

MORTALIDAD EMBRIONARIA EN BOVINOS PARA CARNE

¿Es posible disminuirla?

Butler, H.M.¹, Alberio, R.H.², Butler, A.¹, Etcheverry, E.¹

(1) SincrovacSRL.

(2) Fac. Ciencias Agrarias.UNMP



Horacio Butler

Médico Veterinario egresado de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA en 1979. Post grado: Ciclo 1 Sanidad Animal 1981. Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMP).

III Curso Internacional de reproducción bovina: Madrid España 1982.

Ex Investigador INTA Balcarce 1980-86.

Ex Docente de la escuela de post grado UNMP.

Ex Docente de la FCV-UNCPBA y de FCV-UBA (área reproducción bovina).

Asesor de tesis de grado y de Maestría de la Unidad Integrada UNMP-INTA Balcarce y para el grado de Ing Agr. UNMP-INTA Balcarce.

Autor y coautor de 90 trabajos referentes a reproducción de bovinos para carne.

Árbitro de la sección reproducción de revistas especializadas en temas de producción animal.

Asesor en reproducción y sanidad de establecimientos ganaderos de producción de carne

Socio Gerente de Sincrovac SRL

sincrovac@arnetbiz.com.ar

Introducción

La problemática de la mortalidad embrionaria fue bien revisada por Ayalon (3) y luego en nuestro país también se abordó una revisión del tema (13). En la década actual se han publicado nuevas y exhaustivas revisiones sobre la mortalidad embrionaria (2, 24, 30, 32, 33). En el presente año, Wiltbank y col. (78) publicaron una revisión muy completa referida a pérdidas embrionarias y fetales en vacas lecheras. En esta revisión se hace un extenso análisis del problema con conceptos novedosos que son tenidos en cuenta en nuestra presentación.

Del análisis de esa información surge claramente que desde que una hembra bovina reproductivamente sana recibe servicio, ocurren pérdidas que van desde fallas en la fertilización, pasando por muerte embrionaria temprana (MET1- días 0 a 25), siguiendo por

muerte embrionaria tardía (MET 2- 26 a 45) y en menor proporción por muertes fetales (entre 45 y parto esperado).

Si se considera una tasa de preñez normal promedio del 60%, los 40 puntos porcentuales de pérdidas que ocurren entre la tasa ovulatoria y la parición se puede afirmar que mayoritariamente corresponden a la MET 1 y en segundo lugar a la MET 2.

Las pérdidas de la MET 1, ocurren en su gran mayoría en forma muy temprana (entre días 8 a 12), lo que permite que la hembra vuelva a reanudar el ciclo en un intervalo regular. Las pérdidas embrionarias que ocurren más tarde, dependiendo de la edad del embrión, causarán o no un retraso en el ciclo siguiente.

En síntesis, la cantidad de pérdidas de la MET 1 que ocurren después de los 20 días es baja (entre el 7 y 10%) comparadas con las pérdidas embrionarias más tempranas, incluyendo las fallas en la fertilización (38 y 53% en vacas para carne y leche respectivamente; 23). En ambos casos habrá impacto económico tanto por mayor uso de material genético usado para inseminar como por alargamiento de los intervalos parto-preñez (32)

Recién superada esta etapa crítica de la MET 1 y MET 2, durante la cual deben evitarse interferencias ambientales tales como estrés térmico, movimientos de los animales, cambios bruscos en la alimentación, vacunaciones y todo suceso que pueda afectar esta línea tan delgada entre la sobrevivencia o muerte del embrión es que puede hacerse presentedespués de los 40-45 días, la etapa de enfermedades abortivas como IBR-BVD, Campylobacteriosis, Tricomoniasis, Brucelosis, Leptospirosis, Neosporosis, entre las principales (estos aspectos no serán motivo de esta presentación).

Retomando las etapas de MET 1 y MET 2, las causas de estas pérdidas son múltiples, comenzando por las alteraciones cromosomales, principalmente del ADN ovocitario y eventualmente del espermático, la presencia de desequilibrios endócrinos, los factores ambientales (el estrés calórico en forma predominante), factores de manejo y desbalances nutricionales en general y minerales en particular.

Por otra parte, en los últimos 15 años, la IATF ha tenido un desarrollo que se tradujo en un uso exponencial de la IA. Por diferentes motivos, luego de una IATF, en muchas circunstancias es necesario realizar un diagnóstico precoz de gestación y en otras, a este diagnóstico temprano se le sucede un segundo diagnóstico confirmatorio o de continuidad de gestación con el objeto de evaluar las posibles pérdidas.

Nuestro grupo de trabajo realiza de rutina ambos diagnósticos (aproximadamente 35 días por US y 100 días por palpación transrectal) principalmente en vaquillonas, desde hace ya varios años. En dichos estudios hemos observado sistemáticamente una pérdida embrionaria/fetal, del orden del 3 al 12%, en rodeos de vaquillonas Angus que están bajo estricto control sanitario y un adecuado manejo nutricional cuanti y cualitativo. En este sentido, la consulta realizada a profesionales en nuestro país, evalúa las pérdidas de gestación entre el primer diagnóstico realizado a los 30-35 días y el segundo diagnóstico (con fechas muy variadas), entre un 4,5% y un 15%. Si no se llevase a cabo dicho seguimiento, quedaría como resultado de gestación el obtenido en el primer diagnóstico y en consecuencia, al momento de la parición, habría un porcentaje variable de hembras que no va a parir.

Está claro que cuanto más precozmente se realice el diagnóstico de gestación, mayor será la probabilidad de que se incremente el porcentaje de pérdida, simplemente porque se abarca mayor cantidad de períodos en que puede haber pérdidas de acuerdo a lo descrito previamente.

El objetivo de esta presentaciones describir brevemente los factores involucrados en el mantenimiento de la gestación, las causas por la que se disminuye la preñez final (fallas en la

fertilización y causas de mortalidad embrionaria), para terminar mostrando nuestra casuística y evaluar alternativas para disminuir tales pérdidas.

Mantenimiento de la gestación. Factores involucrados

Para comprender las pérdidas embrionarias es fundamental tener presente los factores que intervienen en el mantenimiento de la gestación normal. Estos factores son múltiples y varían desde el desarrollo folicular y los niveles de E2 previo a la ovulación, seguido de los eventos que incluyen desde la fertilización hasta que la placentación está consolidada.

La viabilidad embrionaria es dependiente de la calidad del ovocito que va a ser ovulado, el cual está afectado entre otras causas por el folículo del que provenga. En primer lugar de su vida media, es decir si proviene de un folículo persistente o si se trata de un folículo en desarrollo, siendo el segundo de mayor fertilidad (1).

Por otra parte la fertilidad es dependiente del tamaño del folículo ovulatorio, a mayor tamaño folicular mayor será la fertilidad (62). Está claro que la optimización del tamaño preovulatorio en los programas de IATF tiene consecuencias sobre un intrincado balance entre adecuados niveles de E2 próximos a la IATF y adecuados niveles de P4 después de la misma, los cuales van a afectar tanto la fertilización como la sobrevida embrionaria temprana (75).

La calidad del ovocito es también afectada por factores exógenos tal como la temperatura ambiental que puede perpetuar sus efectos negativos sobre el ovocito durante varios meses (79).

Acontecida la ovulación, cada etapa que ocurre tanto en oviducto como en el tejido endometrial, hace que oviducto y útero sean determinantes, de diferentes maneras, en el sostenimiento de la gestación.

En el oviducto las células actúan, desde el punto de vista masculino, como reservorio de espermatozoides, participan en el proceso de capacitación, en los cambios de motilidad espermática, modulan la interacción espermatozoide-zona pelúcida durante la fertilización y evitan que suceda una polispermia. En cuanto al ovocito, las contracciones oviductales y los movimientos ciliares son esenciales para su transporte, la modificación del cúmulus y la desagregación de sus células, cambios en la zona pelúcida y cambios proteicos en el fluido oviductal, entre otros. El rol fundamental que juegan estas células está orquestado por una serie de cambios por vía genómica y no genómica y dirigidos por estrógenos y progesterona lo cual termina afectando la expresión de genes, el proteoma y las secreciones de sus células hacia el fluido oviductal, generando todo ello cambios transcripcionales de manera tal que el medio ambiente sea el adecuado para el proceso de fertilización y primeras divisiones del cigoto (19).

Transcurrida esta fase, es importante tener presente que en el bovino la adhesión y placentación no ocurren rápidamente, permaneciendo el embrión en la luz uterina hasta que se produce la adhesión. Durante este período, la sobrevivencia embrionaria está dada por la calidad del medio uterino, principalmente porque es dependiente de la nutrición histotrófica.

La señal de reconocimiento de gestación (fundamentalmente secreción de interferón tau por parte del trofoblasto) involucra las modificaciones (transcripciones) de células endometriales para que produzcan el medio "alimenticio" adecuado para la nutrición histotrófica. Esto es dependiente de los niveles de P4. Estos cambios en el histotrofo estimulados por la P4 son los responsables de la drástica elongación del embrión que ocurre a partir de los días 10 a 12(29). Por otro lado, el interferón tau no se limita a evitar la luteólisis permitiendo la secreción de P4

por un CL activo, sino que tiene también una acción inmunomoduladora evitando el rechazo inmunológico del embrión por su condición de aloinjerto (16).

Queda claro que una de las principales señales de reconocimiento de preñez es la acción del interferón tau, el cual es un protector del CL por ser antiluteolítico e indirectamente luteotrófico por la estimulación de producción de PGE2 entre el día 8-9 (4)

Siendo la calidad del medio uterino y la producción del histotrofo absolutamente dependientes de los estrógenos y progesterona, los factores que afecten la concentración de dichas hormonas afectarán la viabilidad embrionaria (11).

La primera ovulación posparto y puberal, al no estar precedida de progesterona, resulta en que el cuerpo lúteo producto de ella sea de vida media corta no dando tiempo a que el interferón tau ejerza su efecto luteotrófico. Estos CL de menor vida media se originan por una pobre población de receptores de P4 y un incremento en los receptores a Oxitocina (por ausencia de P4 previamente) que causan una prematura liberación de PGF2 α (18, 41). Esta menor fertilidad de la primera ovulación posparto no se debería únicamente a un CL de vida media corta sino también a un ovocito de menor viabilidad (10).

En resumen, la concentración de estradiol preovulatoria y el rápido incremento de los niveles de P4 son imprescindibles para ejercer una serie de cambios en el medio oviductal y uterino para que el embrión se desarrolle adecuadamente y que haya una rápida elongación. De lo contrario el embrión no será capaz de producir interferón tau en el momento apropiado, siendo éste esencial como regulador clave en el mantenimiento del CL, en la producción histotrófica y en la elongación del embrión.

Este proceso de cambios sustanciales, depende de un correcto diálogo embrión-útero-ovario y ante la más mínima falla se afectará la viabilidad embrionaria.

Factores que afectan la fertilidad temprana

Fallas de fertilización (FF)

Tal como ya lo describiera Ayalon en su revisión de 1979 (reafirmado por 23), los trabajos actuales siguen mostrando que las pérdidas tempranas no son debidas, como causa principal, a fallas de fertilización (FF). Estas son del orden del 0 al 10% utilizando semen de alta fertilidad (69) y siendo algo más alta (30%) en vacas lecheras en producción (66).

Sin embargo, en vacas lecheras sometidas a altas temperaturas ambientales, la tasa de fertilización solo fue del 55 % respecto al 100 % observado en vaquillonas (66), ya que en la vaca en producción se asocia la temperatura exterior a la temperatura de su propio metabolismo.

Santos y col. (64) realizando una revisión de la problemática que aquí tratamos de abarcar, muestran que la tasa de fecundación según diferentes autores varía en un rango amplio con una media del 75%, 98,6% y 88% en vacas para carne lactando, vacas para carne secas y vaquillonas, respectivamente. Esto sugiere que la lactancia por sí misma puede ejercer un efecto negativo en la fertilización de la vaca para carne remarcando que esto es observado en el posparto temprano y ya no más cuando la vaca lactando ha recommenzado su ciclicidad. Estos promedios son sensiblemente menores en vacas lecheras oscilando entre 76 y 78% para vacas lactando y no lactando respectivamente y del 100% en vaquillonas. Este problema en vacas lecheras está estrechamente relacionado al estrés térmico. Es así que en vacas de alta producción, aun cuando se produzca fertilización de ovocitos comprometidos, los embriones logrados tendrán una menor posibilidad de seguir su desarrollo en etapas siguientes.

Es así entonces que la FF en vacas para carne, reproductivamente sanas, con nutrición adecuada y ciclando o próximas a ello, no parece ser un problema reproductivo y esto es particularmente cierto en vaquillonas. Contrariamente, en vacas de posparto temprano, las FF juegan un rol más importante que lo habitualmente estimado, observándose más fallas en las vacas lecheras de alta producción y en situaciones climáticas adversas y en menor medida en vacas para carne amamantando. Parecería ser entonces que la lactancia podría ejercer un efecto negativo sobre la fertilización por razones y en magnitudes diferentes en vacas para carne y lecheras.

Factores causales de ME

Desde un punto de vista biológico, el organismo ha desarrollado sistemas para que el mismo sea más eficiente. La gestación y el nacimiento es un proceso de costo energético muy alto y por ello, cuanto más precozmente es eliminado un individuo defectuoso, esto derivará en un menor costo biológico respecto a que su pérdida sea más tardía. De allí que buena parte de la mortalidad embrionaria temprana en realidad constituya un filtro para que no prosigan gestaciones que no llevarán a la producción efectiva de un ser vivo apto.

La MET 1 es definida como aquella que ocurre desde la fertilización hasta el día 25. En hembras reproductivamente sanas, este es el período donde mayor tasa de pérdidas ocurre. Es decir que con un porcentaje de parición del 55%, la mayor parte del 45% de las pérdidas sería producto de fallas de fertilización y por mortalidad embrionaria quedando tasas menores de muertes fetales. Del 45% de muertes embrionarias/fetales, 7 puntos porcentuales serían causados por las FF, 25 puntos porcentuales son debidos a MET 1 y 7 puntos porcentuales por ME tardía (MET 2-días 25 al 45) y 6% fetales (23, 38).

Las causas que motivan las MET 1 están categorizadas en aquellas de origen genético (7) las de orden endócrino y por factores ambientales. De las primeras se ha hecho un comentario previamente. Con respecto a las causas de origen endócrino son varias y complejas. Se hará un breve análisis de cada hormona involucrada en este proceso.

Progesterona

Los niveles de progesterona (P4) del ciclo previo a la ovulación pueden afectar la viabilidad embrionaria. Niveles bajos de P4 previo a la luteólisis podrían afectar la fertilización así como la sobrevivencia del embrión, probablemente debido a una prematura maduración del ovocito disminuyendo la capacidad del embrión para un crecimiento y desarrollo apropiado (29). En estudios posteriores se determinó que la P4 subluteal en las últimas etapas del ciclo deprime seriamente la preñez, ya sea por afectar la fertilidad del ovocito que es ovulado (ovocito envejecido que incluye estado nuclear avanzado, irregularidad en la membrana nuclear, degeneración del cúmulus y cambios en la forma y agrupamiento de las mitocondrias, Taft citado por 37), por afectarse la sobrevivencia de los ovocitos fecundados que no pueden proseguir el desarrollo embrionario, y finalmente por afectarse la morfología y las secreciones uterinas (67).

Más adelante en esta presentación se hará referencia a la importancia de la P4 en los primeros días postfertilización.

Prostaglandina F2 α

La secreción de PgF2 α de origen endometrial por una activación anticipada de los receptores a Oxitocina, producirá un daño irreversible en el cuerpo lúteo y consecuentemente el embrión morirá. Este efecto se manifiesta por dos vías de acción: por un lado va a afectar el cuerpo lúteo postovulatorio y por lo tanto quitando el sostén necesario de P4 que requiere el embrión. Pero por otra parte a través del efecto embriotóxico directo que tiene la PGF sobre el embrión que solo puede ser eliminado con la aplicación de un antiprostaglandínico(36).

Estradiol

Esta hormona coordina eventos fisiológicos esenciales para la reproducción, tales como la manifestación del celo, el transporte espermático, la preparación de las células foliculares para su luteinización y la consecuente producción de P4; induce también la descarga de la onda ovulatoria de LH y, a nivel endometrial, induce la producción de receptores a estradiol y a P4. En consecuencia la concentración de estradiol afecta todos los factores esenciales que intervienen en una concepción exitosa siendo una de ellas la viabilidad embrionaria.

La concentración preovulatoria de estradiol cumple un rol esencial sobre la receptividad uterina del conceptus y su sobrevivencia. Una serie de trabajos realizados por Mussardy col.(53, 54, 55) y Bridges y col.(12) y resumidos por Bridges y col.(11) mostraron que la fertilidad es mayor cuando el período de proestro es más largo. La menor fertilidad que se observa en animales con proestro corto estaría asociada a la ovulación de un folículo inmaduro el cual tiene menor actividad estereoidogénica, siendo esta menor actividad más responsable que el diámetro folicular o edad del folículo sobre la fertilidad folicular y la sobrevivencia del embrión.

En esta misma línea, Jinks col. (39) observaron una correlación positiva entre el tamaño del folículo y la concentración de estradiol y esto estuvo asociado a una producción de embriones de mejor calidad para ser transferidos como así también a una mayor tasa de preñez en las receptoras que tenían un mayor tamaño folicular y mayores niveles de estradiol. En ese mismo trabajo, observaron que cuando aplicaron ECP 24 horas previas a la IATF hubo una mejora significativa en la preñez en las vacas que ovularon un folículo pequeño (< 12,2 mm).

Es así que la menor fertilidad sería causada por una menor concentración de estrógenos y un CL de menor producción de P4. De hecho, los trabajos muestran que con un folículo dominante ovulatorio (FDO) de 13,6 mm y una duración del proestro de 2,2 días, la preñez fue de 57%, mientras que con un FDO de 10,7 mm pero una duración del proestro de 3,3 días, la preñez fue de 76%. La causa de esta menor fertilidad fue la menor producción de estradiol y P4 y esta alteración en la concentración de hormonas es capaz de disminuir la capacidad del útero para sostener un embrión viable.

Factores ambientales

Dentro de los factores ambientales, la nutrición y el estrés térmico son los principales causantes, afectando el establecimiento de la preñez y generando MET 1.

La **nutrición** afecta la fertilidad de diferentes maneras. En vaca, hay una fuerte correlación entre el BEN y lactancia temprana con la reaparición de la ovulación posparto (15). Con bajas dietas puede no ocurrir ovulación con falta de crecimiento folicular y aumento de atresia. La alternancia de ondas foliculares sin ovulaciones frecuente en vacas para carne en pobre condición corporal (70). El flujo sanguíneo hepático y el clearance de P4 han mostrado estar positivamente correlacionados y afectados por el incremento de energía consumida en vacas lecheras (63). Baja P4 después de la fertilización puede reducir la fertilidad (44). Las concentraciones de P4 y el interferon-tau embrionario mostraron estar positivamente

correlacionados. Entonces, cambios menores en los niveles de P4 durante el período inicial del desarrollo embrionario pueden afectar su desarrollo alterando la secreción del factor antiluteolítico lo que sería crítico para la sobrevivencia del embrión (50). Murphy y col. (52) informaron que vaquillonas con pobre alimentación tienen folículos de menor tamaño y su folículo dominante acorta su vida. La restricción aguda durante 12 días no solo reduce el crecimiento folicular y su tamaño máximo sino que puede anular la ovulación del folículo dominante después de provocar luteólisis con PGF2alfa (47). El incremento en tamaño folicular tendrá efectos benéficos sobre la calidad ovocitaria (45) y la función luteal (51) lo que resultará en mayores tasas de preñez, ya que los aumentos de P4 antes y durante el servicio son asociados con mayores tasas de preñez (14). Por el contrario, no son muy evidentes ni han podido ser actualmente muy bien determinados, los efectos de la nutrición sobre la calidad ovocitaria. Más aún, mucha de la información analizada muestra que la producción de embriones es mejorada cuando la alimentación es restringida sin explicarse este efecto paradójico con respecto a la información obtenida en otros niveles de la función reproductiva (57). Algo parecido pasa con el crecimiento temprano del embrión que se afecta severamente tanto con el exceso como por el defecto de la disponibilidad de alimentos. Estos efectos de la nutrición han sido ampliamente y profundamente estudiados en los últimos años y deben ser tenidos en cuenta como factores que pueden afectar la ME

El **efecto del estrés térmico** sobre la fertilidad, tanto en la hembra como en el macho, fue bien revisado por Hansen (34). Los efectos del estrés térmico abarcan desde una alteración de la calidad del ovocito pasando por una reducción de la capacidad de síntesis esteroidea de las células de la teca y de la granulosa que se traduce en una baja concentración de P4.

Hay estudios que sugieren que la maduración citoplásmica es más susceptible al estrés térmico que la maduración nuclear. En climas cálidos, la calidad del ovocito está reducida posteriormente a un verano muy cálido y esto no puede ser revertido por un período largo precediendo la colecta de los ovocitos. Esto sugiere que el estrés térmico puede afectar a los folículos en crecimiento más pequeños y sus efectos se harán manifiestos hasta varios meses después de someterse al calor. El estrés térmico antes de la inseminación en vacas lecheras resulta en pobre calidad ovocitaria probablemente debido a un ambiente folicular también alterado. Habría niveles anormales de hormonas esteroideas y gonadotrofinas dentro del folículo afectado por el estrés térmico lo que a su vez afectaría la calidad ovocitaria. Por su parte, la exposición de los ovocitos a estrés térmico durante la maduración resultará en poblaciones alteradas de RNA en los blastocitos resultantes lo que se traduce en un número reducido del número y la calidad de los ovocitos obtenidos después de una estimulación ovárica (42).

En la misma línea que lo anterior, también se afectaría la fertilidad por alteración de la secreción endometrial con lo cual, la sobrevivencia embrionaria se ve seriamente afectada durante la fase de nutrición histotrófica (78). En un estudio posterior fue determinado que entre el 20,5 y 43,6% de las pérdidas embrionarias tempranas fueron debidas a fallas en la fertilización o fallas genéticas (35), lo cual es muy coincidente con los datos reportados por Ryany col. (61) que fueron del orden del 20%, independientemente de la temperatura.

Otro de los factores ambientales que afecta negativamente la fertilidad es el estrés generado en los animales producto del manejo con perros, gritos y golpes (25, 76).

Método de diagnóstico de la gestación como causal de ME

Las pérdidas producidas por diagnóstico realizado por tacto transrectal, con gestaciones menores a 53 días, resultó estar en el orden del 5,7%, si éste fue realizado por un profesional inexperto respecto a un 3,6% si fue realizado por un profesional experimentado. Cuando se evaluó el método de diagnóstico por US, la pérdida fue del 0% cuando fue realizada por un experto y del 3,4% cuando la misma la realizaron inexpertos(60).

Medidas para disminuir pérdidas embrionarias/fetales

Por lo descrito anteriormente, parecería que en situaciones normales, el 40% de pérdidas entre fertilización y preñez en los primeros 40 días de gestación aproximadamente, podría minimizarse en hembras sanas por diferentes vías.

- 1- Impidiendo que la hembra ovule un ovocito de folículos persistentes.
- 2- Logrando un folículo ovulatorio de buen tamaño pero que sobre todo sea grande y produzca altos niveles de estradiol durante más tiempo (por un período de tres días por ejemplo).
- 3- Logrando un rápido y sostenido incremento de los niveles de P4 después de la fertilización
- 4- Evitando situaciones de estrés, el cual es generado por factores ambientales siendo el principal el estrés térmico, como así también evitar vacunaciones alrededor del momento de la inseminación.

Impidiendo que ovule un ovocito de folículos persistentes

El desarrollo de tratamientos de inducción y sincronización de celos para realizar IATF ha contribuido en la actualidad, regulando de forma apropiada la duración de la fase progestacional, al reducir la presencia de folículos persistentes que como se dijo antes, van a producir ovocitos de pobre calidad. Las metodologías para esta modalidad de resolver uno de los factores actuantes en la mortalidad embrionaria está entonces disponible para su uso productivo.

Desarrollando un folículo capaz de secretar más estradiol que el obtenido en tratamientos clásicos

El tamaño folicular, la concentración de estradiol y el tiempo de secreción de esta hormona han sido descritos previamente en oportunidad de mencionar el efecto del estradiol como factor endócrino vinculado con las pérdidas embrionarias. En este sentido, en la actualidad se está trabajando en la evaluación de protocolos tendientes a inducir ovulación sincronizada para implementar IATF, con tratamientos que prolonguen la fase de proestro(8). Hay en estos estudios evidencias que muestran que prolongando el proestro, la fertilidad puede ser incrementada significativamente sin necesidad de aumentar el tamaño del folículo preovulatorio.

Previo a esto se demostró que cuando se prolongó el proestro se observó una mayor concentración de estradiol y una mayor concentración de P4 (12) en los momentos periovulatorios. Estos hallazgos se han correlacionado con una mayor tasa de preñez en vacas y vaquillonas, lo que fue ya observado en hembras inseminadas con proestro largo en varios trabajos realizados por Mussard y col. (53, 54, 52) y resumidos posteriormente por Bridges y col.(12).

Los tratamientos de inducción de ovulación con proestro largo, mejorarían así la fertilidad a la IATF.

Incremento rápido y sostenido de los niveles de progesterona

La P4 es esencial para la sobrevivencia embrionaria, su desarrollo y el reconocimiento de la preñez. Concentraciones incrementadas de P4 han sido asociadas con un incremento de la tasa de desarrollo del conceptus (29).

Por el momento hay cuatro vías de trabajo para lograr lo antedicho.

- Aplicación de eCG
- Aplicación de P4 de larga acción aplicada a partir del día 2 o 3 después de la ovulación (5, 58, 59).
- Aplicación de HCG a las 24-48 hs posteriores a la IATF
- Tratamientos de inducción de ovulación, que prolonguen el proestro

- Tratamiento con eCG

Esta hormona, que tiene actividad LH y FSH, parece mejorar la fertilidad por diferentes vías. Relacionado con el aspecto analizado en este punto, el uso de eCG en los tratamientos para IATF aumenta la tasa de hembras que ovulan, aumenta el tamaño folicular y también la calidad del cuerpo lúteo (20).

La eCG aplicada antes de la ovulación lleva a un aumento de la P4 durante el ciclo subsiguiente al tratamiento (9, 52, 71). Este efecto está relacionado al efecto estimulador de la eCG sobre las células de la teca interna y la granulosa del folículo preovulatorio favoreciendo así la ovulación de un folículo de mayor tamaño y generando un cuerpo lúteo de mayor tamaño (65). Esto conduce a un incremento de P4 secretada y circulante la cual se podrá asociar con los eventos mencionados en el punto siguiente.

- Tratamiento con Progesterona

Mann y col.(49) observaron que la P4 aplicada tempranamente en el diestro produjo un alargamiento del trofoblasto cuatro veces mayor que el control y un incremento 6 veces más alto en la concentración intrauterina de interferón tau.

La suplementación con P4 en los primeros 4 días después de la IA incrementa el desarrollo morfológico y la actividad biosintética del embrión de 14 días (29) y esto tiene el potencial de incrementar la sobrevivencia embrionaria. En vacas lecheras se ha determinado que la suplementación con P4 durante la primera semana de gestación resultó en un incremento global y en cambio el tratamiento durante la segunda o tercera semana de gestación no mejoró la preñez (49) indicando que el momento crítico para obtener un aumento de la P4 y modificar la actividad secretoria del endometrio e influenciar el desarrollo embrionario es entre el 4 y 5to día de gestación (29, 31). Una alta concentración de P4 inmediatamente después de la concepción, está asociada a una elongación del conceptus más rápida y a un incremento en la producción de interferón tau (17). De acuerdo a estos autores el efecto observado sería por la acción de la P4 sobre el endometrio y no sobre el conceptus.

Sin embargo, cuando la P4 es suplementada en el diestro temprano (día 2-3 post ovulación) se ha observado lo que se denomina un efecto paradójico, observándose un aumento significativo de progesterona concordante con un incremento en el tamaño del CL, pero una luteólisis anticipada (29, 46, 73). Este efecto es dosis dependiente, lo cual fue observado en un trabajo realizado evaluando dos dosis de P4 observando un mayor porcentaje de preñez, con mayor área de cuerpo lúteo y producción de P4 con la dosis apropiada (58). El efecto dosis entonces es la forma en que se puede revertir este efecto paradójico, lo cual fue confirmado en un estudio evaluando tamaño y niveles de P4 producida por el CL con dos dosis de P4 inyectadas en el día 2 (5).

Respecto a la suplementación con P4, debe entenderse que es aún un tratamiento en fase de experimentación por lo que no puede ser recomendado por el momento aun cuando hay ya información promisorio al respecto.

- Tratamiento con hCG

La aplicación de hCG en el diestro temprano es una de las estrategias utilizadas para producir un aumento de la P4 y lograr un adelantamiento del desarrollo embrionario temprano. La administración de hCG para hacer ovular un folículo dominante ha sido muy utilizada para mejorar las tasas de preñez aunque con resultados muy variables. En estudios recientes que han evaluado varios trabajos previos sobre el tema se ha observado que la aplicación de hCG en vacas lecheras produjo mejoras en la tasa de preñez del orden del 3% (análisis realizados sobre más de 6000 inseminaciones (56). Recientemente fue demostrado que una sola inyección de hCG entre los días 2 y 3 después de la IA resultaron en un CL más grande y un incremento de la tasa de P4 circulante con respecto al control (48). A pesar de esto, en un reciente trabajo realizado por de Souza y col. (21) sobre una importante cantidad de vacas lecheras, no se logró mejorar la tasa de preñez con la aplicación de hCG o de hCG+ P4 pero si se logró con la aplicación de P4 sola. Por lo tanto, esta alternativa de mejorar el desarrollo embrionario consecuente con una posible mayor tasa de preñez, es una temática en estudio al presente.

- Tratamientos de inducción de ovulación, que prolonguen el proestro

Esto ya fue descrito previamente

Disminución del estrés

Se sabe que el estrés es un factor que afecta negativamente la fertilidad, como se describió más arriba. El calor extremo no pueda ser evitado en su totalidad. Sin embargo sí pueden tomarse medidas de manejo para disminuir su impacto.

Entre otras, cuando se realiza la IATF, ésta debe ser programada para poder realizarla en las horas de menor calor y luego no trasladar a los animales y que estos permanezcan en lugares con sombra, sin estar hacinados y con fácil acceso al agua.

Traslado de los animales:

El traslado a largas distancias de hembras inseminadas también es un factor que produce muerte embrionaria, por lo que deberían evitarse estos movimientos, hasta pasado un determinado tiempo. En este sentido, probablemente lo más seguro sea luego de

transcurridos 45 días desde la IA. Una muestra de este efecto negativo es que trasladando vacas entre 8 a 12 días después de inseminadas, el porcentaje de pérdidas fue del 12% respecto al 6% observado cuando este traslado se realizó entre los 45 a 60 días de la inseminación (28). Estos autores proponen que es mejor trasladar los animales entre los días 1 a 4 posterior a la inseminación o 46-60 días luego de la IA que hacerlo entre el día 6 y 42. Nosotros, sin tener evidencias, sugerimos no trasladar animales tan tempranamente después de la IA y sí hacerlo como describen los autores antes mencionados, a partir de los 45 días de la IA.

Efecto de las vacunas

En nuestro país no hay información referente a la aplicación de vacunas u otros tratamientos inyectables, aplicados en diferentes momentos de realizada una IATF. Sin embargo, podría esperarse que las vacunas aplicadas en los períodos más sensibles del desarrollo embrionario pudiesen afectar la viabilidad embrionaria.

Al respecto existe información proveniente de Brasil, que la vacunación contra Aftosa aplicada luego de la IATF, disminuyó el porcentaje de preñez hasta un 16%. En 291 vacas IATF que fueron vacunadas contra Aftosa 20 días previos a la IA, el porcentaje de pérdidas embrionarias entre el 1er diagnóstico (30 días) y el realizado 60 días después fue del 4%, comparado con el 16% de pérdidas observado en 313 vacas que se vacunaron a los 30 días después de la IATF (26).

En un trabajo posterior, Ferreira (no publicado) propone que la causa de pérdidas originada por la vacunación no sería el estrés sino una reacción inflamatoria que dispararía la secreción de prostaglandina. Otro factor que menciona es que una inflamación a nivel uterino, puede generar una "interpretación" de cuerpo extraño e inducir la muerte embrionaria.

Hay entonces evidencias, que las vacunaciones son causales de MET 2, y que en función de esta información las vacunaciones, al menos contra Aftosa, no deberían coincidir en plena etapa reproductiva. Es por ello que en los casos en que el tratamiento lo permita, sería recomendable adelantar algunas vacunaciones previo al servicio con el objeto de evitar que se apliquen dentro de los 40 días de realizada la IATF.

Pérdidas embrionarias según casuística local

En nuestro grupo de trabajo, en aquellos establecimientos en que se realizan dos IATF sucesivas, se reconfirma la gestación a los 100 días aproximadamente de realizado el primer diagnóstico.

La principal casuística nuestra proviene de un establecimiento en que se IATF vaquillonas Angus a los 13-15 meses de edad y a los 24 meses de edad y se realiza una segunda IATF aproximadamente 45 días después de la primera.

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de animales inseminados y los porcentajes de preñez en el primer y segundo diagnóstico (5 años de registro).

Tabla 1. Tasa de reconfirmación de preñez diagnosticada por palpación transrectal de animales diagnosticados previamente por US (registros de 5 años).

Categoría	% preñez a la IATF	Días a la ecografía	Total examinado al 2° diagnóstico	Pérdidas entre 1 ^{er} y 2° diagnóstico	Pérdidas (%)	Rango de pérdidas (%)
15 meses	58,1±4,7	39±5	2063	149	7,2±2,5	3,4-12,2
24 meses	53,4±7,0	41±3,1	5181	223	4,3±2,2	0,4- 7,5
	54,6		7244	372	5,1	

Estos resultados son coincidentes con información obtenida por otros autores. Bealy col. (6) registraron un porcentaje de pérdida de preñez en vacas para carne del 6,5% entre el día 25 al día 45 y del 8% entre los 25 días y 65 días, mientras que en vaquillonas, Lamby col. (43) observaron una pérdida del 4,8% entre los días 35 y 75.

Una variable analizada en nuestro estudio fue el tipo de imagen ecográfica utilizada para diagnosticar preñez. Para ello se tomaron dos criterios de preñez: ante la presencia de líquido en útero o ante la observación de líquido y vesícula embrionaria. Sobre 1472 vaquillonas de 15 y 24 meses, 913 (62%) fueron diagnosticadas como preñadas por observación del líquido intrauterino y presencia de embrión y en 559 (38%) sólo por la visualización de líquido. A los 110 días de la IATF se realizó la reconfirmación de preñez y las pérdidas fueron del 5,3% y 3,9% para los diagnósticos realizados por observación de líquido+embrión y de líquido respectivamente. De esta manera se puede decir que el error de diagnóstico de gestación por US es muy bajo aún no determinando la presencia del embrión en la imagen observada. Con lo cual puede ser descartado que las pérdidas entre ambos diagnóstico fuesen debidas a diagnósticos de falsos positivos. No obstante se deberían realizar trabajos con un diseño tal que pueda confirmar lo observado por nosotros.

Las metodologías diagnósticas, no parecen ser una causal de pérdidas embrionarias al menos cuando el diagnóstico es realizado por profesionales experimentados.

Disminución del impacto en la producción

Cuando la preñez depende exclusivamente de la fertilidad que se obtiene únicamente por la inseminación, las pérdidas que suelen ocurrir pueden ser minimizadas a través de alguna de las acciones que se mencionaron antes.

Por otra parte, en los casos en que luego de un programa de IATF, si las vacías fuesen a repastos con toros, puede minimizarse el impacto de las pérdidas embrionarias. Para ello, una medida que nosotros hemos implementado en los casos que las vacías de la segunda IATF van a servicio natural, es dejar unos pocos toros (0,5% a 1%) con las que se diagnosticaron preñadas a los 30-40 días de gestación. Como todas esas hembras preñadas son reexaminadas a los 60 días del primer diagnóstico, una proporción de las que perdieron su embrión, manifiesta celo preñándose con el toro.

Al momento de la reconfirmación de preñez, las preñadas por toro tendrán una edad gestacional como máximo de 60 días pudiéndose diferenciar claramente de las que continúan preñadas, ya que estas tendrán 100 días de edad gestacional.

Las diagnosticadas de preñez por toro, se apartan del rodeo de preñez por IATF y se juntan con las que están en servicio natural.

De esta manera, estas hembras pasarán a ser *cabeza de preñez* del rodeo con servicio natural, minimizando el impacto productivo de la pérdida del embrión.

Consideraciones finales

La fertilidad de la especie bovina es del orden del 0,6.El 0,4 que no se preña es debido fundamentalmente a que pierden el embrión tempranamente.

Hasta el presente no hay tratamientos claramente definidos que minimicen esta pérdida, aunque tratamientos que prolonguen el proestro y la suplementación con P4 en el diestro temprano parecen ser alternativas promisorias.

Es así pues que, por el momento lo único que se puede realizar con éxito para minimizar la tasa de pérdida, son maniobras de manejo que tiendan a minimizar el estrés térmico, evitar que las vacunas se apliquen en periodos sensibles luego de la IA, evitar los traslados o movimientos, hasta transcurridos 45 días del servicio.

Durante la IATF, manejar los animales evitando el estrés que genera la presencia de perros, mal trato etc., ya que esto va en detrimento de la fertilidad.

Como punto remarcable, los tratamientos tendientes a mejorar la fertilidad, podrían mejorar algún punto porcentual, mientras que respetar las medidas de manejo antes mencionadas parece ser lo más importante para no afectar la fertilidad.

Bibliografía

1. Ahmad, N., Schrick, F.N., Butcher, R.L., Inskeep, E.K. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.*52(5):1129-35.
2. Atkins, A.;Pohler,K.G;Jinks, E.M and Madsen, C.A .2013. Influence of follicular characteristics at ovulation on early embryonic survival. *J. Anim. Sci.* 91:3014-3021.
3. Ayalon, N. 1978.A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fert.* 54:483-493
4. Bajaj, N.K y Sharma, N. 2011. Endocrine causes of early embryonic death: An overview. *Current research in dairy sciences*, 3: 1-24.
5. Barros, S.; Vasquez, J.; Rivadeneira, J.; y Alberio, R. 2016. It is possible to increase progesterone during the early metaestrous after insemination without affecting development and function of corpus luteum? *Proceed. 18th International Congress on Animal Reproduction. ICAR.*June 26- 30th 2016, in Tours, France.
6. Beal WE, Perry, R.C. and Corah, LR. 1992. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 70:924-929
7. Bishop M. 1964. Paternal contribution to embryonic death.1964. *J. Reprod. Fert.* 7:383-396
8. Bo, G.A., de la Mata, J.J., Baruselli, P.S., and Menchaca, A. 2016. Alternative programs for synchronization and resynchronization ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86:388-396
9. Bodensteiner KJ, Kot K, WiltbankMC, Ginther OJ, 1996: Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 45, 1115–1128.
10. Breuel, K.F., Lewis,P.E., Schrick, F.N, Lishman, A.W, Inkeep, E.K, and Butcher,R.L.1993.Factors Affecting Fertility in the Postpartum Cow: Role of the Oocyte and Follicle in Conception Rate. *Biol. Reprod.* 48: 655-661
11. Bridges, G.A., Day, M.L., Geary, T.W and Cruppe, T. 2013.Triennial reproduction symposium: Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J. Anim. Sci.* 91: 3002-3013
12. Bridges, G.A., Mussard, M.L., Burke, C.R. and Day, M.L. 2010. Influence of the lengths of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117:208-215.

13. Butler, H.M y Alberio, R.H. 1987. Mortalidad embrionaria. Revisión. Rev. Arg. Prod. Anim. 3:201-237
14. Butler, W.R., Calaman, J.J. and Beam, S.W. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. J. Anim. Sci, 74: 858-865
15. Canfield, R.W. and Butler, W.R. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. Domestic Animal Endocrinology 7 : 323-330
16. Chelmonska-Soyta, A. 2002. Interferon Tau and Its Immunobiological Role in Ruminant Reproduction. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 50:47-52
17. Clemente, M., de La Fuente, J., Fair, T. A., Al Naib, T.A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J.F., Rizos, D. and Lonergan, P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?. Reproduction 138: 507-517
18. Cooper, K., Carver, D.A., Villeneuve, P., Silvia, W.J and Inskeep, E.K. 1991. Effects of progesterone treatment on concentration of prostaglandins and oxytocin in plasma for posterior vena cava of post-partum beef cows. J. Reprod. Fert. 91: 411-421
19. Coy, P., García-Vásquez, F.A., Visconti, P.E. and Avilés, M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. Reproduction 144: 649-660.
20. De Rensis, F y Lopez Gatiús, F. 2014. Use of Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. Reprod. Dom. Anim. 49:177-182.
21. deSouza, E. D. F. 2015. Effect of long-acting injectable progesterone in luteal function and conception rate of high producing Holstein cows submitted to timed artificial insemination. Masters Thesis, University of Sao Paulo, Brazil
22. Diskin, M. G., Stronge, A. J., Morris, D. G., Kenny, D. A. and Sreenan, J. M. 2004. The association between early luteal phase concentrations of progesterone and embryo survival in heifers and dairy cows. J. Anim. Sci. 82: 101.
23. Diskin, M. G., Parrand, M.H., Morris, D.G. 2012. Embryo death in cattle: an update. Reproduction, Fertility and Development 24:244-251
24. Diskin, M.G. y Morris, D.J. 2008. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants: Reprod. Dom. Anim. 43:260-267
25. Errico, A.; Errico, R.; Errico, S.; Mihura, H., Cabodevila J. y Callejas, S. 2015. Efecto del manejo sobre el comportamiento y la preñez a la IATF en vaquillonas Angus. Taurus Año 17, N° 67:18-21
26. Ferreira, L., Cooke, R.F., Marques, R.S., Fernandes, H.J., Fernandes, C.S., Stelato, R., Franco, G.L. and Lemos, R.A. 2016. Effects of vaccination against foot-and-mouth disease virus on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. J. Anim. Sci. 94:401-415
27. Fields, M. J., Sand, R.S and Yelich, J.V. eds. 2002. Factors affecting calf crop: Biotechnology of reproduction. CRC Press, Boca Raton, FL
28. Fields, S. y Perry, G. 2007. Effects of Shipping and Heat Stress on Embryonic Mortality in Cattle. South Dakota State University; Extension Extra, 2063. June 2007.
29. Garrett, J. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T. and Morgan, G. L. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. J. Reprod. Fert. 84:437-446
30. Geary, T.W., Smith, M.F., MacNeil, M.D., Day, M.L., Bridges, G.A. Perry, G.A.; Abreau, F.M. Atkins, J.A., Pohler, K.G., Jinks, E.M. and Madsen, C.A. 2013. Influence of follicular characteristics at ovulation nearly embryonic survival. J. Anim. Sci. 91:3014-3021.
31. Geisert, R. D., Fox, T. C., Morgan, G. L., Wells, M. E., Wettemann, R. P. and Zavy, M. T. 1991. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. J. Reprod. Fert. 92:475-482.
32. Grimard, B. Freret, S., Chevallier, A., Pinto, A., Ponsart, C., Humblot, P. 2006. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. Anim. Reprod. Sci. 91:31-44.
33. Hansen, P. 2002. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. J. Anim. Sci. 80(E. Suppl. 2):E33-E44.
34. Hansen, P. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Phil. Trans. R. Soc. B364: 3341-3350

35. Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and source of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56: 1417–1433.
36. 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*.
37. Inskeep, E. K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82 E-Suppl: E24–39
38. Inskeep, E. K. and Dailey, B. 2013. *The Physiology of Pregnancy Loss; Female Factors Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. October 15-16, 2013
39. Jinks, E.M., Smith, M.F., Atkins, J.A., Poheler, K.G., Perry, G.A., Mac Neil, M.D., Roberts, A.J., Watterman, R.C., Alexander, L.J. and Geary, T.W. 2012. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91: 1176–1185
40. Kerbler, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. T., Leslie, K. E., and Walton, J. S. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703–714
41. Kieborz-Loos, K.R., Garverick, H.A., Keisler, D.H., Hamilton, S.A., Salfen, B.E., Youngquist, R.S. and Smith, M.F. 2003. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F₂ α in postpartum beef cows: Effects of progesterone and estradiol-17 β treatment. *J. Anim. Sci.* 81: 1830–1836
42. Krisher, R.L. 2013. *In Vivo and In Vitro Environmental Effects on Mammalian Oocyte Quality*. *Animal Biosciences* 1: 393–417
43. Lamb, G.C., Miller, B.L., Traffas, V., Corah, L.R. 1997. Estrus detection, first service conception, and embryonic death in beef heifers synchronized with MGA and prostaglandin. *Kansas AES Report of progress*. 1997; 783:97.
44. Larson, S.F., Butler, W.R. & Currie, W.B. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J Dairy Sci.* 80: 1288–1295.
45. Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P. & Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 37: 48–53.
46. Lynch, P.R., Macmillan, K.L., Taufan, V.K. 1999. Treating cattle with progesterone as well as a GnRH analogue affects oestrous cycle length and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 56: 189–200
47. Mackey, D.R., Sreenan, J.M., Roche, J.F. and Diskin, M.G. 1999. Effect of acute restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. *Biology of Reproduction* 61: 1601–1607
48. Maillou, V., Duffy, P., O'Hara, L., de Frutos, C., Kelly, A.K., Lonergan, P. and Rizos, D. 2014. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 26: 367–374.
49. 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. *Vet. Journal* 171: 500–50
50. Mann, G.E., Lamming, G.E. & Fisher, P.A. 1999. Progesterone control of embryonic interferon tau production during early pregnancy in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstr Series* 21, Abstr 37
51. Mattos, R., Staples, C.R. and Thatcher, W.W. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction* 5: 38–45.
52. Murphy, M.G., Enright, W.J., Crowe, M.A., McConnell, K., Spicer, L.J., Boland, M.P. & Roche, J.F. 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 92: 333–338
53. Mussard, M.L., Burke, C.R., Behlke, E.J., Gasser, C.L. and Day, M.L. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 937–943

54. Mussard, M.L., Burke, C.R., Gasser, C.L Behlke, E.J., Colliflower, K.A. Grum, D.E., and Day, M.L. 2003b. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulation dominant follicles of early or late maturity. *Biol. Reprod.* 68. Suppl 1: 332 (Abstract)
55. Mussard, M.L.; Burke, C.R. and Day, M.L. 2003a. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: *Proc. Ann. Conf. Soc. Theriogenology*, Columbus, OH. P. 179-185
56. Nascimento, A.B., Bender, R.W., Souza, A.H., Ayres, H., Araujo, R.R., Guenther, J.N., Sartori, R. and Wiltbank, M. 2013. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:2873–2882
57. Nolan, R. O'Callaghan, D., Duby, R.T., Lonergan, P. and Boland, M.P. 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50: 1263-1274
58. Pugliesi, G., Santos, F.V., Lopes, E., Nogueira, E., Maio, J.R.G., Binelly, J. 2016. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles supplemented with long acting progesterone after timed IA. *Theriogenology* 85:1239-48.
59. Pugliesi, G., Oliveria, M.L., Scolari, S.C., Lopes, E., Pinaff, F., Miagawa, V., Paiva, Y.N., Maio, J.R., Nogueira, G.P and Binel, M. 2014. Corpus Luteum Development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 49:85–91
60. Richardson, R.D, Mortimer, R.G. and Whittier, J. C. 2010. Comparison of Fetal Losses from Diagnosis of Pregnancy Using Ultrasonography or Rectal Palpation in Beef Heifers by Novice or Experienced Technicians. *The Professional Animal Scientist* 26:341–346
61. Ryan, D.P., Prichard, J.F., Kopel, E., Godke, R.A. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 39:719-37
62. Sá Filho, M.F., Crespiho, A.M., Santos, J.E.P., Perry, G.A., Baruselli, P.S. 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influenced likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.* 120:23-30
63. Sangsritavong, S., Combs, D.K., Sartori, R., Armentano, L.E. and Wiltbank, M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 in dairy cattle. *J Dairy Sci* 85:2831-2842.
64. Santos, J.E.P., Thatcher, W.W.; Chebel, R.C., Cerri, R.L.A. and Galvao, K.N. 2012. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:513-535
65. Santos, E.P., 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 Anim Sci* 79 2881-2894.
66. Sartori, R., Sartori-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parish, J. J. and Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85:2803–2812.
67. Shaham-Albalancy, A., Folman, Y., Kaim, M., Rosenberg, M. and Wolfenson, D. 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF₂α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction* 122:643–648.
68. Silke, V., Diskin, M.G., Kenny, D.A., Boland, M.P., Dillon, P., Mee, J.F., Sreenan, J.M. 2002. Extent, pattern and factors associated with late embryonic losses in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 71:1–12.
69. Sreenan, J.M. and Diskin, M.G. 1986. The extent and timing of embryonic mortality in cattle. In "Embryonic Mortality in Farm Animals" (Eds. J.M. Sreenan and M.G. Diskin) pp 142-158. 158 (Martinus Nijhoff CEC: The Hague),
70. Stagg, K., Diskin, M.G., Sreenan, J.M. and Roche, J.F. 1995. Follicular development in long-term anoestrous suckler cows fed two levels of energy post-partum. *Anim. Reprod. Sci.* 38:49-61.
71. Takahashi T, Hirako M, Patel OV, Shimizu M, Hasegawa Y, 2002: Plasma steroid profiles following follicle-stimulating hormone or equine chorionic gonadotrophin injection in cows

- chronically treated with gonadotrophin releasing hormone agonist. *J Vet Med Sci* 64, 731–734.
72. Thatcher, W.W., Moreira, F., Santos, J.E.P., Mattos, R.C., Lopez, F.L., Pancarci, S.M., Risco, C.A. 2001: Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55, 75–90.
 73. Van Cleeff, J., Macmillan, K.L., Drost, M., Lucy, M.C., Thatcher, W.W. 1996. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. *Theriogenology* 46:1117-1130
 74. VanRaden, P. M., and Miller, R. H. 2006. Effects of non additive genetic interactions, inbreeding and recessive defects on embryo and fetal loss by seventy days. *J.DairySci.*89:2716–2721
 75. Vasconcelos, V., Pereira, M.H., Meneghetti, M., Dias, C.C., SáFilho, O.G., Peres, R.F., Rodrigues, A.D., Wiltbank, M.C. 2013. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.*, 10:206-214
 76. Vater, A.; Rodríguez Aguilar, S.; Loza, J.; Otero Illia, M.; Cabodevila, J. y Callejas. S. 2011. Efecto del manejo de vacas con cría durante la implementación de una IATF sobre la tasa de preñez. *Taurus Año* 13 N° 51:17-20.
 77. Waterman, R.C., Alexander, L.J., Geary, T.W. 2012. Preovulatory estradiol and establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91:1176-1185
 78. Wiltbank, M.C., Baez, G.M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M.Z., Monteiro, P.L.J., Melo, L.F., Ochoa, J.C., Santos, J.E.P. and Sartori, R. 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86: 239–253
 79. Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science* 60–61:535–547