

Sección: Artículo de revisión

Factores asociados a la liberación de gonadotrofinas y ovulación después de la administración exógena de GnRH en el Bos Taurus

Artículo de Colazo MG, Mapletoft RJ

CIENCIA VETERINARIA, Vol. 24, Nº 2 (2022) ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea)

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet202224208>

Factores asociados a la liberación de gonadotrofinas y ovulación después de la administración exógena de GnRH en el Bos Taurus

Factors associated with gonadotropin release and ovulation after exogenous administration of GnRH in Bos Taurus

Fatores associados à liberação de gonadotrofina e ovulação após administração exógena de GnRH em Bos Taurus

Colazo MG¹, Mapletoft RJ²

1 Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, Canada

2 Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada

Correo electrónico: colazo@ualberta.ca

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet202224208>

Fecha de recepción del artículo: 23/06/2022

Fecha de aprobado para su publicación: 08/08/2022

RESUMEN

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es un decapeptido, sintetizado por las neuronas GnRH en el hipotálamo, que estimula la síntesis y secreción de gonadotrofinas (hormonas folículo estimulante, FSH y luteinizante, LH) de la hipófisis anterior o adenohipofisis. Agonistas de GnRH con una estructura idéntica o similar a la natural han estado disponible comercialmente desde la década del 70 y han sido utilizadas en un principio para el tratamiento de quistes foliculares y el mejoramiento de la fertilidad en el ganado vacuno ⁽¹⁾. La



Esta obra se publica bajo licencia Creative Commons 4.0 Internacional. (Atribución-No Comercial-Compartir Igual) a menos que se indique lo contrario, <http://www.creativecommons.org.ar/licencias.html>

ovulación de folículos ováricos después de la administración de GnRH fue reportada por primera vez por Schams et al. ⁽²⁾ y Britt et al. ⁽³⁾, pero no fue hasta la década del 90 cuando la GnRH se comenzó a utilizar para controlar la dinámica folicular durante el ciclo estral del bovino. Ahora sabemos que una nueva onda folicular emerge dentro de los 2 días después de la ovulación del folículo dominante presente en el momento del tratamiento con GnRH ^(4,5). Este hallazgo facilitó el desarrollo de protocolos de sincronización a base de GnRH en combinación con prostaglandinas (PGF) que permiten la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), sin necesidad de realizar detección de celo. Estos protocolos a base de GnRH y PGF son parte del manejo reproductivo bovino, sobre todo del ganado lechero, en muchos rodeos comerciales del mundo. Existen numerosos protocolos a base de GnRH y PGF disponibles para la sincronización del estro y la ovulación en el ganado, varios de esos protocolos se han explicado y discutido en detalle en otros artículos ^(6,7). El objetivo de esta revisión es describir los factores asociados a la liberación de LH y respuesta ovulatoria posterior a la administración de GnRH, dar a conocer información relevante sobre el efecto de las hormonas esteroideas en la respuesta a la GnRH y, por último, brevemente postular estrategias que podrían mejorar la eficacia de los protocolos basados en la aplicación de GnRH y PGF.

Palabras Clave: Estrógeno, Progesterona, Liberación de LH, Dinámica folicular, Inseminación artificial

ABSTRACT

The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a decapeptide, synthesized by the GnRH neurons in the hypothalamus, which stimulates the synthesis and secretion of gonadotrophins (follicle-stimulating hormone, FSH and luteinizing hormone, LH) from the anterior pituitary or adenohypophysis. GnRH agonists with a structure identical or similar to nature have been commercially available since the 1970's and were initially used for the treatment of follicular cysts and the improvement of fertility in cattle ⁽¹⁾. The ovulation of ovarian follicles after GnRH administration was first reported by Schams et al. ⁽²⁾ and Britt et al. ⁽³⁾, but it was not until the 1990's that GnRH began to be used to control follicular dynamics during the bovine estrous cycle. Studies have shown that a new follicular wave emerges within 2 days after ovulation of the dominant follicle present at the time of GnRH treatment ^(4,5). This finding facilitated the development of synchronization protocols based on GnRH in combination with prostaglandins (PGF) that allow fixed-time artificial insemination (FTAI), without the

need for heat detection. These GnRH-based protocols are part of the reproductive management, especially in dairy cattle, in many commercial herds around the world. There are several GnRH and PGF-based protocols available for estrus and ovulation synchronization in cattle, most of these protocols have been explained and discussed in detail in other publications ^(6,7). The objective of this review is to describe the factors associated with the release of LH and ovulatory response after the administration of GnRH, to present relevant information on the effect of steroid hormones on the response to GnRH and, finally, to briefly postulate strategies that could improve the efficacy of GnRH and PGF-based protocols.

Key words: Estrogen, Progesterone, LH release, Follicular dynamics, Artificial insemination

RESUMO

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um decapeptídeo, sintetizado pelos neurônios GnRH no hipotálamo, que estimula a síntese e secreção de gonadotrofinas (hormônio folículo-estimulante, FSH e hormônio luteinizante, LH) da hipófise anterior ou adeno-hipófise. Agonistas de GnRH com estrutura idêntica ou semelhante à natureza estão disponíveis comercialmente desde a década de 1970 e foram inicialmente utilizados para o tratamento de cistos foliculares e melhoria da fertilidade em bovinos ⁽¹⁾. A ovulação de folículos ovarianos após a administração de GnRH foi relatada pela primeira vez por Schams et al. ⁽²⁾ e Britt et al. ⁽³⁾, mas foi somente na década de 1990 que o GnRH começou a ser usado para controlar a dinâmica folicular durante o ciclo estral bovino. Sabemos agora que uma nova onda folicular surge dentro de 2 dias após a ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento com GnRH. ^(4,5) Essa descoberta facilitou o desenvolvimento de protocolos de sincronização baseados em GnRH em combinação com prostaglandinas (PGF) que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sem a necessidade de detecção de cio. Esses protocolos baseados em GnRH e PGF fazem parte do manejo reprodutivo de bovinos, especialmente bovinos leiteiros, em muitos rebanhos comerciais ao redor do mundo. Existem inúmeros protocolos baseados em GnRH e PGF disponíveis para sincronização de estro e ovulação em bovinos, vários desses protocolos foram explicados e discutidos em detalhes em outros artigos ^(6,7). O objetivo desta revisão é descrever os fatores associados à liberação de LH e resposta ovulatória após a administração de GnRH, apresentar informações relevantes sobre o efeito dos hormônios esteroides na resposta ao GnRH

e, por fim, postular brevemente estratégias que possam melhorar a eficácia de protocolos baseados na aplicação de GnRH e PGF.

Palavras-chave: Estrogênio, Progesterona, Liberação de LH, Dinâmica folicular, Inseminação artificial

Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH): Modo de acción y su efecto en el bovino

La GnRH es un decapeptido sintetizado en las neuronas hipotalámicas y secretado de manera pulsátil en la eminencia media dentro de un complejo vascular conocido como sistema porta hipotálamo-hipofisiario que desciende hacia la adenohipófisis. La GnRH se une a su receptor de membrana localizado en los gonadotropos de la adenohipófisis y estimula la síntesis y secreción de LH y FSH, controlando así la foliculogénesis, gametogénesis y la esteroidogénesis. Para una más completa revisión leer Perrett y McArdle, ⁽⁸⁾.

La administración de GnRH exógena produce incrementos agudos de LH y FSH ^(9,10,11). La liberación de LH dura unas 4 a 6 horas aproximadamente (más corta que la liberación endógena de LH que dura entre 8 y 10 horas) y el pico de LH se detecta, en promedio, 2 h posterior al tratamiento con GnRH ^(10,11), seguido de ovulación en aquellos animales que tengan un folículo dominante ≥ 9 mm de diámetro al momento del tratamiento ⁽⁵⁾. Aunque se propuso que la emergencia de una nueva onda folicular ^(4,5) ocurriría dentro de los 2 días posterior a la ovulación o la luteinización de un folículo dominante después del tratamiento con GnRH ⁽¹²⁾, la emergencia fue sincrónica solo si se indujo la ovulación del folículo dominante ⁽⁵⁾. Aunque no se ha estudiado adecuadamente la aparición de luteinización en las células de la pared folicular después de la administración de GnRH en animales cíclicos, se ha observado luteinización en quistes foliculares después del tratamiento con GnRH ⁽¹³⁾.

FACTORES QUE AFECTAN LA LIBERACIÓN DE LH Y LA OVULACIÓN

Existen varios factores que pueden afectar la liberación de LH y la ovulación en respuesta al tratamiento con GnRH exógena, entre ellos el uso de diferentes agonistas (lo discutiremos más adelante). Desde el punto de vista práctico el factor más importante es el día del ciclo estral ^(5,14), donde la concentración de progesterona, estradiol y el tamaño del folículo dominante son determinantes en la liberación de LH y

ovulación en respuesta al tratamiento con GnRH. La concentración de hormonas esteroideas (progesterona y estrógeno) circulantes afectan la magnitud de la liberación de LH ^(15,16,17) y por otra parte la ovulación está altamente relacionada con la presencia o no de receptores de LH en las células de la granulosa ⁽¹⁸⁾. Aunque la respuesta ovulatoria a la administración de GnRH fue mayor en los días 5 y del 15 al 18 del ciclo estral cuando un folículo dominante ≥ 10 mm de diámetro se encuentra presente ⁽¹⁴⁾, la ovulación no ocurrió consistentemente en las vaquillonas que se esperaba que tuvieran un folículo dominante > 10 mm al momento del tratamiento ⁽¹¹⁾. En el primer trabajo de Pursley et al. ⁽¹⁹⁾, se reportó que la ovulación se produjo en aproximadamente el 55% de las vaquillonas frente al 85% de las vacas lecheras lactantes, independientemente de la etapa del ciclo estral al momento del tratamiento con GnRH. Otros estudios posteriores, revelaron que la respuesta ovulatoria en vaquillonas rondaría el 30% y en vacas el 50% cuando son tratadas sin una previa presincronización (Tabla 1). Por lo tanto, existe una marcada diferencia entre vacas y vaquillonas a la respuesta ovulatoria después de la administración de GnRH (se discutirá más adelante). Consecuentemente, después del tratamiento con GnRH, el desarrollo folicular no se controla de manera tan efectiva en las vaquillonas en comparación con las vacas.

EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE LA LIBERACIÓN DE LH Y OVULACIÓN DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GNRH

La progesterona no solamente inhibe la secreción de LH a través de su efecto central a nivel hipotalámico, sino que también actúa a nivel de la adenohipofisis ya que receptores de progesterona están presentes en los gonadotropos ⁽²⁰⁾. Además, la GnRH puede regular la expresión de su propio receptor, una mayor secreción de GnRH aumenta el número de receptores en la adenohipofisis ⁽²¹⁾. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la liberación pulsátil de GnRH disminuye el número de receptores en la adenohipofisis y la capacidad de respuesta hipofisaria a la administración de GnRH.

El estrógeno, por su lado, aumenta la capacidad de respuesta de la adenohipofisis a la GnRH al aumentar la expresión de el gen que codifica el receptor de GnRH ⁽²¹⁾. Cuando células hipofisarias cultivadas *in vitro* fueron expuestas al estrógeno durante 24 h, la secreción de LH se triplicó en el medio de incubación comparadas al grupo control, indicando que el estrógeno puede actuar directamente sobre las células hipofisarias ⁽²²⁾. Por lo tanto, las hormonas esteroideas actuarían de

forma diferente sobre la liberación hipofisiaria de LH y FSH en respuesta a la administración exógena de GnRH.

En una serie de trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en la Universidad de Saskatchewan en Canadá, se obtuvieron resultados que fueron relevantes para entender el efecto de las hormonas esteroideas (estrógeno y progesterona) sobre la liberación de LH y ovulación posterior a la administración de GnRH exógena.

En el primer trabajo, Martínez et al. ⁽⁵⁾ diseñaron un estudio para caracterizar la dinámica folicular ovárica en vaquillonas tratadas con 25 mg de LH porcina (Lutropin-V), 100 µg de GnRH (Cystorelin) o Control (sin tratamiento) los días 3, 6 o 9 del ciclo estral (ovulación día 0), correspondiente a las fases de crecimiento, estática temprana y estática tardía de la primera onda folicular. La ovulación ocurrió dentro de las 36 h en el 67%, 100% y 67% de las vaquillonas tratadas con Lutropin-V y en el 89%, 56% y 22% de las vaquillonas tratadas con Cystorelin en los días 3, 6 o 9 del ciclo estral, respectivamente. Sin considerar los días de tratamiento, las tasas de ovulación fueron del 78% y del 56% en las vaquillonas tratadas con Lutropin-V vs. Cystorelin. El intervalo entre tratamiento y la emergencia de la segunda onda folicular fue diferente en las vaquillonas que ovularon comparado con las vaquillonas que no ovularon o aquellas vaquillonas del grupo Control. La emergencia de una nueva onda folicular se indujo consistentemente 1.3 días después del tratamiento, solo en las vaquillonas que ovularon en respuesta al tratamiento. Sin embargo, el 22% de las vaquillonas tratadas con Lutropin-V y el 44% de las vaquillonas tratadas con Cystorelin no ovularon. Tanto el Lutropin-V como el Cystorelin no indujeron atresia del folículo dominante o alteraron el intervalo hasta la aparición de una nueva onda folicular en aquellas vaquillonas que no ovularon después del tratamiento. Las diferencias en la tasa ovulatoria entre Cystorelin y Lutropin-V sobre todo en los días 6 y 9 del ciclo estral, sugirieron que la concentración de hormonas esteroideas circulantes en el momento del tratamiento podría afectar la respuesta ovulatoria a la administración de GnRH y que un tratamiento con LH no dependería tanto de esos cambios hormonales, pero sí de cambios morfológicos o fisiológicos del folículo dominante.

Un segundo estudio ⁽¹⁶⁾, se diseñó para investigar los efectos de las concentraciones de progesterona plasmática sobre la liberación de LH y la ovulación en vaquillonas y vacas de carne que recibieron 100 µg de GnRH (Cystorelin). La hipótesis general fue que altas concentraciones de progesterona en plasma reducirían la liberación de LH y disminuiría la respuesta ovulatoria a la administración de GnRH en bovinos de carne. También se planteó la hipótesis de que la hipófisis era más sensible a los efectos supresores de la progesterona en

vaquillonas que en vacas. En el Experimento 1, las vaquillonas recibieron Cystorelin 3, 6 o 9 días después de la ovulación; 8/9, 5/9 y 2/9 ovularon. Las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron las más bajas y las concentraciones de LH fueron las más altas en las vaquillonas tratadas 3 días después de la ovulación. En el Experimento 2, las vaquillonas no recibieron ningún tratamiento (Control) o recibieron uno (Baja progesterona) o dos (Alta progesterona) dispositivos intravaginales conteniendo progesterona (CIDR) en el día 4 del ciclo estral (celo = día 0). En el día 5, el grupo de Baja progesterona recibió dos dosis de PGF con 12 horas de diferencia para inducir luteolysis y así suprimir la progesterona endógena. En el día 6, todas las vaquillonas recibieron Cystorelin. Las vaquillonas en los grupos Control y Baja progesterona tuvieron concentraciones de progesterona plasmáticas más bajas que las vaquillonas en el grupo de Alta progesterona en el momento de la administración de Cystorelin (3.0 ± 0.3 , 3.0 ± 0.3 y 5.7 ± 0.4 ng/mL, respectivamente). A su vez las vaquillonas en el grupo Alta progesterona tuvieron una menor incidencia de ovulación después de la administración de Cystorelin (100%, 90% y 30%, respectivamente). En el Experimento 3, 4 a 6 días después de la ovulación, a vaquillonas y vacas con ternero al pie (52–74 días postparto) se les aspiró los dos folículos más grandes para sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular y se les colocó un CIDR usado. En ese mismo momento, los animales se asignaron por categoría para recibir dos dosis de PGF (repetido 12 h más tarde) o ningún tratamiento adicional. De esta manera se crearon un grupo de Baja y otro de Alta progesterona en cada categoría (vacas o vaquillonas). Todos los animales recibieron 100 µg de Cystorelin entre los 6 u 8 días después de la aspiración folicular. No hubo diferencias entre vaquillonas y vacas en cuanto a la respuesta ovulatoria (78% vs. 79%), pero cuando se agruparon vacas y vaquillonas, el grupo de Baja progesterona tuvo un pico de LH de mayor duración y una mayor respuesta ovulatoria (95% vs. 61%). Aunque la liberación de LH después del tratamiento con Cystorelin no fue diferente entre vacas y vaquillonas, se observó una interacción entre vacas y vaquillonas y los grupos de Baja y Alta progesterona. Las vacas en el grupo de Baja progesterona tuvieron un mayor pico de LH (27.7 ± 3.3 ng/mL) y una mayor área debajo de la curva (66,7) que las vacas pertenecientes al grupo de Alta progesterona (5.0 ± 0.8 ng/mL y 17.8). Interesantemente, las vaquillonas de ambos grupos tuvieron picos de LH y áreas debajo de la curva de LH (18.1 ± 2.3 ng/mL y 43.8, 10.8 ± 3.0 ng/mL y 26.2 para Baja y Alta progesterona) que fueron superiores a las observadas en vacas de Alta progesterona. En conclusión, altas concentraciones de progesterona en plasma suprimieron la liberación hipofisaria de LH y redujeron la respuesta ovulatoria después

de la administración de GnRH tanto en vacas como en vaquillonas. Sin embargo, los resultados no sostuvieron la hipótesis de que la adenohipofisis de la vaquillona era más sensible que la adenohipofisis de la vaca a la supresión de progesterona y esto se discutirá más detalladamente en la próxima sección.

En un último estudio se investigó si la supresión de la liberación de LH inducida por progesterona se podía disminuir con una dosis mayor de GnRH o con un pretratamiento con estradiol ⁽¹⁷⁾. En el Experimento 1, se realizó la aspiración folicular de los dos folículos más grandes en vaquillonas Angus 5 días después de la ovulación. En ese momento también se colocó un CIDR y se asignaron al azar para recibir dos dosis de PGF separadas 12 h (Baja progesterona) o ningún tratamiento (Alta progesterona). Seis días después de la aparición de una nueva onda folicular, la mitad de las vaquillonas de cada grupo recibieron 100 o 200 µg de GnRH (Cystorelin). Las concentraciones de LH en plasma después del tratamiento con Cystorelin fueron más altas en el grupo de Baja progesterona vs. el grupo de Alta progesterona y en vaquillonas que recibieron 200 vs. 100 µg (15.4 ± 2.2 vs. 9.1 ± 1.2 y 14.8 ± 2.1 vs. 9.8 ± 1.4 ng/mL, respectivamente). La tasa de ovulación fue más alta en el grupo de Baja progesterona (100%) que en el grupo de Alta progesterona (75%). Numéricamente las vaquillonas tratadas con 100 µg de Cystorelin tuvieron menor tasa de ovulación (56 vs. 76%) y particularmente aquellas que pertenecían al grupo de Alta progesterona (13 vs. 63%). En el Experimento 2, un grupo de vaquillonas fueron tratadas de manera similar que en el Experimento 1, excepto que 5.5 d después de la emergencia de la onda folicular, la mitad de las vaquillonas en cada grupo fueron asignadas para recibir 0.25 mg de benzoato de estradiol 8 h antes de la administración de 100 µg de Cystorelin. Ambos grupos tratados con estradiol (Baja y Alta progesterona) y el grupo de Baja progesterona sin estradiol tuvieron concentraciones máximas de LH plasmáticas más altas que el grupo de Alta progesterona sin estradiol (12.6 ± 1.8 , 10.4 ± 1.8 , 8.7 ± 1.3 y 3.9 ± 1.2 ng/mL, respectivamente). Sin embargo, el pretratamiento con estradiol no aumentó las tasas de ovulación en respuesta al tratamiento con Cystorelin. En resumen, concentraciones fisiológicas de progesterona suprimieron la liberación de LH inducida por GnRH y disminuyeron la tasa de ovulación en comparación con concentraciones de progesterona subluteales. El efecto supresor de la progesterona sobre la liberación de LH se sobrepuso parcialmente aumentando la dosis de GnRH de 100 a 200 µg. El tratamiento con benzoato de estradiol antes de la administración de GnRH promovió la liberación de LH en vaquillonas con concentraciones plasmáticas elevadas de progesterona, pero no aumentó significativamente la tasa de ovulación. Con el fin de sincronizar una nueva onda folicular, la ovulación después del

tratamiento con GnRH podría incrementarse minimizando las concentraciones de progesterona circulante en el momento del tratamiento. Además, el efecto supresor de progesterona sobre la respuesta de GnRH puede mitigarse, al menos parcialmente, aumentando la dosis de GnRH o con un pretratamiento con benzoato de estradiol.

EFFECTO DE LA PARIDAD, LA PRESINCRONIZACIÓN Y LA CICLICIDAD A LA RESPUESTA OVULATORIA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GNRH

Los porcentajes de ovulación observados por nuestro grupo de trabajo en vaquillonas y vacas de carne y leche después del tratamiento con GnRH al inicio de un protocolo de sincronización son presentados en la Tabla 1.

Como se mencionó anteriormente, la respuesta ovulatoria es marcadamente más baja en vaquillonas que en vacas y el porqué de esta diferencia no se ha elucidado todavía. Si bien existen diferencias fisiológicas entre vacas y vaquillonas, tales como la concentración de progesterona circulante y la dinámica folicular, que incitarían a especular que sean las razones, hasta el momento ningún trabajo de investigación ha demostrado que lo sean. En nuestro trabajo discutido en la sección anterior⁽¹⁶⁾, las concentraciones máximas de LH como el área bajo la curva en vaquillonas con Baja y Alta concentración de progesterona circulante difirieron significativamente de aquellas vacas que tenían alta concentración de progesterona. Por lo tanto, la concentración de progesterona circulante no pareciera ser el factor diferencial entre vacas y vaquillonas, por el contrario, nuestros resultados sugerirían un mayor efecto supresor de la progesterona sobre la hipófisis de la vaca.

Table 1. Respuesta ovulatoria en diferentes categorías de animales y razas que fueron o no presincronizados y estaban o no ciclando posterior a un protocolo de sincronización basado en GnRH¹.

Paridad y raza	Presincronización		Ciclicidad		Referencia
	Si	No	Si	No	
Vacas de carne ²	158/208 (76%)	111/211 (53%)	--	--	(23)
Vaquillonas de carne ²	78/128 (61%)	--	--	--	(23)
Vacas Holstein	--	82/185 (44%)	65/165 (39%)	17/20 (85%)	(24)
Vaquillonas Holstein	--	27/91 (30%)	--	--	(25)
Vacas Holstein	149/241 (62%)	--	--	--	(26)
Vacas Holstein	99/217 (46%)	110/391 (28%)	150/501 (30%)	59/107 (55%)	(27)
Vacas Holstein	755/1374 (55%)	--	--	--	(28)
Vacas Holstein	367/490 (75%)	--	--	--	(29)
Vacas Holstein	--	110/266 (41%)	--	--	(30)
Vacas de carne ³	--	115/208 (55%)	--	--	(31)
Vaquillonas de carne ³	--	54/152 (36%)	--	--	(31)

¹ Los datos presentados en esta tabla han sido publicados por los autores (para más información ver referencias citadas). ² Gelbvieh and Angus-cross. ³ Angus and Hereford-cross.

Si bien hay diferencias en cuanto a la dinámica folicular entre vacas y vaquillonas Bos Taurus, cabe aclarar que no todas las vacas son de dos ondas foliculares ni tampoco las vaquillonas lo son de 3 ondas foliculares y que ha habido discrepancia entre reportes en cuanto a la proporción de 2 y 3 ondas foliculares en vacas y vaquillonas. Sin embargo, podríamos proponer que las vacas Bos Taurus son predominantemente de dos ondas foliculares y los ciclos de tres ondas foliculares parecen ser más frecuentes en vaquillonas. A pesar de esta modesta

diferencia, es improbable que la dinámica folicular sea la razón principal de la diferencia en la respuesta ovulatoria a la GnRH observada entre vaquillonas y vacas. En un hipotético ciclo estral de 23 días, las vaquillonas de 2 ondas tendrían 13 días con un folículo en condiciones óptimas de ovulación (≥ 10 mm y en fase de crecimiento), en cambio las vaquillonas de 3 ondas tendrían 11 días, lo cual se traduciría en hasta un 10% de diferencia en respuesta ovulatoria a favor de un animal con 2 ondas foliculares, lo cual es mucho menor a la diferencia reportada entre vacas y vaquillonas (Tabla 1).

Como ha sido mencionado anteriormente, el momento del ciclo estral al inicio de un tratamiento basado en GnRH y PGF afecta el porcentaje de ovulación a la primera GnRH y reduce la tasa de preñez a la IATF. Por este motivo, una serie de modificaciones se han desarrollado para mejorar la eficacia de los protocolos de estos protocolos tanto en vaquillonas como en vacas. Para una revisión más detallada leer los artículos de Colazo y Mapletoft ⁽⁶⁾ y Sanz et al. ⁽⁷⁾. Una de esas modificaciones es el uso de una presincronización previa al inicio de un protocolo basado en GnRH. La presincronización realizada mediante la administración de dos dosis de PGF, o una combinación de GnRH y PGF o progestágeno y PGF, ha resultado en una mayor respuesta ovulatoria a la GnRH inicial y una mejor tasa de preñez y son usadas de rutina en el manejo reproductivo del ganado lechero. Brevemente, la presincronización mejora la respuesta ovulatoria a la GnRH porque optimiza el tamaño folicular al momento del tratamiento, sin embargo, la mejor tasa de preñez no es solamente por una mayor respuesta ovulatoria pero también porque el nuevo folículo dominante crece bajo una concentración óptima de progesterona.

Por último, la ciclicidad podría afectar la respuesta ovulatoria a la administración de GnRH. En nuestros trabajos con vacas Holstein (Tabla 1), la respuesta ovulatoria fue mayor en animales que no estaban ciclando. Esta observación no es del todo sorprendente, ya que las vacas Holstein que no están ciclando después del periodo de espera voluntaria en sistemas de producción en Canadá, tienen, en su mayoría, folículos por encima de los 10 mm de diámetro y, sin el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la liberación de LH. Esto no sería el caso en animales que no estén ciclando debido a un estrés nutricional con un estado corporal bajo como puede ocurrir en el ganado de carne o leche en sistemas de producción bajo sistema de pastoreo. Por lo tanto, nuestra observación no puede ser extrapolada al ganado bajo otro sistema de manejo.

PRODUCTOS COMERCIALES: COMPONENTES, DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Actualmente, hay muchos agonistas de la GnRH disponibles comercialmente en el mercado veterinario (Tabla 2). Las gonadorelinas y fertilinas son decapeptidos sintéticos con una estructura idéntica a la GnRH natural y las buserelinas y lecirelinas son nonapeptidos con una estructura similar a la GnRH, pero con una mayor afinidad, potencia y prolongada acción.

Table 2. Lista de agonistas de la GnRH disponibles comercialmente en el mercado veterinario¹.

Nombre comercial	Laboratorio	Componente	Dosis recomendada	Vía de administración
Cystorelin®	Merial	Diacetato de gonadorelina tetrahidratado	100 µg (2 mL)	IM
Factrel®	Zoetis	Clorhidrato de gonadorelina	100 µg (2 mL)	IM
Fertagyl®	Merck Animal Health	Diacetato de gonadorelina tetrahidratado	100 µg (2 mL)	IM o IV
Fertiline	Vetoquinol	Acetato de gonadorelina	100 µg (2 mL)	IM
Receptal®	MSD	Acetato de buserelina	25 µg (1 mL)	IM
Reprorelina®	Vetoquinol	Acetato de lecirelina	10 µg (2.5 mL)	IM
Ovacyst	Bayer	Diacetato de gonadorelina tetrahidratado	100 µg (2 mL)	IM o IV
Concelar ^{1,2}	Takeda Cering Purau Animal Health	Acetato de fertirelina	100 µg (2 mL)	IM

¹ Los productos descritos en esta tabla han sido usados por el autor o su uso es mencionado en este artículo. ²Originalmente disponible en Austria, Inglaterra y Japón, podría no estar actualmente disponible en el mercado con este nombre comercial.

En el ganado vacuno, la dosis recomendada de Fertagyl, Fertiline, Receptal o Reproline no tiene retiro de leche o carne. Sin embargo, el uso de Cystorelin o Factrel requiere un retiro de carne de 7 días.

COMPARACIÓN DE AGONISTAS DE LA GNRH DISPONIBLES COMERCIALMENTE

Muchos estudios han comparado diferentes productos comerciales de GnRH disponibles en el mercado veterinario.

Uno de los primeros estudios fue el realizado por Chenault et al. ⁽¹⁰⁾ donde se compararon perfiles de LH y FSH después de la administración de varias dosis de los análogos acetato de fertirelina (25, 50, 100 y 200 µg), diacetato de gonadorelina tetrahidratado (100, 250 y 500 µg), o acetato de buserelina (10 y 20 µg) en vaquillonas Holstein entre el día 8 y 16 del ciclo estral. Las concentraciones séricas de LH y FSH aumentaron dentro 15 min después de la inyección de fertirelina y permaneció elevado por encima de la concentración basal durante aproximadamente 3 a 6 horas, dependiendo de la dosis. Las concentraciones de LH aumentaron con cada aumento de la dosis de fertirelina, de 25 a 100 µg; sin embargo, no hubo un aumento significativo entre 100 y 200 µg. A medida que se aumentó la dosis de fertirelina, se aumentó el intervalo entre el tratamiento y el pico de LH, indicando que la liberación de LH se estimuló por un periodo de tiempo más prolongado después de la administración de dosis más altas de fertirelina. Dosis de 50 µg o más de fertirelina y ambas dosis de buserelina (10 y 20 µg) resultaron en mayor liberación de LH que 100 y 250 µg de gonadorelina. Sin embargo, la liberación de LH después de la administración de 500 µg de gonadorelina fue similar a 100 o 200 µg de fertirelin. En cuanto al tratamiento con 10 µg de buserelina, resultó en mayor liberación de LH que 25, 50 µg de fertirelin o cualquier dosis de gonadorelina. Basado en la liberación de LH, los autores concluyeron que acetato de fertirelin es aproximadamente 4 veces más potente que diacetato de gonadorelina tetrahidratado y que acetato de buserelina es 10 veces más potente que fertirelina y 50 veces más potente que gonadorelina.

Otro estudio más reciente de la Universidad de Toulouse en Francia ⁽³²⁾ tuvo como objetivo comparar los perfiles plasmáticos de LH y progesterona y la dinámica folicular en respuesta a la administración de las dosis recomendadas de Cystorelin (diacetato de gonadorelina tetrahidratado), Reprorelina (acetato de lecirelina) o Receptal (acetato de buserelina). También se evaluó la respuesta biológica a media dosis de lecirelina. En un diseño de cuadrado latino, se utilizaron vacas Holstein (n = 12) que recibieron los siguientes tratamientos: 1) 100 µg de gonadorelina, 2) 25 µg de lecirelina, 3) 50 µg de lecirelina, o 4) 10 µg de buserelina en el día 6 o 7 del ciclo estral. Se tomaron muestras de sangre regularmente hasta 4 días después de la administración de GnRH. La respuesta de LH en plasma se evaluó hasta 6 horas después

del tratamiento, y la respuesta de progesterona plasmática y la dinámica folicular ovárica fueron evaluados por 4 días. Hubo una liberación de LH significativamente más baja después de la administración de gonadorelina en comparación con los otros 3 tratamientos. La concentración media máxima de LH después del tratamiento con gonadorelina se alcanzó 1 hora antes y fue 2.5 veces menor que el tratamiento con lecirelina (25 o 50 µg) o buserelina. Cuatro días después de la administración de GnRH (es decir, en los días 10 y 11 del ciclo estral), el aumento promedio en la concentración de progesterona en plasma fue del 70% y no difirió entre los tratamientos. El porcentaje de ovulación fue 73%, 82%, 100% y 100%, para 100 µg de gonadorelina, 25 µg de lecirelina, 50 µg de lecirelina y 10 µg de buserelina, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados sugerirían que lecirelina y buserelina inducen una mayor liberación de LH que gonadorelina y que el doble de la dosis recomendada de lecirelina (50 µg) es necesaria para obtener la misma repuesta ovulatoria que la recomendada dosis de buserelina (10 µg).

Otros autores compararon diferentes gonadorelinas disponibles en el mercado veterinario en Norte América. Un estudio de la Universidad de Saskatchewan ⁽¹¹⁾ tuvo como objetivo evaluar la secreción de LH y la dinámica folicular en vacas y vaquillonas después de la administración de 3 formulaciones de gonadorelina que estaban comercialmente disponible en Canadá. En el experimento 1, vacas Holstein no lactantes (n = 4 por grupo) fueron aleatoriamente asignadas para recibir 100 µg de diacetato de gonadorelina tetrahidratado, por vía intramuscular (Cystorelin o Fertagyl) al azar del ciclo estral. Se tomaron muestras de sangre para determinar la concentración de LH a las 0, 1, 2 y 4 horas después del tratamiento. En el experimento 2, se utilizaron vacas Holstein no lactantes (n = 10 por grupo) que recibieron 100 µg de gonadorelina de la siguiente manera: 2 mL de Cystorelin; 1 ml de Fertagyl; o 2 mL de Factrel (clorhidrato de gonadorelina). El tratamiento se realizó los días 6 o 7 del ciclo estral y la determinación de LH se realizó a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas después del tratamiento. Se examinaron los ovarios mediante ultrasonografía, dos veces al día, para detectar la ovulación. En el experimento 3, vaquillonas de carne (n = 10 por grupo) fueron asignadas al azar para recibir 1 de las 3 gonadorelinas (Cystorelin, Fertagyl o Factrel) a los 6 o 7 del ciclo estral y se tomaron muestras de sangre a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 horas después del tratamiento. En el experimento 1, las concentraciones plasmáticas de LH aumentaron significativamente por 1 o 2 h y disminuyó a los niveles basales a las 4 h después del tratamiento con GnRH. La concentración media de LH tendió a ser mayor en el grupo Cystorelin que en que en el grupo Fertagyl. En los experimentos 2 y 3, las concentraciones

plasmáticas medias y máximas de LH fueron más altas en el ganado tratado con Cystorelin. La proporción de folículos dominantes que ovularon fue mayor en vacas Holstein tratadas con Cystorelin que en aquellas tratadas con Fertagyl o Factrel (95%, 58% y 57%, respectivamente), pero no hubo diferencia significativa entre las gonadorelinas en vaquillonas de carne (60%, 60% y 40%, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre gonadorelinas para el intervalo desde el tratamiento hasta la aparición de la siguiente onda folicular. En resumen, Cystorelin indujo una mayor liberación de LH y esto resultó en una mayor tasa de ovulación en vacas Holstein, pero no en vaquillonas de carne.

Souza et al. ⁽³³⁾ evaluó cuatro productos de gonadorelina disponibles comercialmente en los Estados Unidos. En este estudio se determinó la respuesta al tratamiento con GnRH en vacas lecheras 7 días después del último tratamiento con GnRH de un protocolo Ovsynch. Las vacas seleccionadas (con un cuerpo lúteo (CL) ≥ 15 mm y al menos un folículo ≥ 10 mm) se dividieron al azar para recibir una dosis de 100 μg de: (1) Cystorelin (n = 146); (2) Factrel (n = 132); (3) Fertagyl (n = 140); o (4) Ovacyst (diacetato de gonadorelina tetrahidratado, n = 140). Siete días después del tratamiento, se determinó la ovulación mediante la detección de un CL accesorio a través de ultrasonografía. Las concentraciones circulantes de LH también se evaluaron en algunas vacas después del tratamiento con 100 μg (n = 10 por grupo) o 50 μg (n = 5 por grupo) de GnRH. El porcentaje de vacas que ovularon difirió entre las gonadorelinas, siendo más bajo el de Factrel (55%) comparado con Cystorelin (77%), Fertagyl (74%) u Ovacyst (85%). No hubo efecto del lote, la paridad o el tamaño del folículo en la respuesta ovulatoria, pero el aumento de la condición corporal disminuyó la respuesta ovulatoria. Hubo una liberación de LH mucho mayor en las vacas tratadas con 100 μg que en las tratadas con 50 μg , pero no hubo diferencias detectables entre gonadorelinas sobre el perfil de LH circulante después del tratamiento. Por lo tanto, este estudio sugiere que la repuesta ovulatoria a la administración de Factrel es menor que la de Cystorelin, Fertagyl u Ovacyst, aunque no se demostró un mecanismo que explique esa diferencia entre productos.

GONADORELINAS: EFECTO DE LA DOSIS

Las gonadorelinas son los agonistas de GnRH más comúnmente usados en el ganado bovino en Norte América y la dosis recomendada es de 100 μg independientemente de la sal utilizada (Tabla 1). Sin embargo, varios autores han comparado diferente dosis de gonadorelinas en el

ganado vacuno y los resultados de esos estudios sugerirían que la dosis óptima de gonadorelina es quizás superior a la dosis recomendada.

En el trabajo de Chenault et al. ⁽¹⁰⁾ descrito anteriormente, la administración de 100, 200 o 500 µg de diacetato de gonadorelina tetrahidratada (Cystorelin), en vaquillonas Holstein en diestro, resulto en áreas debajo de la curva de LH de 328, 535 y 1805, respectivamente. Los picos de LH sérica fueron 2.5, 4.6 y 13.1 para 100, 200 o 500 µg de diacetato de gonadorelina tetrahidratada.

Nuestro grupo de trabajo comparó ⁽³⁴⁾ las concentraciones plasmáticas de LH en vacas ovariectomizadas tratadas con 50, 100 o 250 µg de acetato de gonadorelina (Fertiline). Fue muy evidente que una dosis de 250 µg de GnRH aumentó la concentración de LH plasmática en comparación con 50 y 100 µg, pero no se observó ninguna diferencia significativa entre los niveles plasmáticos de LH entre vacas que recibieron 50 o 100 µg de GnRH. En concordancia con nuestros resultados, una dosis de 50 µg de GnRH diacetato de gonadorelina tetrahidratada fue tan eficaz como 100 µg cuando se utilizaron en un protocolo Ovsynch en vacas lecheras en lactación ⁽³⁵⁾, con una tasa de preñez global a la IATF del 41%. Sin embargo, Souza et al. ⁽³³⁾ observo una mayor liberación de LH en vacas tratadas con 100 que con 50 µg.

En el trabajo de Dias et al. ⁽¹⁷⁾, que ya ha sido descrito más detalladamente, las concentraciones de LH en plasma (14.8 ± 2.1 vs. 9.8 ± 1.4 ng/mL) y el porcentaje de ovulación (76% vs. 56%) fueron más altos en vaquillonas que recibieron 200 vs. 100 µg de diacetato de gonadorelina tetrahidratada (Cystorelin). Mas recientemente, Giordano et al. ⁽³⁶⁾ reportó que vacas lecheras que recibieron 200 µg de diacetato de gonadorelina tetrahidratado (Fertagyl) tuvieron un pico de LH y un área debajo de la curva mayor que vacas que recibieron 100 µg, independientemente de los niveles plasmáticos de progesterona al momento del tratamiento.

En conformidad con los resultados descritos anteriormente, Mihm et al. ⁽³⁷⁾ informaron que 250 µg de diacetato de gonadorelina tetrahidratada fue más eficaz que 100 µg en inducir la ovulación en vaquillonas de carne tratadas durante el diestro. Sin embargo, la inclusión de dosis altas de GnRH en un protocolo de IATF no se ha investigado en vaquillonas.

Por lo tanto, sería de esperar que una dosis de gonadorelina superior a la recomendada de 100 µg sería más beneficiosa especialmente cuando la GnRH se administra durante el diestro y en vaquillonas que tienen una menor respuesta ovulatoria que las vacas.

Conclusiones

Alta concentraciones de progesterona reducen tanto la liberación de LH como la respuesta ovulatoria, sin embargo, la concentración de estrógeno en sangre tiene un efecto positivo sobre la liberación de LH. Por lo tanto, una mayor tasa de ovulación después de la administración de GnRH podría incrementarse minimizando las concentraciones de progesterona circulante y aumentando las concentraciones de estrógeno en el momento del tratamiento.

La presincronización aumenta el porcentaje de ovulación a la GnRH inicial y mejora la tasa de preñez, consecuentemente, esta estrategia es de uso rutinario en vacas Holstein lactantes. Sin embargo, la tasa de ovulación es por lo general más baja en vaquillonas que en vacas, pero no se confirmó la hipótesis de que las vaquillonas eran más sensibles que las vacas a los efectos supresores de la progesterona. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias con el objetivo de optimizar los programas de IATF en vaquillonas

Los nonapéptidos tienen una mayor afinidad, potencia y acción prolongada que los decapeptidos sintéticos con una estructura idéntica a la GnRH natural. En aquellos mercados veterinarios en los cuales los nonapéptidos estén disponibles, su utilización sería el recomendado.

Dosis más altas de gonadorelina, que las recomendadas, inducen una mayor liberación de LH y podrían resultar en una mayor tasa de ovulación independientemente de la concentración circulante de esteroides.

Agradecimientos

Los autores agradecen a estudiantes, productores y empresas farmacéuticas que colaboraron con los trabajos de investigación mencionados en este artículo. Los autores también expresan un sincero agradecimiento al Dr. Marcelo Ratto (Universidad Austral de Chile) por la revisión científica del artículo.

Bibliografía

1. Kittok RJ, Britt JH, Convey EM. Endocrine response after GnRH in luteal phase cows and cows with ovarian follicular cysts. *J Anim Sci* 1973; 37:985-989.
2. Schams D, Hofer F, Hoffmann B, Ender M, Karg H. Effects of synthetic LH-RH treatment on bovine ovarian function during oestrous cycle and postpartum period. *Acta Endocrinologica Suppl* 1973: 177:296 (Abstr.).
3. Britt JH, Kittok RJ, Harrison DS. Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. *J Anim Sci* 1974; 39:915-919.
4. Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. *J Anim Sci* 1995; 73:3141-3151.
5. Martínez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 1999; 57:23-33.
6. Colazo MG and Mapletoft RJ. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J* 2014; 55:772-780.
7. Sanz A, Macmillan K, Colazo MG. Revisión de los programas de sincronización ovárica basados en el uso de hormona liberadora de gonadotropinas y prostaglandina F2 α para novillas de leche y de carne. *ITEA-Inf. Tec. Econ. Agrar.* 2019; 115: 326-341.
8. Perrett RM and McArdle CA. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. *Front. Endocrinol* 2013; 4:180. doi: 10.3389/fendo.2013.00180.
9. Kaltenbach CC, Dunn TG, Kiser TE, Corach LR, Akbar AM, Niswender GD. Release of FSH and LH in beef heifers by synthetic gonadotrophin releasing hormone. *J Anim Sci* 1974; 38:357-362.
10. Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology* 1990; 34: 81-98.
11. Martínez M, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Carruthers T. The effects of 3 gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. *Can Vet J* 2003; 44:125-131.
12. Macmillan KL and Thatcher WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 1991; 45:883-889.
13. Kesler D J; Elmore R G; Brown E M; Garverick H A. Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. I. Gross ovarian morphology and endocrinology. *Theriogenology* 1981;16: 207-217.
14. Moreira F, de la Sota RL, Diaz T, Thatcher WW. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J Anim Sci* 2000; 78:1568-1576.
15. Di Gregorio GB and Nett TM. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod* 1995; 53:166-172.

16. Colazo MG, Davis H, Rutledge MD, Kastelic JP, Martinez MF, Small JA, Mapletoft RJ. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Domest Anim Endocrinol* 2008; 34:109-117.
17. Dias FCF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ, Adams GP, Singh J. Progesterone concentration, estradiol pre-treatment, and dose of GnRH affect GnRH-mediated LH release in beef heifers. *Domest Anim Endocrinol* 2010; 39:155-162.
18. Xu ZZ, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 1995; 53:951-957.21.
19. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44:915-923.
20. Schoenemann HM, Humphrey WD, Crowder ME, Nett TM, Reeves JJ. Pituitary luteinizing-hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian-steroids. *Biol Reprod* 1985; 32:574-583.
21. Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli LA. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:33-42.
22. Baratta M, West LA, Turzillo AM, Nett TM. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 2001; 64:714-719.
23. Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 2009; 71:698-706.
24. Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with gonadotropin releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 2009a; 72:262-270.
25. Colazo MG, Ambrose DJ. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affect pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology* 2011; 76:578-588.
26. Colazo MG, Ponce-Barajas P, Ambrose DJ. Pregnancy per AI in lactating dairy cows subjected to two different intervals from presynchronization to initiation of Ovsynch protocol. *J Dairy Sci* 2013a; 96:7640-7648.
27. Colazo MG, Dourey A, Rajamahendran R, Ambrose DJ. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2013b; 79:833-841.
28. Dirandeh E, Rezaei Roodbari A, Gholizadeh M, Deldar H, Masoumi R, Kazemifard M, Colazo MG. Administration of prostaglandin F 2α 14 d before initiating a G6G or a G7G timed artificial insemination protocol increased circulating progesterone prior to artificial insemination and reduced pregnancy loss in multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci* 2015a; 98:5414-5421.

-
29. Dirandeh E, Rezaei Roodbari A, Colazo MG. Double-Ovsynch, compared to Presynch with or without GnRH, improves fertility in heat-stressed lactating dairy cows. *Theriogenology* 2015b; 83:438-443.6.
 30. Colazo MG and Ambrose DJ. Effect of initial GnRH and duration of progesterone insert treatment on the fertility of lactating dairy cows. *Reproduction Domestic Animal* 2015; 50:497-504.
 31. Zwiefelhofer EM, Macmillan K, Gobikrushanth M, Adams GP, Yang SX, Anzar M, Asai-Coakwell M, Colazo MG. Comparison of two intravaginal progesterone-releasing devices in shortened-timed artificial insemination protocols in beef cattle. *Theriogenology* 2021; 168: 75-82.
 32. Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Freina P, Gayrard V. Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology* 2015; 84:177-183.
 33. Souza AH, Cunha AP, Silva EPB, Gumen A, Ayres H, Guenther JN, Wiltbank MC. Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows: Efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. *Theriogenology* 2009; 72:271-279.
 34. Colazo MG, Ree T, Emmanuel DGV, Ambrose DJ. Plasma luteinizing hormone concentrations and luteal function in cows given repeated treatments or various doses of gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology* 2009b; 71:984-992.
 35. Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1998; 50:1275-1284.
 36. Giordano JO, Fricke PM, Guenther JN, Lopes Jr G, Herlihy MM, Nascimento AB, Wiltbank MC. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci* 2012; 95:3781-3793.
 37. Mihm M, Delatang F, Roche JF. The gonadotrophin and ovarian responses to an intermediate or low dose of gonadorelin in beef heifers: influence of dose, follicle status and progesterone environment. *J Reprod Fertil* 1998; 21: 74 (Abstr.).