

# Efecto de la GnRH postinseminación sobre la concentración de progesterona y las tasas de concepción en vacas repetidoras Holstein en condiciones de estrés calórico

## The effect of GnRH after insemination on progesterone concentrations and conception rates in repeat-breeding Holstein cows under heat stress conditions

Jorge Enrique Cruz Velázquez<sup>a</sup>, Carlos Alejandro Elizondo Vázquez<sup>a</sup>, Raúl Ulloa Arvizu<sup>b</sup>, Ilda Graciela Fernández García<sup>a</sup>

### RESUMEN

El objetivo fue evaluar la respuesta de la administración de gonadorelina (GnRH) en el día 5, y en el día 11 postinseminación, sobre las concentraciones de progesterona plasmática y las tasas de concepción en vacas repetidoras Holstein en condiciones de estrés calórico. Se conformaron al azar tres grupos: 1) 100 µg de gonadorelina en el día 5 (GnRH-5; n=33); 2) misma dosis en el día 11 (GnRH-11; n=34) postinseminación, y 3) un grupo testigo (no GnRH; n=34). Se obtuvieron muestras sanguíneas en los días 8, 11, 14, 17, 20 y 23 postinseminación para la determinación de la concentración de progesterona plasmática (P4) mediante RIA. El diagnóstico de preñez fue por palpación rectal en el día 43 ± 3 postinseminación. Las concentraciones de P4 fueron mayores para el tratamiento GnRH-5 en el día 11 postinseminación ( $P < 0.05$ ). Las tasas de concepción no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ), GnRH-5 (4/33; 12.1 %), GnRH-11 (4/34; 11.8 %) y testigo (5/34; 14.7 %). Las vacas fueron inseminadas con un Índice de temperatura-humedad de  $\geq 72$  unidades, que indica que se encontraban en condiciones de estrés calórico. Se concluye que con la administración de GnRH en el día 5 se elevaron las concentraciones plasmáticas de progesterona pero no se incrementaron las tasas de concepción en vacas repetidoras Holstein con estrés calórico.

**PALABRAS CLAVE:** Vacas repetidoras, GnRH, Progesterona, Tasas de concepción, ITH, Estrés calórico.

### ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the response to the administration of gonadorelin (GnRH) on days 5 and 11 post-artificial insemination (PAI) on plasma progesterone concentrations and conception rates in repeat-breeding Holstein cows, under heat stress conditions. Three treatment groups were set at random: T1) 100 µg gonadorelin on d 5 PAI (GnRH-5; n=33); T2) 100 µg gonadorelin on d 11 (GnRH-11; n=34) PAI; T3) controls (no GnRH; n=34). Blood samples were collected on d 8, 11, 14, 17, 20, and 23 PAI for the determination of plasma progesterone (P4) concentrations by radio-immuno-assay (RIA). Pregnancy was diagnosed by rectal palpation on d 43 ± 3 PAI. P4 concentrations were higher ( $P < 0.05$ ) in T1 (GnRH-5) on d 11 PAI. Conception rates did not differ ( $P > 0.05$ ): T1 (GnRH-5) = 4/33, 12.1 %; T2 (GnRH-11) = 4/34, 11.8 %; T3 (Control) = 5/34, 14.7 %. Cows were inseminated under a temperature/humidity index (THI)  $\geq 72$  units, i.e.: heat stress. It was concluded that the administration of GnRH on d 5 resulted in increased plasma progesterone concentrations, but this did not improve conception rates in repeat-breeding Holstein cows under heat stress conditions.

**KEY WORDS:** Repeat-Breeding, GnRH, Progesterone, Conception rates, Temperature/Humidity Index (THI), Heat stress.

El aumento de la infertilidad de las vacas lecheras durante las últimas décadas y los efectos negativos

In the last decades, increased infertility rates in dairy cattle and negative effects of heat stress on

Recibido el 2 de noviembre de 2007. Aceptado para su publicación el 7 de julio de 2008.

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera Santa Fe. 27054 Torreón, Coahuila, México. Tel. 01 871 729 76 67; Fax 01 871 7297610 . ilda\_fernandez\_garcia@yahoo.com.mx. Correspondencia al último autor.

<sup>b</sup> Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

que el estrés calórico tiene sobre la fertilidad han sido ampliamente descritos a nivel mundial<sup>(1-3)</sup>. La disminución en las tasas de concepción puede ser debida, entre otros factores, por el efecto nocivo que el estrés calórico tiene sobre el desarrollo folicular<sup>(4)</sup>, en el desarrollo inadecuado del subsiguiente cuerpo lúteo (CL)<sup>(5)</sup>, en la producción insuficiente de progesterona lútea (P4)<sup>(6)</sup> o en el desarrollo embrionario deficiente<sup>(7)</sup>. Las concentraciones circulantes de P4 en tiempos específicos favorece el mantenimiento de la preñez<sup>(8)</sup>. Un nivel de progesterona menor al óptimo contribuye en la baja fertilidad. La inyección de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o sus agonistas, a la mitad del ciclo estral, tiene efectos luteotrópicos, debido a que la secreción de P4 por el CL puede ser incrementada en un corto tiempo y hasta por más de 12 días después de la administración de la GnRH, mediante la inducción de la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la glándula pituitaria<sup>(9)</sup>, por lo que se ha utilizado con el fin de que ocurra la ovulación y la subsiguiente luteinización de un folículo astral, dando como resultado la formación de un CL accesorio y en consecuencia aumentar la concentración de progesterona sanguínea, en el tiempo apropiado después de la inseminación artificial (IA).

En numerosos estudios se han investigado los efectos de la GnRH en la fertilidad cuando se aplica en los días 5, 6<sup>(10,11)</sup> o en los días 11, 12, 13, 14<sup>(12,13)</sup> después de la IA, y los resultados han sido diversos. De las propuestas disponibles para mejorar la fertilidad en los bovinos, se seleccionó una para medir la concentración de progesterona plasmática durante la preñez temprana en la vaca lechera. La hipótesis de este trabajo fue que la elevación de las concentraciones de P4 en vacas lecheras repetidoras, pocos días después de la IA, incrementa las tasas de concepción. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la administración de GnRH en el día 5 o en el 11 postinseminación sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona y las tasas de concepción en vacas repetidoras Holstein en condiciones de estrés calórico.

fertility have been broadly described worldwide<sup>(1,2,3)</sup>. Decreased conception rates can be due –among other factors– to the adverse effect of heat stress on follicular development<sup>(4)</sup>, poor corpus luteum (CL) development<sup>(5)</sup>, insufficient production of luteal progesterone<sup>(6)</sup> or poor embryo development<sup>(7)</sup>. Adequate circulating P4 concentrations at specific times aid to maintain pregnancy<sup>(8)</sup>. Suboptimal progesterone levels contribute to low fertility. The injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or its agonists in the mid estrus cycle has luteotropic effects, given that CL secretion of P4 can be increased within a short period of time and for  $\geq 12$  d after GnRH administration, by the induced release of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) from the pituitary gland<sup>(9)</sup>. Therefore, the administration of GnRH has been used to promote ovulation with the subsequent luteinization of the estral follicle, resulting in the formation of an accessory CL, thus increasing blood progesterone concentrations at the right time after artificial insemination (AI).

Several studies have investigated the effects of GnRH on fertility when given on d 5, 6<sup>(10,11)</sup> 11, 12, 13, or 14<sup>(12,13)</sup> post-AI (PAI) with varying results. One of existing protocols to improve cow fertility was selected to measure plasma progesterone concentrations during the early pregnancy in dairy cows. The hypothesis used for this study was that the elevation of P4 concentrations in repeat-breeding dairy cows a few days PAI results in increased conception rates. The purpose of this research was to evaluate the effects of GnRH administration on d 5 or 11 PAI on plasma progesterone concentrations, and conception rates in repeat-breeding Holstein cows, under heat stress conditions.

The study was conducted in a commercial dairy located in La Laguna area, State of Durango, Mexico (26° N, 103° O; 1,200 m asl); Weather is semi-arid (BSh), with a mean rainfall rate of 253 mm and an annual mean temperature of 23.4 °C (36.6 °C, from May to August), in accordance with data published by Mexico's National Water Commission. The study was performed from May to August. One hundred and one (101) repeat-breeding Holstein cows (3 - 7 inseminations) were

El estudio se llevó a cabo en un establo comercial de la Comarca Lagunera en el estado de Durango de México (26° N, 103° O; 1,200 msnm); el clima es semi-árido (BSh), con precipitación pluvial media anual de 253 mm y temperatura media anual de 23.4 °C (36.6 °C, de mayo a agosto), según datos de la Comisión Nacional del Agua. El estudio se realizó de mayo a agosto. Se utilizaron 101 vacas Holstein repetidoras (con 3 a 7 IA), se considera que una vaca es repetidora, cuando habiendo tenido ciclos estrales normales y sin presentar lesiones genitales a la palpación rectal, no ha quedado gestante después de por lo menos 3 inseminaciones<sup>(14,15)</sup>. Con una condición corporal de  $3.07 \pm 0.04$  (escala de 1.0 a 5.0, con 1 emaciada y 5 obesa) y un número de lactancias de  $1.94 \pm 0.17$ . Las vacas se alimentaron en base a una dieta mixta total con 17.5 % de proteína cruda, 1.7 Mcal/kg de energía neta de lactación y estabuladas en corrales en forma de abanico con una sombra convencional de 500 m<sup>2</sup> a una altura de 4.5 m.

Las vacas se distribuyeron al azar en tres grupos. Se les aplicaron 100 µg de acetato de gonadorelina im (GonasyI, Syva) postinseminación; al primer grupo en el día 5 (GnRH-5; n=33), al segundo grupo en el día 11 (GnRH-11; n=34) y el tercer grupo testigo no recibió terapia hormonal (n=34). Las vacas fueron inseminadas por un mismo técnico con experiencia.

Se seleccionaron de manera aleatoria 17 vacas de cada uno de los grupos y se obtuvieron muestras sanguíneas por punción en la vena coccígea, en tubos al vacío con EDTA, los días 8, 11, 14, 17, 20 y 23 postinseminación; posteriormente se centrifugaron a 3,000 xg por 20 min y el plasma fue conservado a -18 °C hasta las determinaciones hormonales, las cuales se realizaron mediante radioinmunoanálisis (RIA), con kit comercial (Diagnostics Products Corporation, DPC Coat-A-Count, USA). La sensibilidad y el coeficiente de variación intraensayo fueron de 0.02 ng/ml y 4.5 %, respectivamente.

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo a los  $43 \pm 3$  días postinseminación mediante palpación rectal.

used. A cow is considered as a repeat-breeder when after having shown normal estrous cycles and no genital lesions at rectal palpation, it is not pregnant after at least three inseminations<sup>(14,15)</sup>. Cows had body condition scores of  $3.07 \pm 0.04$  (1.0 to 5.0 scale; 1=emaciated; 5=obese), and  $1.94 \pm 0.17$  lactations. Cows received a total mixed ration (TMR) containing 17.5 % crude protein, 1.7 Mcal/kg net energy for lactation, and they were held in fan-shaped pens, with a conventional 500 m<sup>2</sup> shade, at a height of 4.5 m.

Cows were distributed at random among three treatment groups. Cows received 100 µg gonadorelin acetate (GonasyI, Syva) intramuscularly PAI. Treatment group 1 received this treatment on d 5 (T1, GnRH-5; n=33); treatment group 2 received the same treatment on d 11 (T2, GnRH-11; n=34), and treatment group 3 received no hormone therapy (T3, Control, n=34). The same skilled technician inseminated all cows.

Seventeen (17) cows were selected at random from each group, and blood samples were collected by puncturing the coxigeal vein using vacuum EDTA tubes on d 8, 11, 14, 17, 20, and 23 PAI. Samples were then centrifuged at 3,000 xg for 20 min, and plasma was preserved at -18 °C until hormone determinations were performed, using a commercially-available radio-immuno-assay (RIA) kit (Diagnostics Products Corporation, DPC Coat-A-Count, USA). Intra-assay sensitivity and coefficient of variation were 0.02 ng/ml and 4.5 %, respectively. Pregnancy diagnosis was carried out on d  $43 \pm 3$  PAI by rectal palpation.

Ambient temperature and relative humidity were recorded daily (14:00) on AI days, using a digital thermo-hygrometer (TAYLOR, model 1409). Temperature/Humidity Indexes (THIs) were calculated based on the combination of temperature and relative humidity, using the following equation:  $THI = (9/5 \text{ temperature } ^\circ\text{C} + 32) - (11/2 - 11/2 \times \text{relative humidity}) \times (9/5 \text{ temperature } ^\circ\text{C} - 26)$ <sup>(16)</sup>.

In order to evaluate plasma progesterone levels, a multivariate analysis with repeated measurements throughout the time was performed. The model

Cuadro 1. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm$  ee) de algunas variables en vacas repetidoras Holstein tratadas con GnRH postinseminación en condiciones de estrés calórico

Table 1. Least square means ( $\pm$  SE) of some variables in repeat-breeding Holstein cows treated with GnRH after insemination under heat stress conditions

	Treatments		
	GnRH-5 (n= 33)	GnRH-11 (n= 34)	Control (n= 34)
Rectal temperature, °C	38.60 $\pm$ 0.09	38.57 $\pm$ 0.09	38.58 $\pm$ 0.09
No. of inseminations	4.61 $\pm$ 0.24	4.85 $\pm$ 0.21	4.38 $\pm$ 0.22
No. de lactations	1.94 $\pm$ 0.21	2.12 $\pm$ 0.18	1.76 $\pm$ 0.13
Ambient temperature, °C	27.52 $\pm$ 0.46	28.22 $\pm$ 0.42	27.52 $\pm$ 0.47
Relative humidity, %	42.67 $\pm$ 1.24	41.5 $\pm$ 1.12	43.00 $\pm$ 1.18
ITH, units	73.74 $\pm$ 0.50	74.47 $\pm$ 0.45	73.79 $\pm$ 0.51

GnRH-5 was treated on d 5 post-insemination, GnRH-11 was treated on d 11 post-insemination.

Las temperaturas ambientales y humedades relativas, fueron registradas diariamente (1400) durante los días en que se realizó la IA, con un termo/higrómetro digital (TAYLOR, modelo 1409). Las unidades del Índice Temperatura Humedad (ITH) se calcularon mediante la combinación de temperatura y humedad relativa con la siguiente expresión:  $ITH = (9/5 \text{ temperatura } ^\circ\text{C} + 32) - (11/2 - 11/2 \times \text{humedad relativa}) \times (9/5 \text{ temperatura } ^\circ\text{C} - 26)$ <sup>(16)</sup>.

Para evaluar los niveles plasmáticos de progesterona se realizó un análisis multivariado para mediciones repetidas en el tiempo; en el modelo se incluyó el efecto del tratamiento, y como covariables el número de lactancia, los días en leche, el número de inseminaciones y el ITH del día de la IA (Cuadro 1). Debido a que no se cumplió el supuesto de que la estructura de covarianza de tener simetría compuesta, se utilizó la corrección Huynh-Feldt para el cálculo de los grados de libertad. Se evaluó el efecto de tratamientos y su interacción entre tratamientos y dentro de cada tratamiento. La tendencia en el tiempo de los niveles de P4 se realizó mediante contrastes polinomiales entre tratamientos y dentro de cada tratamiento. Las tasas de concepción se analizaron mediante regresión logística. Se realizó un análisis de varianza univariado en cada uno de los días de muestreo con el objeto de encontrar diferencias entre vacas no gestantes y gestantes. La comparación se hizo

included the effect of treatment. Covariables included lactation number, days in milk, number of inseminations, and THI on AI day (Table 1). Given non-compliance with the assumption that the covariance structure has composed symmetry, the Huynh-Feldt correction was used to calculate the degrees of freedom. The effect of treatment and its interaction within and between treatments were evaluated. The time trend of P4 levels was analyzed using polynomial contrasts between and within treatments. Conception rates were analyzed by logistic regression. A univariate analysis of variance was performed on each sampling day, in the search of differences between pregnant and non-pregnant cows. The comparison was performed to determine the precise times when differences between pregnant and non-pregnant cows appeared. All statistical analyses were performed using the SPSS package, version 13 for Windows<sup>(17)</sup>.

None of the covariables was significant ( $P > 0.05$ ) within or among treatments. Therefore, the final analysis included only the effect of GnRH on plasma progesterone concentrations. Figure 1 shows a quadratic effect, where treatment group peaks are observed at different times. Variance analysis within each sampling day showed that the highest P4 concentration peak occurred in T1 (GnRH-5,  $P < 0.05$ ). This treatment group showed an increase ( $3.05 \pm 0.30$  ng/ml) on d 8 PAI, 3 d after GnRH administration. It was later increased on d 11 (4.9

para determinar en qué momento se presentaron las diferencias entre gestantes y no gestantes. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 13 para Windows<sup>(17)</sup>.

Ninguna de las covariables fue significativa ( $P > 0.05$ ) dentro y entre tratamientos, por lo que el análisis final incluyó sólo efecto de la GnRH sobre la concentración plasmática de progesterona. En la Figura 1 se observa un efecto cuadrático, donde los máximos incrementos de cada grupo se observan en diferente tiempo. Los análisis de varianza dentro de cada día de muestreo indicaron que el mayor incremento en la concentración de P4 fue en el grupo GnRH-5 ( $P < 0.05$ ) donde se observó un incremento de  $3.05 \pm 0.30$  ng/ml en el día 8 posterior a la IA, es decir, 3 días después de la administración de la GnRH, luego aumentó el día 11 ( $4.9 \pm 0.44$  ng/ml), alcanzando su máximo valor en el día 14 ( $5.10 \pm 0.47$  ng/ml) y en el día 23 se observó una concentración similar a la del día 8. Para el grupo GnRH-11 y el control no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ). Con respecto a las tasas de concepción, en el grupo GnRH-5 (4/33) se obtuvo un 12.1 %, para el grupo GnRH-11 (4/34) registraron un 11.8 % y el grupo testigo (5/34) un 14.7 % ( $P > 0.05$ ). Los resultados del análisis de varianza univariado entre vacas gestantes y no gestantes, en cada uno de los días de muestreo sanguíneo, indicaron que las vacas gestantes presentaron concentraciones de P4 mayores ( $P < 0.05$ ) que las vacas no gestantes el día 20 y el día 23 postinseminación (Figura 2). El ITH promedio en el día de la IA, para todas las vacas, fue de  $73.71 \pm 0.49$  unidades, con un mínimo de 65.40 unidades y un máximo de 77.55 unidades (Figura 3). Una alta proporción de vacas (83/101; 82.2 %) se inseminaron con un ITH de  $\geq 72$  unidades, es decir, en condiciones de estrés calórico.

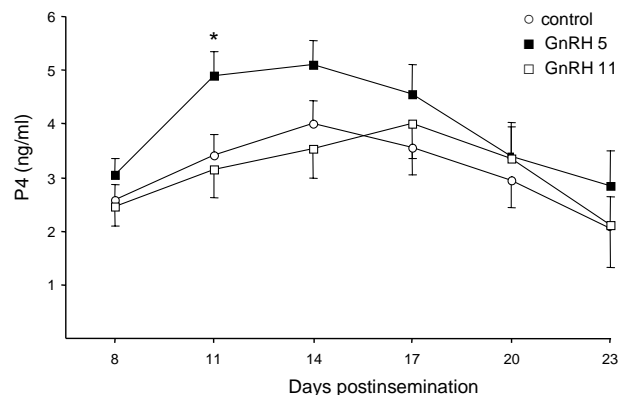
Los resultados indican que la aplicación del agonista de GnRH no incrementó las tasas de concepción. Con la administración de GnRH en el día 5 ó en el día 11 postinseminación no se incrementaron las tasas de concepción en vacas repetidoras Holstein en condiciones de estrés calórico<sup>(10,11,18)</sup>. En el grupo GnRH-5 se observó mayor concentración de progesterona en relación al grupo GnRH-11 y al

$\pm 0.44$  ng/ml) to then peak on d 14 ( $5.10 \pm 0.47$  ng/ml). On d 23, a concentration similar to that of d 8 was found. No difference ( $P > 0.05$ ) was observed in either T2 (GnRH-11) or T3 (Control). Regarding conception rates, T1 (GnRH-5, 4/33) had 12.1 %; T2 (GnRH-11, 4/34) had 11.8 %; and T3 (Control, 5/34) had 14.7 % ( $P > 0.05$ ). The univariate analysis of variance between pregnant and non-pregnant cows on each blood sampling day showed that pregnant cows had higher ( $P < 0.05$ ) P4 concentrations than non-pregnant cows on d 20 and 23 PAI (Figure 2). Average THI on AI day for all cows was  $73.71 \pm 0.49$  units (Min 65.40; max 77.55) (Figure 3). A high proportion of the cows (83/101; 82.2 %) was inseminated with a THI  $\geq 72$  units, which means heat stress.

Results show that administering the GnRH agonist did not result in increased conception rates. The administration of GnRH on d 5 or 11 PAI did not increase conception rates in repeat-breeding Holsteins, under heat stress conditions<sup>(10,11,18)</sup>. T1 (GnRH-5) showed higher progesterone concentrations than both T2 (GnRH-11) or Control, probably due to ovulation

Figura 1. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm$  ee) en la concentración de P4 en vacas repetidoras Holstein tratadas con GnRH postinseminación en condiciones de estrés calórico

Figure 1. Least square means ( $\pm$  SEM) of P4 concentrations in repeat-breeding Holstein cows treated with GnRH after insemination under heat stress conditions



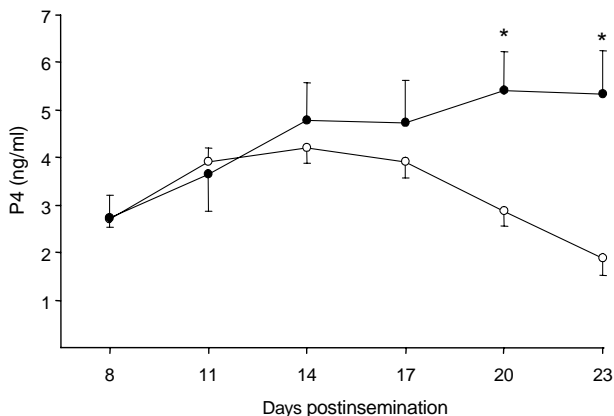
Only group T1 (GnRH-5) had increased P4 concentrations on d 11 post-insemination ( $P < 0.05$ ).

testigo, debido muy probablemente a que se indujo la ovulación, así como la luteinización, y fue diferente significativamente el día 11 postinseminación; estos resultados son consistentes con los encontrados por otros investigadores<sup>(10,11)</sup>. A pesar de la elevación de progesterona, no se incrementaron las tasas de concepción. Encontramos que con la aplicación de GnRH en el día 11 postinseminación la concentración de progesterona no fue significativa tal como lo reportan otros estudios<sup>(19)</sup> y de la misma manera, no aumentaron las tasas de concepción. En nuestro estudio planteamos como hipótesis que la aplicación de GnRH en los días 5 ó en el día 11, incrementa la concentración de progesterona mediante la inducción de la ovulación dando como resultado la formación de cuerpos lúteos, ya que el incremento en la concentración de progesterona en la sangre periférica en la etapa temprana (día 5)<sup>(11)</sup> o en la etapa tardía (días 11 a 15)<sup>(18)</sup> del diestro puede ayudar a la sobrevivencia embrionaria en los bovinos. Contrario a los resultados de nuestro estudio, en cuanto a las tasas de concepción, otros

induction and luteinization, and it was significantly different on d 11 PAI. These results are consistent with those reported by other investigators<sup>(10,11)</sup>. Despite progesterone elevations, conception rates were not increased. We found that with GnRH application on d 11 PAI, progesterone concentration was not significant as reported elsewhere<sup>(19)</sup> and, likewise, conception rates were not increased. The basic hypothesis of our study was that the application of GnRH on ds 5 or 11 PAI results in increased progesterone concentrations through ovulation induction, resulting in the formation of CLs, since increased progesterone concentrations in the peripheral blood at a diestrous early (d 5)<sup>(11)</sup> or late stage (d 11 to 15)<sup>(18)</sup> stage, can promote embryo survival in cattle. As far as conception rates are concerned, opposite to our results, other studies<sup>(12)</sup> have reported that the administration of GnRH both at AI time and 12 d later induced the formation of additional CLs in some cows (56/373; 15 %) which were pregnant. Furthermore, no embryo losses were detected in those animals.

Figura 2. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm$  ee) en la concentración de P4 en vacas repetidoras Holstein tratadas con GnRH en los días 5 y 11 postinseminación en condiciones de estrés calórico, gestantes (●) y no gestantes (○)

Figure 2. Least square means ( $\pm$  SEM) of P4 concentrations in repeat-breeding Holstein cows treated with GnRH on d 5 and 11 after insemination under heat stress conditions. Pregnant (●). Non pregnant (○)

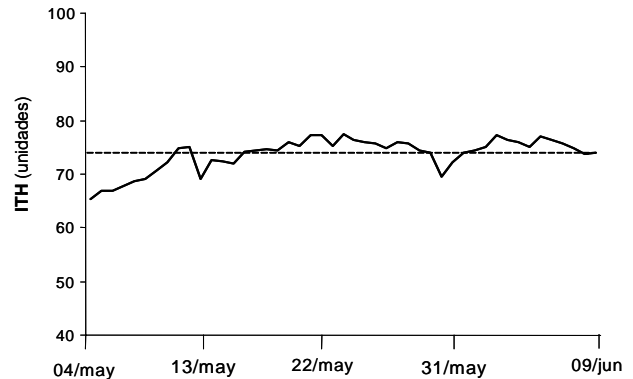


\* ( $P < 0.05$ ).

It has been documented that progesterone is responsible for the inhibition of maternal luteolytic

Figura 3. Unidades del índice temperatura humedad (THI) registrado diariamente (1400) durante la IA en las vacas repetidoras Holstein en condiciones de estrés calórico

Figure 3. Temperature/Humidity Index (THI) recorded daily (1400) during AI in repeat-breeding Holstein cows under heat stress conditions



The solid line represents the value, while the dotted line represents the mean THI.

estudios reportan<sup>(12)</sup> que la GnRH administrada al momento de la IA y 12 días después, indujo la formación de cuerpos lúteos adicionales en algunas vacas (56/373; 15 %) que quedaron gestantes, y además no detectaron muertes embrionarias en esos animales.

Está documentado que la progesterona es la responsable de la inhibición de los mecanismos luteolíticos maternos<sup>(20)</sup>, y se ha demostrado que un nivel bajo de progesterona en la fase lútea permite la liberación de PGF<sub>2</sub>α con efectos luteolíticos en el útero<sup>(21)</sup>. En nuestro estudio aunque se elevaron los niveles de P4 circulante, no se vieron aumentadas las tasas de concepción, resultados similares a otros reportes<sup>(10)</sup>. En otras investigaciones, con el mismo esquema de tratamiento<sup>(10-12)</sup>, existe variabilidad en los resultados, que probablemente se puedan explicar por las diferencias que hubo en los protocolos de investigación, en especial en el tiempo y el método de diagnóstico de gestación, a las distintas respuestas biológicas a la GnRH y al número de animales utilizados<sup>(19,22)</sup>. Es posible que en algunos de los estudios similares no se haya utilizado el número adecuado de animales que permitiera detectar diferencias significativas entre tratamientos, y tal vez esa misma situación se presentó en nuestro estudio, por lo que hubiera sido mejor haber podido disponer de un mayor tamaño de muestra; otro aspecto que pudo haber influido en los resultados encontrados, es que utilizamos vacas repetidoras (3 a 7 servicios), en condiciones de manejo sin enfriamiento corporal, es decir, sin ventiladores ni aerosoles, sólo con sombras convencionales, además las vacas no fueron sometidas a pre-sincronización ni de estro ni de ovulación como en otros estudios<sup>(10,11,18,19)</sup>.

Las bajas tasas de concepción, están en concordancia con otros estudios<sup>(13,23)</sup>, en donde encontraron tasas de concepción tan bajas como de 10 % cuando el ganado lechero se insemina en los meses de alta temperatura y humedad ambientales. Finalmente, con respecto a las condiciones ambientales durante los días en que realizó la IA a las vacas del experimento, el promedio del ITH fue de  $73.71 \pm 0.49$  unidades, esto significa que las vacas se

mechanisms<sup>(20)</sup>. In addition, low progesterone levels in the luteal phase have shown to permit the release of PGF<sub>2</sub>α with luteolytic effects on the uterus<sup>(21)</sup>. In our study, even though circulating P4 levels were high, conception rates were not increased, as reported elsewhere<sup>(10)</sup>. In other reports with the same treatment scheme<sup>(10-12)</sup>, variable results have been obtained, which can be probably explained by research protocol differences, particularly the time and method of gestation diagnosis, different biologic responses to GnRH, and the numbers of animals used<sup>(19,22)</sup>. Probably, some studies did not use enough animals to detect significant differences among treatments. This can also be valid for our study, so that perhaps we should have used a larger sample size. One additional factor potentially influencing our results was that we used repeat-breeding cows (3 to 7 services), with only shades but no other additional cooling devices (fans, sprayers). In addition, our cows were not subjected to pre-synchronization of either estrous or ovulation as they did in other studies<sup>(10,11,18,19)</sup>.

Our low conception rates are consistent with those found in other studies<sup>(13,23)</sup>, where conception rates as low as 10 % were found when dairy cows were inseminated during hot/humid months. Finally, regarding the environmental conditions during the days when the cows in our experiment were inseminated, average THI was  $73.71 \pm 0.49$ , which means that animals were experiencing heat stress<sup>(24)</sup>. Likewise, Willard *et al*<sup>(10)</sup> also reported high THI ( $73.0 \pm 0.5$  units) in GnRH-treated, lactating Holstein cows, which affected reproductive performance. Unquestionably, heat stress had marked effects on our cows, since the highest conception rate was 12.1 % for GnRH-treated cows.

We can conclude that even though GnRH application on d 5 resulted in elevated progesterone concentrations, conception rates of repeat-breeding Holstein cows were not increased under heat stress conditions. Repeat breeding is indeed a complex problem, and the effect of heat stress on dairy cattle is multi-factorial in nature. Therefore, a different research model is needed if other potential alternative solutions are to be found, considering

encontraban en estrés calórico<sup>(24)</sup>, a este respecto Willard *et al*<sup>(10)</sup> también reportaron un ITH de  $73.0 \pm 0.5$  en vacas Holstein lactantes tratadas con GnRH y que afectó su comportamiento reproductivo. El estrés calórico seguramente tuvo efectos marcados en las vacas del presente estudio, ya que la tasa de concepción más alta fue de 12.1 % para las vacas que recibieron el tratamiento de GnRH.

Se puede concluir que aunque con la aplicación de GnRH en el día 5, se elevaron las concentraciones de progesterona, no se incrementaron las tasas de concepción en vacas repetidoras Holstein en condiciones de estrés calórico. Aparentemente, el problema de la vaca repetidora es complejo, y el efecto del estrés calórico sobre la vaca lechera es multifactorial, por lo que se requiere de otro modelo de investigación para poder encontrar otras posibles alternativas de solución en las que se considere también, entre otras causas, el grado de metritis subclínica de las vacas del experimento.

## AGRADECIMIENTOS

A MC Susana Rojas Maya y MVZ Clara Murcia del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por las determinaciones hormonales. A Don Indalecio Tricio Gómez, por las facilidades otorgadas en la presente investigación. A los técnicos del establo Cantabria, por su apoyo durante el trabajo experimental.

## LITERATURA CITADA

1. Jordan ER. Effects of heat stress on reproduction. *J Dairy Sci* 2003;86 E104-E114.
2. Lopez-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 2003;60:89-99.
3. Rensis FD, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 2003;60:1139-1151.
4. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, *et al.* Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod* 1995;52:1106-1113.

also –among other causes– the level of sub-clinical metritis in the experimental cows.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Gratitude is expressed to Susana Rojas Maya, MSc, and Clara Murcia, DVM, Department of Reproduction, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ, UNAM), for hormone determinations. Thanks also to Mr. Indalecio Tricio Gómez, for his support during this research, and to the technicians in Cantabria Dairy, for their assistance during the experimental work.

*End of english version*

- 
5. Ullah G, Fuquay JW, Keawkhong T, Clark BL, Pogue DE, Murphey EJ. Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holsteins during heat stress. *J Dairy Sci* 1996;79:1950-1953.
  6. Alnimer M, De Rosa G, Grasso F, Napolitano F, Bordi A. Effect of climate on the response to three oestrous synchronisation techniques in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002;71:157-168.
  7. Hansen PJ, Arechiga CF. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J Anim Sci* 1999;77(Suppl 2):36-50.
  8. Inskeep EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004;82(E-Suppl):E24-39.
  9. Rettmer I, Stevenson JS, Corah LR. Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. *J Anim Sci* 1992;70:508-517.
  10. Willard S, Gandy S, Bowers S, Graves K, Elias A, Whisnant C. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 2003;59:1799-1810.
  11. Howard JM, Manzo R, Dalton JC, Frago F, Ahmadzadeh A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2006;95:224-233.
  12. Lopez-Gatius F, Santolaria P, Martino A, Deletang F, De Rensis F. The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. *Theriogenology* 2006;65:820-830.
  13. Szenci O, Takacs E, Sulon J, de Sousa NM, Beckers JF. Evaluation of GnRH treatment 12 days after AI in the

## EFFECTO DE LA GnRH POSTINSEMINACIÓN EN VACAS HOLSTEIN REPETIDORAS

- reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2006;66:1811-1815.
14. Guise MB, Gwazdauskas FC. Profiles of uterine protein in flushings and progesterone in plasma of normal and repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 1987;70:2635-2641.
  15. Stevenson JS, Call EP, Scoby RK, Phatak AP. Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 1990;73:1766-1772.
  16. Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J Dairy Sci* 2000;83:2120-2125.
  17. SPSS. User's Guide: statistics (Version 13.0) Point Richmond, CA, USA: SPSS Inc. 2004.
  18. Bartolome JA, Melendez P, Kelbert D, Swift K, McHale J, Hernandez J, *et al.* Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 2005;63:1026-1037.
  19. Franco M, Thompson PM, Brad AM, Hansen PJ. Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at Days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* 2006;66:945-954.
  20. Mann GE, Lamming GE. The Influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim* 1999;34:269-274.
  21. Mann GE, Lamming GE. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J Reprod Fertil* 1995;104:1-5.
  22. Peters AR, Martinez TA, Cook AJ. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2000;54:1317-1326.
  23. Ingraham RH, Gillette DD, Wagner WD. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in subtropical climate. *J Dairy Sci* 1974;57:476-481.
  24. Du Preez JH. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2000;67:263-271.

