, E., Alonso, M., Carvalho, H., Lemes, K., Silva, D., Rodriguez, S., and Affonso, F. (2012). Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. *Animal Reproduction* 9, 345-53.
- Arthur, G. H. (1991-a). Ciclo estral y su control. En: Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. G.H. Arthur, D.E. Noakes y H. Pearson (eds.). 6° Edición N.Y. Interamericana. pp. 5-10.
- Arthur, G. H. (1975). The oestrous cycle and its control. In: Veterinary Obstetrics. Edited by G. H. Arthur. Baillière Tindall. London. pp. 1-31.
- Ataman, M. B., Erdem, H., Bülbül, B., Ümütlü, S., and Çolak, M. (2011). The effect of buserelin injection 12 days after insemination on selected reproductive characteristics in cows. *Acta Veterinaria Brno* 80, 171-177.
- Ayalon, N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 483-493.

Barnes, F. L. (2000). The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, 53, 649-658.

Bartolome, J. A., Kamimura, S., Silvestre, F., Arteche, A. C. M., Trigg, T., and Thatcher, W. W. (2006). The use of a deslorelin implant (GnRH agonist) during the late embryonic period to reduce pregnancy loss. *Theriogenology* 65, 1443-1453.

Bartolome, J. A., Melendez, P., Kelbert, D., Swift, K., McHale, J., Hernandez, J., Silvestre, F., Risco, C. A., Arteche, A. C. M., Thatcher, W. W., and Archbald, L. F. (2005). Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63, 1026-1037.

Berg, D. K., van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M., and Pfeffer, P. L. (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 73, 250-260.

Bisinotto, R. S., Lean, I. J., Thatcher, W. W., and Santos, J. E. P. (2015). Meta-analysis of progesterone supplementation during timed artificial insemination programs in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 2472-2487.

Bodmer, M., Janett, F., Hässig, M., Daas, N. d., Reichert, P., and Thun, R. (2005). Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64, 1647-1655.

Boe-Hansen, G. B., Morris, I. D., Ersbøll, A. K., Greve, T., and Christensen, P. (2005). DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology* 63, 1789-1802.

BonDurant, R. H. (2007). Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology* 68, 461-473.

Borchersen, S., and Peacock, M. (2009). Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology* 71, 59-63.

Butler, W. R. (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81, 2533-2539.

Butler, W.R. and Smith R.D. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 72: 767-783.

Cabrera, V. (2009). When to use sexed semen on heifers. *Dairy Cattle Reproduction Conference*, 1-10.

Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M. A., Evans A. C. O., Kenny D. A., Roche J. F., Lonergan P. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 20, 368-375.

Cerchiaro, I., Cassandro, M., Dal Zotto, R., Carnier, P., and Gallo, L. (2007). A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. *Journal of Dairy Science* 90, 2538-2542.

Cerri, R. L. A., Rutigliano, H. M., Chebel, R. C., and Santos, J. E. P. (2009). Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 137, 813-823.

Conn P.M. and Crowley W.F. (1991). Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *New England Journal of Medicine* 324: 93-103.

Cooke, J. S., Cheng, Z., Bourne, N. E., and Wathes, D. C. (2013). Association between growth rates, age at first calving and subsequent fertility, milk production and survival in Holstein-Friesian heifers. *Open Journal of Animal Sciences* 03, 1-12.

Chebel, R. C., Guagnini, F. S., Santos, J. E. P., Fetrow, J. P., and Lima, J. R. (2010). Sex-sorted semen for dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. *Journal of Dairy Science* 93, 2496-2507.

Chenault, J.R., Kratzer, D.D., Rzepkowski, R.A., Goodwin, M.C. (1990). LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology* 34:81-98.

D'Occhio, M. J., Fordyce, G., Whyte, T. R., Aspden, W. J., and Trigg, T. E. (2000). Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproduction Science* 60, 433-442.

De Graaf, S. P., Beilby, K. H., Underwood, S. L., Evans, G., and Maxwell, W. M. C. (2009). Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology* 71, 89-97.

De Rensis, F., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., and Techakumpu, M. (2010). Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. *Theriogenology* 73, 1001-1008.

De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., and Lopez-Gatius, F. (2008). Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 69, 1077-1082.

De Vries, A. (2010). Economics of Using Sexed Semen. Advances in dairy technology: proceedings of the sexed semen. *Western Canadian Dairy Seminar*. 22, 357-370.

DeJarnette, J. M., Leach, M. A., Nebel, R. L., Marshall, C. E., McCleary, C. R., and Moreno, J. F. (2011). Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of Dairy Science* 94, 3477-3483.

DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., and Marshall, C. E. (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71, 49-58.

DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., Marshall, C. E., Moreno, J. F., McCleary, C. R., and Lenz, R. W. (2008). Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. *Journal of Dairy Science* 91, 1778-1785.

Diaz, T., Schmitt, E. J., de la Sota, R. L., Thatcher, M. J., and Thatcher, W. W. (1998). Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *Journal of animal science* 76, 1929-1936.

Dirandeh, E. R., A. Shohreh B. (2014). Effect of GnRH injection at day 6 and 12 after insemination on fertility of Holstein. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2, 125-131.

Diskin, M. G., Austin, E. J., and Roche, J. F. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 211-228.

Diskin, M. G., and J. M. Sreenan. (1980). Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction Fertility*. 59:463-468.

Diskin, M. G., and Morris, D. G. (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 260-267.

Diskin, M. G., Murphy, J. J., and Sreenan, J. M. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 96, 297-311.

Diskin, M. G., Parr, M. H., and Morris, D. G. (2011). Embryo death in cattle: an update. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 244-251.

Dunne, L. D., Diskin, M. G., and Sreenan, J. M. (2000). Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science* 58, 39-44.

Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., and Warnick, L. D. (1998). Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System. *Journal of Dairy Science* 81, 1874-1882.

Espinosa-Cervantes, R., and Córdova-Izquierdo, A. (2013). Sexing sperm of domestic animals. *Tropical Animal Health and Production* 45, 1-8.

Ettema, J. F., and Santos, J. E. P. (2004). Impact of Age at Calving on Lactation, Reproduction, Health, and Income in First-Parity Holsteins on Commercial Farms. *Journal of Dairy Science* 87, 2730-2742.

Franco, M., Thompson, P. M., Brad, A. M., and Hansen, P. J. (2006). Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* 66, 945-954.

Fink, G. (1988). Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil, E., Neill, J., eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, Pp. 1349-1377.

Foote, R. H. (1978). Time of artificial insemination and fertility in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 62:355–358.

Forar, A.L., Gay, J.M., Hancock, D.D., Gay, C.C. (1996). Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. *Theriogenology* 45:1502-1513.

Funston, R. N., Lipsey, R. J., Geary, T. W., and Roberts, A. J. (2005). Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *Journal of Animal Science* 83, 1403-1405.

Funston, R. N., and Meyer, T. L. (2012). Evaluating conventional and sexed semen in a commercial beef heifer development program. *The Professional Animal Scientist*, 28, 560-563.

Freeman, M. E., (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, NJD (ed.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 2327-2388.

Fricke. P. M. (2003). Heifer Reproduction. In: *Raising Dairy Replacements*. Midwest Plan Service. Ames, IA, pp. 77-83.

Fricke, P. M., Reynolds, L. P., and Redmer, D. A. (1993). Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. *Journal of animal science* 71, 1242-1246.

Frijters, A. C. J., Mullaart, E., Roelofs, R. M. G., van Hoorne, R. P., Moreno, J. F., Moreno, O., and Merton, J. S. (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71, 64-67.

Gabler, M. T., Tozer, P. R., and Heinrichs, A. J. (2000). Development of a Cost Analysis Spreadsheet for Calculating the Costs to Raise a Replacement Dairy Heifer. *Journal of Dairy Science* 83, 1104-1109.

Garner, D. L. (2009). Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology* 71, 11-21.

Garner, D. L., and Seidel, G. E. (2003). Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science* 83, 375-384.

Garnsworthy PC (2005). Modern calves and heifers: challenges for rearing systems. In *Calf and heifer rearing: principles of rearing the modern dairy heifer from calf to calving* (ed. PC Garnsworthy), pp. 1–11. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Garnsworthy PC (2007). Body condition score in dairy cows: targets for production and fertility. In *Recent advances in animal nutrition – 2006* (ed. PC Garnsworthy and J Wiseman), pp. 61–86. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Garnsworthy, P. C., Sinclair, K. D., and Webb, R. (2008). Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal* 2, 1144-1152.

Geary, T. (2005). Management strategies to reduce embryonic loss. In "Range Beef Cow Symposium", pp. 36.

Geary, T. W., Smith, M. F., MacNeil, M. D., Day, M. L., Bridges, G. A., Perry, G. A., Abreu, F. M., Atkins, J. A., Pohler, K. G., Jinks, E. M., and Madsen, C. A. (2013). Influence of follicular characteristics at ovulation on early embryonic survival. *Journal of Animal Science* 91, 3014-3021.

Geisert RD, Zavy MT, Biggers BG, Garrett JE, Wetterman RP, (1992). Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. *Animal Reproduction Science* 16, 11–25.

Ginther, O. J., Knopf, L., and Kastelic, J. P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* 87, 223-230.

Goodman and Gilman. (1990). *The pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press. 8a edit.

Goodman, R.L, Karsch, F.J. (1980). Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 107:1286-1290.

Hanlon, D. W., Jarratt, G. M., Davidson, P. J., Millar, A. J., and Douglas, V. L. (2005). The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology* 63, 1938-1945.

Hansen, P. J. (2002). Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *Journal of Animal Science* 80, 33-44.

Haughian, J.M., and Wiltbank, M.C. (2002). GnRH: from physiology to "synch"-ology. Annual Conference and Symposium, Society for Theriogenology, American College of Theriogenologists. Pp. 221-235.

Head, H. H. (1992). Heifer performance standards: rearing systems, growth rates and lactation. In: *Large Herd Dairy Management*. Van Horn HH, Wilcox CJ (Eds). American Dairy Science Association, Champaign, IL, p. 422.

Healy, A. A., House, J. K., and Thomson, P. C. (2013). Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 96, 1905-1914.

Heinrichs, A. J. (1993). Raising Dairy Replacements to Meet the Needs of the 21st Century. *Journal of Dairy Science* 76, 3179-3187.

Helmer, S. D., and J. H. Britt. (1985). Mounting behavior as affected by stage of estrous cycle in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 68:1290–1296.

Herbert, C. A., and Trigg, T. E. (2005). Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science* 88, 141-153.

Herbison, A.E. (1997). Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev. Reprod.* 2:1-6.

Hosmer DW, Lemeshow S. Applied logistic regression. Second Edition. John Wiley and Sons, Inc. 2000.

Howard, J. M., Manzo, R., Dalton, J. C., Frago, F., and Ahmadzadeh, A. (2006). Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 95, 224-233.

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.

Hunter, R. H. F. (1985). Fertility in cattle: basic reasons why late insemination must be avoided. In *Animal Breeding Abstract* 53, 83-87.

Inskeep, E. K. (2002). Factors that affect embryonic survival in the cow: Application of technology to improve calf crop. Pages 255– 279 in *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. M. J. Fields, R. S. Sand, and J. V. Yelich, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Inskeep EK, and Dailey RA. (2005). Embryonic death in cattle. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 21, 437–61.

Jubb, T. F., Abhayaratne, D., Malmos, J., and Anderson, G. A. (1990). Failure of an intramuscular injection of an analogue of gonadotrophin-releasing hormone 11 to 13 days after insemination to increase pregnancy rates in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal* 67, 359-361.

Kaiser, U. B., Conn, P. M., and Chin, W. W. (1997). Studies of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Action Using GnRH Receptor-Expressing Pituitary Cell Lines. *Endocrine Reviews* 18, 46-70.

Karakaya, E., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Keskin, A., Alkan, A., Tasdemir, U., Santos, J. E. P., and Gumen, A. (2014). Fertility in Dairy Cows After Artificial Insemination Using Sex-Sorted Sperm or Conventional Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 333-337.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47, 703-714.

King, W. A. (1985). Intrinsic embryonic factors that may affect survival after transfer. *Theriogenology* 23:161-174.

Khoramian, B., Farzaneh, N., Talebkhan Garoussi, M., and Mohri, M. (2011). Comparison of the effects of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin or progesterone on pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder dairy cows. *Research in Veterinary Science* 90, 312-315.

Knopf, L., Kastelic, J. P., Schallenberger, E., and Ginther, O. J. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 6, 111-119.

Kochoski, L., Filipov, Z., Joshevski, I., Ilievski, S., and Davkov, F. (2015). First results from insemination with sex-sorted semen in dairy heifers in Macedonia. *Macedonian Veterinary Review* 38, 107-111.

Kuhn, M. T., Hutchison, J. L., and Wiggans, G. R. (2006). Characterization of Holstein Heifer Fertility in the United States. *Journal of Dairy Science* 89, 4907-4920.

Kurykin, J., Jaakma, Ü., Jalakas, M., Aidnik, M., Waldmann, A., and Majas, L. (2007). Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 67, 754-759.

Lamb GC, Miller BL, Traffas V, Corah LR. (1997). Estrus detection, first service conception, and embryonic death in beef heifers synchronized with MGA and prostaglandin. *Kansas AES Reports of Progress* 783:97.

Larson SF, Butler WR, Currie WB. (2007). Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 102, 172-179.

Leslie, K. E., Bosu, W. T., Lissemore, K., and Kelton, D. (1986). The effects of gonadotrophin releasing hormone administration four days after insemination on first-service conception rates and corpus luteum function in dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* 50, 184-187.

Lewis, G. S., Caldwell, D. W., Rexroad Jr, C. E., Dowlen, H. H., and Owen, J. R. (1990). Effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on pregnancy rate in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 73, 66-72.

López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Santolaria, P., Yániz, J., Nogareda, C., and López-Béjar, M. (2006a). Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 65, 1678-1689.

López-Gatius, F., Santolaria, P., Martino, A., Delétang, F., and De Rensis, F. (2006b). The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. *Theriogenology* 65, 820-830.

López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., and Hunter, R. H. F. (2004). Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. *Theriogenology* 62, 1529-1535.

Lopez, H., Caraviello, D. Z., Satter, L. D., Fricke, P. M., and Wiltbank, M. C. (2005). Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88, 2783-2793.

Lopez, H., Satter, L. D., and Wiltbank, M. C. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81, 209-223.

Losinger, W. C., and Heinrichs, A. J. (1997). An analysis of age and body weight at first calving for Holsteins in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* 32, 193-205.

Lucena, J. A., Kenyon, A. G., Reynolds, J. P., Moreno, J. F., Lenz, R. W., Carroll, D., Lehenbauer, T. W., Champagne, J. D., and Aly, S. S. (2014). Comparison between low-dose, high-sort and high-dose, low-sort semen on conception and calf sex ratio in Jersey heifers and cows. *Journal of Dairy Science* 97, 1782-1789.

Lucy, M. C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science* 84, 1277-1293.

Lucy, M. C., McDougall, S., and Nation, D. P. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science* 82–83, 495-512.

Maatje, K., S. H. Loeffler, and B. Engel. (1997). Optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *Journal of Dairy Science* 80: 1098–1105.

Macmillan, K. L., and Peterson, A. J. (1993). Current Advances in the Manipulation of Reproductive Function in Domestic Animals A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Animal Reproduction Science* 33, 1-25.

Mann, G. E., Fray, M. D., and Lamming, G. E. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *The Veterinary Journal* 171, 500-503.

Mann, G. E., Green, M. P., Sinclair, K. D., Demmers, K. J., Fray, M. D., Gutierrez, C. G., Garnsworthy, P. C., and Webb, R. (2003). Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Animal Reproduction Science* 79, 71-79.

Mann, G. E., and Lamming, G. E. (1999). The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 269-274.

Mann GE, and Lamming GE. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175-180.

Martinez, M. F., Adams, G. P., Bergfelt, D. R., Kastelic, J. P., and Mapletoft, R. J. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science* 57, 23-33.

Maxwell, W. M. C., and Johnson, L. A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353-1362.

Mee M.O., Stevenson J.S., Alexander B.M. and Sasser R.G. (1993) Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17beta, pregnancy- specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and in vitro production of progesterone in dairy cows. *Journal of Animal Science* 71: 185-198.

McCulloch, K., J. Parsons, and I. Noa Roman- Muniz. (2012). Extension's Guide to Sexed Semen: A Dairy Case Study. *Journal of Extension*. 50:4 Article 4, RIB7.

McNeill, R. E., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Cairns, M. T., Fitzpatrick, R., Smith, T. J., and Morris, D. G. (2006). Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 573-583.

Morales, R. S., Cerón, J. H., Trejo, G. R., y Fuentes, R. P. (2000). Comparación del porcentaje de concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas Holstein. *Veterinaria México* 31, 179.

Morris, D., and Diskin, M. (2008). Effect of progesterone on embryo survival. *Animal: an International Journal of Animal bioscience*, 2, 1112.

Muir, M. R., Stannett, A., Offer, J. E., Ball, P. J. H., Taylor, C., and Logue, D. N. (1998). Oestrus synchronisation combined with buserelin administration in beef cattle. *Veterinary Record* 143, 143-144.

Musilová, D., Bartoněk, J., Čech, S., Páleník, T., and Doležel, R. (2014). Induction of accessory corpus luteum in cows by gonadotropin-releasing hormone administered after insemination. *Acta Veterinaria Brno* 83, 107-111.

Nebel, R. L., W. L. Walker, M. L. McGilliard, C. H. Allen, and G. S. Heckman. (1994). Timing of insemination of dairy cows: fixed time once daily versus morning and afternoon. *Journal of Dairy Science* 77:3185–3191.

Nishigai M, Takamura A, Kamomae H, Tanaka T, and Kaneda Y. (2001). The effect of Human Chorionic Gonadotropin on the development and function of bovine corpus luteum. *Journal of Reproduction Development* 47, 283-294.

Okuda K, Miyamoto Y, and Skarzynski DJ. (2002). Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 255-264.

Perry, G. A., Smith, M. F., Lucy, M. C., Green, J. A., Parks, T. E., MacNeil, M. D., Roberts, A. J., and Geary, T. W. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5268-5273.

Peters, A.R. (1996). Embryo mortality in the cow. *Animal Breeding Abstracts* 64, 587–598.

Peters, A. R., Martinez, T. A., and Cook, A. J. C. (2000). A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11–14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.

Prieto-Gómez, B., and Velázquez-Paniagua, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. Monografía. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 45:252-257.

Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C., and Mao, I. L. (2004). Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86, 125-135.

Rankin, T. A., Smith, W. R., Shanks, R. D., and Lodge, J. R. (1992). Timing of Insemination in Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science* 75, 2840-2845.

Rasmussen, S., Block, J., Seidel Jr, G. E., Brink, Z., McSweeney, K., Farin, P. W., Bonilla, L., and Hansen, P. J. (2013). Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology* 79, 453-461.

Rath, D., Moench-Tegeder, G., Taylor, U., and Johnson, L. A. (2009). Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71, 22-29.

Rettmer, I., Stevenson, J. S., and Corah, L. R. (1992a). Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. *Journal of Animal Science* 70, 508-517.

Rivera RM, and Hansen PJ. (2001). Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 121: 107-115.

Rivera, H., H. Lopez, and P. M. Fricke. (2004). Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed AI or AI after removed tail chalk. *Journal of Dairy Science* In press 87; 2051-2061.

Rizos, D., Carter, F., Besenfelder, U., Havlicek, V., and Lonergan, P. (2010). Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 1022-9.

Rodger L.D. and Stormshak F. (1986) Gonadotropin-releasing hormone-induced alteration of bovine corpus luteum function. *Biology of Reproduction* 35: 149-156.

Ryan, D. P., Kopel, E., Boland, M. P., and Godke, R. A. (1991). Pregnancy rates in dairy cows following the administration of a GnRH analogue at the time of artificial insemination or at mid-cycle post insemination. *Theriogenology* 36, 367-377.

Ryan, D. P., Snijders, S., Condon, T., Greal, M., Sreenan, J., and O'Farrell, K. J. (1994). Endocrine and ovarian responses and pregnancy rates in dairy cows following the administration of a gonadotrophin releasing hormone analog at the time of artificial insemination or at mid-cycle post insemination. *Animal Reproduction Science* 34, 179-191.

Sá Filho, M. F., Ayres, H., Ferreira, R. M., Nichi, M., Fosado, M., Campos Filho, E. P., and Baruselli, P. S. (2010). Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* 74, 1636-1642.

Sainsbury, K. (2000). The hypothalamo-pituitary axis. The Victoria University of Manchester. http://www.elp.manchester.ac.uk/pub_projects/2000/mnby6kas/homepage.htm.

Santos, J., RS Bisinotto, ES Ribeiro, FS Lima, LF Greco, CR Staples, and Thatcher, W. (2010). Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Society Reproductive Fertility Supplement*, 67, 387.

Santos, J. E., Thatcher, W. W., Pool, L., and Overton, M. W. (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of animal science* 79, 2881-2894.

- Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C. P., Ginther, O. J., and Wiltbank, M. C. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction* 65, 1403-1409.
- Sartori, R., Souza, A. H., Guenther, J. N., Caraviello, D. Z., Geiger, L. N., Schenk, J. L., and Wiltbank, M. C. (2004). Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers. *Animal Reproduction* 1, 86-90.
- Schenk, J. L., Cran, D. G., Everett, R. W., and Seidel, G. E. (2009). Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71, 717-728.
- Schmitt, E., Diaz, T., Barros, C., De la Sota, R., Drost, M., Fredriksson, E., Staples, C., Thorner, R., and Thatcher, W. (1996). Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science* 74, 1074-1083.
- Seidel, G. E. (2009). Sperm sexing technology—The transition to commercial application: An introduction to the symposium “Update on sexing mammalian sperm”. *Theriogenology* 71, 1-3.
- Seidel, G., and Garner, D. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124, 733-743.
- Seidel, G. E., and Schenk, J. L. (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 105, 129-138.
- Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., and Cran, D. G. (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1407-1420.
- Senger, P. L. (1994). The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *Journal of Dairy Science* 77:2745–2753.
- Shaham-Albalancy, A., Folman, Y., Kaim, M., Rosenberg, M., and Wolfenson, D. (2001). Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF (2alpha) secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction* 122, 643-648.
- Sianangama, P. C., and Rajamahendran, R. (1996). Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. *Theriogenology* 45, 583-592.
- Silke, V., Diskin, M.G., Kenny, D.A., Boland, M.P., Dillon, P., Mee, J.F., and Sreenan, J.M., (2001). Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 15, 1–12.

Smith, M.W., and Stevenson, J.S., (1995). Fate of the dominant follicle, embryonal survival and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F2a and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *Animal Science* 73, 3743–3751.

Spencer T.E., Johnson G.A., Burghart R.C., and Bazer F.W., (2004). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction* 71, 2-10.

Sreenan JM, Diskin MG, and Morris DG. (2001). Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ *British Society of Animal Science* 93-104.

Sterry, R. A., Welle, M. L., and Fricke, P. M. (2006). Treatment with Gonadotropin-Releasing Hormone After First Timed Artificial Insemination Improves Fertility in Noncycling Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 89, 4237-4245.

Stevenson, J. S. (2001). Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *Journal of Dairy Science* 84, E128-E143.

Stevenson, J. S., Hoffman, D. P., Nichols, D. A., McKee, R. M., and Krehbiel, C. L. (1997). Fertility in estrus-cycling and noncycling virgin heifers and suckled beef cows after induced ovulation. *Journal of animal science*, 75, 1343-1350.

Szenci, O., Takács, E., Sulon, J., Sousa, N. M. d., and Beckers, J.-F. (2006). Evaluation of GnRH treatment 12 days after AI in the reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 66, 1811-1815.

Tanriverdi, F., Silveira, L., MacColl, G., and Bouloux, P. (2003). The hypothalamic pituitary- gonadal axis: immune function and autoimmunity. *Journal of Endocrinology* 176:293-304.

Tefera, M., Chaffaux, S., Thibier, M., and Humblot, P. (2001). A short note: lack of effect of post-AI hCG or GnRH treatment on embryonic mortality in dairy cattle. *Livestock Production Science* 71, 277-281.

Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Sharp, D.C., and Roberts, R.M., (1986). Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pig and horses. *Journal of Animal Science* 62, 25–46.

Thatcher, W. W., Bilby, T. R., Bartolome, J. A., Silvestre, F., Staples, C. R., and Santos, J. E. P. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44.

Thatcher, W. W., Binelli, M., Burke, J., Staples, C. R., Ambrose, J. D., and Coelho, S. (1997). Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology* 47, 131-140.

Thatcher, W. W., Drost, M., Savio, J. D., Macmillan, K. L., Entwistle, K. W., Schmitt, E. J., De la Sota, R. L., and Morris, G. R. (1993a). Current Advances in the Manipulation of Reproductive Function in Domestic Animals New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal Reproduction Science* 33, 27-49.

Thatcher, W. W., Drost, M., Savio, J. D., Macmillan, K. L., Entwistle, K. W., Schmitt, E. J., De la Sota, R. L., and Morris, G. R. (1993b). New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal Reproduction Science* 33, 27-49.

Thatcher, W. W., Moreira, F., Santos, J. E. P., Mattos, R. C., Lopes, F. L., Pancarci, S. M., and Risco, C. A. (2000). Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55, 75-89.

Thatcher, W. W., Moreira, F., Santos, J. E. P., Mattos, R. C., Lopes, F. L., Pancarci, S. M., and Risco, C. A. (2001). Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55, 75-89.

Trimberger, G.W. (1948). Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. University of Nebraska Agricultural Experiment Station Research Bulletin 153.

Turkstra, J., and Melen, R. (2006). Active immunisation against gonadotropin releasing hormone, an active tool to block the fertility axis in mammals. *Veterinary Sciences Tomorrow*. <http://www.vetscite.org/publish/articles/000062/index.html>.

Underwood, S. L., Bathgate, R., Ebsworth, M., Maxwell, W. M. C., and Evans, G. (2010). Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Animal Reproduction Science* 118, 7-12.

Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Lacerda, J.A., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C. (1997). Pregnancy rate, pregnancy loss, response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biology of Reproduction* 56: 140.

Walton, J. S., Halbert, G. W., Robinson, N. A., and Leslie, K. E. (1990). Effects of progesterone and human chorionic gonadotrophin administration five days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* 54, 305-308.

Wathes, D., Pollott, G., Johnson, K., Richardson, H., and Cooke, J. (2014). Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal* 8, 91-104.

Willard, S., Gandy, S., Bowers, S., Graves, K., Elias, A., and Whisnant, C. (2003). The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 59, 1799-1810.

Wilmut, I., and R.H.F. Hunter. (1984). Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reproduction Nutrition Development* 24, 461–468.

Zarco-Quintero, L. (1990). Factores que afectan los resultados de la inseminación artificial en el bovino lechero. *Veterinaria México* 21, 235-240.