



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD  
ANIMAL

**EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE 250mg DE SOMATOTROPINA  
BOVINA (bST) SIETE DÍAS ANTES DEL SERVICIO Y UNA  
SEGUNDA INYECCIÓN AL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN  
EN EL PORCENTAJE DE CONCEPCIÓN DE VACAS HOLSTEIN  
EN ESTRÉS CALÓRICO.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**ALONSO LÓPEZ GÓMEZ**

TUTOR PRINCIPAL: ANTONIO PORRAS ALMERAYA  
COMITÉ TUTORAL: JOEL HERNÁNDEZ CERÓN  
TERESA SÁNCHEZ TORRES.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

A mi madre Juana, por existir, hacérmelo saber y enseñarme que el límite es el cielo.

A mi hermano Nicolás, gracias por todo el apoyo incondicional durante mi vida.

A mi hermano Miguel, por acompañarme en la vida.

A mi hermana Antonia, una de las mujeres más importantes de mi vida.

Gracias a mi familia en general, por estar todo este tiempo conmigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado como profesionalista.

Al CONACYT, ya que sin la beca otorgada no hubiera conseguido este logro.

A mi comité tutorial Dr. Joel Hernández C. y Dra. María Teresa Sánchez T. por su apoyo durante la realización de la presente.

A mi jurado Dr. Alejandro Villa Godoy y Jaime Gallegos, por sus comentarios en el presente trabajo.

Al MVZ. Gustavo Lastra Durán, por su apoyo en la realización práctica de esta tesis.

Al MVZ. Pedro Ochoa G. por su invaluable apoyo en la realización de los análisis estadísticos en esta tesis.

Al MVZ. Alejandro Villa Godoy por su amistad e invaluable apoyo incondicional en el trayecto del posgrado.

A todos los integrantes académicos del DPA: Rumiantes, por su amistad y apoyo cuando más se les necesito, en especial al Dr. Abner J. Gutiérrez Sánchez, J. Ignacio Sánchez Gómez y Salvador Avila Téllez.

A mis amigos: Manuel, Víctor Hugo, Teresa, Daniela, Ramón, Fernando, Omar, Cecilia, Alfredo, Edgar y Gabino por estar conmigo.

A mis compañeros de generación Tóbele, Liliana y Armando, por hacer agradable estos dos años.

A todos los integrantes del Departamento de Reproducción Animal de la FMVZ-UNAM. Por hacer mi trayecto del posgrado sencillo.

A mis amigos de Torreón: Rogelio, Bebo, Tachin, Chino, Colacho, Lupe, Lazara, Clavo, Lupita, Tania, por hacerme parte de sus vidas y hacer agradable mi estancia.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.</b>	I
<b>ABSTRACT.</b>	III
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	1
I.I. Hipótesis	3
I.II. Objetivo	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.</b>	
Estrés	4
Tipos de estrés.	4
Estrés agudo.	5
Estrés crónico.	5
2.1.2    Métodos para medir el estrés.	
2.1.2.1    Detección de cortisol en sangre.	6
2.1.2.2    Detección de metabolitos de cortisol en leche	6
2.1.2.3    Detección de metabolitos de cortisol en heces	6
2.1.3    Mecanismos de respuesta al estrés	7
2.1.4    Influencia del estrés en la producción	7
2.1.5    Influencia del estrés en la reproducción	8
2.2    Estrés Calórico (EC)	9
2.2.1    ¿Como afecta el estrés calórico en la producción?	9
2.2.2    ¿Como afecta el estrés calórico en la reproducción?	10
2.2.2.1    Conducta estral	10
2.2.2.2    Útero	10
2.2.2.3    Dinámica Folicular	11
2.2.2.4    Capacidad esteroidogenica	11
2.2.2.5    Cuerpo Lúteo	12
2.2.2.6    Gonadotropinas	13

2.2.2.7	Efecto residual	13
2.2.2.8	Alteraciones estructurales del embrión	14
2.2.2.9	Desarrollo embrionario temprano	15
2.2.3	Respuesta fisiológica del bovino al EC	16
2.2.4	Tratamientos para reducir los efectos del EC	17
2.2.4.1	Modificación ambiental de la vaca	17
2.2.4.2	Detección de calores	17
2.2.4.3	Suplementación de antioxidantes	18
2.2.4.4	Control farmacológico	18
2.2.4.5	Transferencia de embriones	18
2.3	Hormona del Crecimiento (GH)	19
2.3.1	Somatotropina recombinante bovina (bST)	20
2.3.2	bST en el desarrollo folicular	20
2.3.3	bST en el Cuerpo Lúteo	21
2.3.4	bST en el desarrollo embrionario temprano	21
2.3.5	Factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I)	22
2.3.6	IGF-I en el desarrollo folicular	23
2.3.7	IGF-I en el Cuerpo Lúteo	25
2.3.8	IGF-I en el desarrollo embrionario temprano	26
2.3.9	Proteínas ligadoras de los IGF's (IGFBPs)	28
2.3.10	bST en la fertilidad	30
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

López Gómez Alonso. **Efecto de la inyección de 250 mg de Somatotropina bovina (bST) siete días antes del servicio y una segunda inyección al momento de la inseminación en el porcentaje de concepción de vacas Holstein en estrés calórico.** (bajo la dirección del Dr. Antonio Porras Almeraya, Joel Hernández Cerón y María T. Sánchez).

Una de las principales causas de infertilidad en las zonas áridas es la alta temperatura, que tiene efecto en el aparato reproductivo de la hembra como en el desarrollo embrionario temprano. El objetivo del presente estudio fue probar si la aplicación de una inyección de 250 mg de Somatotropina bovina (bST) siete días antes y una segunda inyección al momento de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas de primer servicio en estrés calórico. Los dos experimentos se realizaron en un hato localizado en Torreón, México. El experimento 1 denominado estrés calórico agudo (ECA) se realizó durante los meses de junio a agosto con un índice de temperatura-humedad (ITH) medio de 75.9, se utilizaron 119 vacas que recibieron dos inyecciones de bST (Boostin®-S, Schering-Plough División Veterinaria®, México) de liberación prolongada por vía subcutánea y 66 vacas que recibieron solución salina fisiológica como placebo. El experimento 2 se realizó en meses posteriores a la exposición al estrés calórico (ECR) durante los meses de septiembre a noviembre con un ITH medio de 68.6, en éste se utilizaron 126 vacas que recibieron dos inyecciones de bST y 136 vacas que recibieron placebo. Los porcentajes de vacas inseminadas y de concepción se compararon mediante un análisis de regresión logística para variables binarias. En el primer experimento, no se observó efecto ( $P > 0.05$ ) de la temperatura rectal, días posparto, producción de leche al momento de la inseminación artificial, número de partos, tipo de puerperio y condición corporal en el porcentaje de concepción, sin embargo en el experimento posterior a la exposición del estrés calórico se vio que la condición corporal tuvo efecto sobre el porcentaje de concepción ( $P < 0.05$ ). El porcentaje de vacas inseminadas fue similar ( $P > 0.05$ ) entre los grupos testigo y tratado con bST tanto en el experimento ECA como en el de ECR. El intervalo de confianza del porcentaje de concepción del experimento ECA es de 34.93% a 59.01% y en el ECR de 18.7% a 43.12% con una confianza del 95%. La producción de leche fue similar ( $P > 0.05$ ) entre las vacas tratadas con bST y las del grupo testigo. Por lo que respecta al porcentaje de concepción, éste fue mayor ( $P < 0.05$ ) en las vacas del grupo testigo que en el grupo bST tanto en el experimento ECA como en el de ECR. Además no se encontró efecto ( $P > 0.05$ ) de la bST sobre la condición corporal. Los resultados demuestran que el tratamiento con dos aplicaciones de 250 mg de bST con siete días de diferencia disminuye el porcentaje de concepción de vacas a primer servicio bajo condiciones de estrés calórico. Por otra parte el conjunto de técnicas

y tecnologías tales como el crayoneo, detección de calores por personal calificado y podómetro evitan el efecto negativo de la bST en la expresión del estro.

Palabras clave: Estrés calórico, Somatotropina, Desarrollo embrionario temprano.

## **ABSTRACT**

**López Gómez Alonso. Effect of the injection of 250 mg of Somatotropin bovine (bST) seven days before of and on insemination day on the conception rate of Holstein cows under heat stress.** (under direction of Dr. Antonio Porras Almeraya, Joel Hernández Cerón y María T. Sánchez).

One the mayor infertility causes on arid zones is high temperature, that has an effect on reproductive system in cow also in early embryonic development. The study's objective was to test if 250mg doses seven days before and on isemination day increase the conception rate in first service cows under heat stress. The two experiments were made in a herd in Torreon, Mexico. The first experiment called acute heat stress (AHS), was made from June to August with a ITH mean of 75.9, 119 cows were that received the two bST long liberation subcutaneous injections and 66 cows with a physiologic saline solution as a placebo. The second experiment denominated delayed heat stress (DHS) was carried from September to November with a ITH mean of 68.6, in this 126 received two bST injections and 136 the placebo. In the AHS experiment there was significant difference ( $P < 0.05$ ) in conception rate, in inseminated rate there was not significant difference ( $P > 0.05$ ; 46.96 and 53.80% respectively). Respect to the DHS experiment there was significant difference ( $P < 0.05$ ) in conception rate (30.91 versus 9.83% respectively), however there was not significant difference ( $P > 0.05$ ) between inseminated cows (48.41 and 40.44% respectively). The results show that treatment with 250mg bST injections with seven days in time decrease the conception rate in first service cows under heat stress. Moreover, the group of techniques and tecnologies such as tail painting, estrus detection by qualified personnel and pedometer, avoid the negative impact of bST in the expression of estrus behavior.

**Key words: Heat stress, somatotropin, early development embryo.**

## **I. INTRODUCCIÓN.**

En las regiones cálidas, una causa importante de infertilidad en bovinos es la provocada por el estrés calórico (Hansen y Aréchiga, 1999; Aréchiga, 2005). El ganado bovino de la raza Holstein es altamente susceptible a las altas temperaturas, así durante los meses calurosos del verano el consumo de alimento y la producción de leche disminuyen, llegando a disminuir el consumo de alimento hasta un 40% del total consumido (Cavestany *et al.*, 1985; Mellado, 1995; West, 2003). Por otra parte la fertilidad en los meses calurosos llega a ser de 10 a 20% (Lozano *et al.*, 2005; Jousan *et al.*, 2007). El mecanismo mediante el cual el estrés calórico afecta la reproducción es diverso, la temperatura elevada disminuye la expresión del estro (Roman-Ponce *et al.*, 1978), retrasa la selección del folículo alargando la onda folicular, disminuye la calidad del ovocito, altera la esteroidogénesis en el folículo y afecta negativamente el desarrollo embrionario temprano (Jousan y Hansen, 2004; Putney *et al.*, 1988; Roth *et al.*, 2001 a, b; Howell *et al.*, 1994; Wolfenson *et al.*, 1995).

También se ha observado un efecto residual en los ovocitos cuando las vacas fueron expuestas a estrés calórico. Así, la exposición de los folículos en diferentes etapas de desarrollo a altas temperaturas durante el verano, tiene un efecto en la calidad de los ovocitos en el otoño (Roth *et al.*, 2001a), por lo tanto aunque las vacas ya no están expuestas a temperaturas tan severas como en verano la fertilidad permanece más baja en comparación con las vacas no expuestas (Hansen, 1997).

Se han tratado de disminuir los efectos del estrés calórico en la fertilidad mediante la modificación del ambiente, de tal manera que la vaca se encuentre en su zona de confort la mayor parte del día, para ello se han recurrido a dos alternativas como la intercepción de la radiación solar mediante el empleo de sombreaderos y el enfriamiento del animal a través de ventiladores, aspersores y el conjunto de éstos (Mellado, 1995; Hansen y Aréchiga, 1999), de igual forma, se ha empleado la suplementación de antioxidantes (Aréchiga *et al.*, 1998) y la adición de extracto

del cultivo del hongo *Aspergillus oryzae* a la ración (Huber *et al.*, citado por Aréchiga, 2005) para disminuir la temperatura corporal de la vaca. También se han utilizado algunas estrategias hormonales tales como la hormona folículo estimulante (FSH; Roth *et al.*, 2002), no obstante, la fertilidad continua siendo menor a la obtenida en los meses de invierno (De Rensis y Scaramuzzi, 2003).

La administración subcutánea de somatotropina bovina recombinante (bST) provoca un incremento en las concentraciones séricas del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I). La hormona del crecimiento (GH) y el IGF-I favorecen el desarrollo embrionario temprano (Palma *et al.*, 1997; Rieger *et al.* 1998; Moreira *et al.*, 2001). En condiciones *in vitro*, la adición de IGF-I al medio favorece la maduración del ovocito, la tasa de división y la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocistos (Lucy, 2000; Jousan y Hansen, 2004). De la misma forma la adición de 100 ng/ml de IGF-I al medio de cultivo de embriones expuestos a shock calórico de 41°C durante 9 horas redujo el porcentaje de apoptosis, incrementando el número de células totales (Jousan y Hansen, 2004).

En vacas repetidoras, la administración de 500 mg de bST al momento de la inseminación tiene un efecto favorable en el porcentaje de concepción (Morales-Roura *et al.*, 2001; Mendoza, 2000). Asimismo, en estudios con vacas bajo protocolos de sincronización de la ovulación e inseminadas a tiempo fijo (IATF), la administración de bST cada 14 días a partir de la sincronización de la ovulación o a partir del día del estro, incrementa el porcentaje de concepción (Moreira *et al.*, 2000; Moreira *et al.* 2002<sup>a</sup>).

La administración de bST para mejorar la fertilidad podría ser una estrategia práctica en condiciones de estrés calórico, sin embargo, puede tener un efecto negativo, ya que puede agudizar los efectos del estrés calórico. Así, un tratamiento con 500 mg de bST alrededor del día 60 puede tener un efecto negativo, ya que tiene un efecto rápido en la producción de leche, el cual se acompaña de un incremento lento en el consumo de materia seca (Kirby *et al.*, 1997; Bilby *et al.*, 1999); de esta forma la vaca puede caer en un balance

energético negativo mayor, lo cual agudizaría los efectos del estrés calórico. En los experimentos realizados con bST se ha utilizado la dosis recomendada para provocar un incremento en la producción láctea. Dado que el tratamiento con fines reproductivos no busca un incremento en la producción de leche, cabe la posibilidad de utilizar dosis menores; así, se ha visto que dosis de 200 mg incrementan los niveles de IGF-I de manera similar a la dosis para el aumento de la producción láctea (500 mg) sin que repercuta en la condición corporal (Bilby *et al.*, 1999). Asimismo, la inyección de 250 mg de bST ocasiona un incremento de IGF-I durante los siguientes 10 días (García *et al.*, 2006).

Dado que el estrés calórico afecta principalmente la competencia del ovocito, es decir la capacidad de éste para desarrollar un embrión viable, y el desarrollo embrionario temprano, en éste estudio se propuso que la administración de una inyección de 250 mg durante la maduración final del ovocito y una segunda administración durante el desarrollo embrionario temprano aumentaría la proporción de vacas gestantes. El estudio se realizó en dos épocas del año: la primera durante el estrés calórico (verano: junio a agosto) y la segunda en los meses siguientes al estrés calórico (otoño: septiembre a noviembre).

I.I **HIPOTESIS.** Una inyección de 250 mg de bST siete días antes del servicio y una segunda inyección de 250 mg de bST al momento de la inseminación, resulta en un mejoramiento del porcentaje de concepción en vacas Holstein en estrés calórico.

I.II **OBJETIVO.** Determinar el efecto de la inyección de 250 mg de bST siete días antes del servicio y una segunda inyección de 250 mg de bST al momento de la inseminación en el porcentaje de concepción de vacas Holstein en estrés calórico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ESTRÉS

El término estrés es utilizado para designar un estímulo de tensión producido por ciertos factores, que en ciertos casos pueden determinar un desequilibrio orgánico en la fisiología de un ser vivo, pero el cuál no siempre se manifiesta con una patología precisa determinada (Espineta, 1987), o bien se puede definir como una compleja multitud de factores ambientales que al incidir sobre los animales influyen de manera directa o indirecta sobre su bienestar y necesidades físicas y psicológicas aumentando sus necesidades o disminuyendo su rendimiento (Young, 1993). Por otra parte, se usa la definición de estrés para identificar a los animales que están sometidos a los cambios ambientales y que no pueden expresar todo su potencial genético, previniendo así que logren su éxito reproductivo normal (Moberg, 1991; Dobson y Smith, 2000; Dobson *et al.*, 2001). Aunque no existe una definición precisa, generalmente el estrés se refiere a una variedad de respuestas frente a estímulos (estresores) internos o externos que modifican la homeostasis de un individuo (Brousseau *et al.*, 2005). Por consiguiente se estima que un animal está sujeto a estrés en un sentido general, cuando éste se ve obligado a realizar ajustes anormales o extremos en su fisiología o comportamiento, con el fin de favorecer el mantenimiento de la normalidad del fenotipo, de la raza o de la especie, para poder enfrentar los aspectos antihomeostáticos procedentes del medio ambiente (Espineta, 1987).

#### 2.1.1 Tipos de estrés

Los problemas relacionados con el estrés en los sistemas de producción suelen presentarse de manera subclínica que pueden no detectarse con facilidad o aparecer durante periodos limitados del año y asociados con unas condiciones climáticas no usuales, con variaciones estacionales o cuando los animales son particularmente susceptibles, como sucede con los recién nacidos (Young, 1993).

El estrés se clasifica de acuerdo con el tiempo de presentación del agente estresor.

2.1.1.1. Estrés agudo: El agente estresor tiene una presentación rápida, durante la presentación de este hay liberación de glucocorticoides que mejoran la aptitud del animal mediante la movilización de energía y puede cambiar la conducta (Espinete, 1987; Korte, 1993), además de una rápida descarga de adrenalina, porque en esos momentos se requiere de una inmediata conversión del glucógeno en glucosa, para una rápida provisión de energía (Espinete, 1987). El estrés es un factor capaz de modificar el control por retroalimentación negativa de los glucocorticoides, que puede resultar debido a hechos físicos o psicológicos que son nocivos para el individuo. Los efectos del estrés están mediados por todo el sistema nervioso central, en una forma similar a los factores que influyen los ritmos circadianos en la secreción de glucocorticoides. La respuesta de los glucocorticoides al estrés es inmediata y se observa que las concentraciones de cortisol aumentan con rapidez para llegar a valores varias veces arriba de lo normal en unos cuantos minutos. La respuesta glucocorticoide es proporcional a la gravedad del estrés, esto es, los niveles más bajos de estrés dan lugar a una menor producción de cortisol comparado con los niveles altos de estrés (Cunningham, 1999). Por lo que respecta al estrés agudo en la reproducción, la administración crónica de hormona adrenocorticotropica (ACTH) tuvo efectos similares a los de los estresores agudos. Los patrones púlsatiles de LH fueron interrumpidos, la secreción de estradiol fue menor a la normal, la oleada de LH fue retardada y en el caso de que ocurra la ovulación es retrasada (Dobson *et al.*, 2000).

2.1.1.2. Estrés crónico. Tradicionalmente, se considera que el estrés crónico induce efectos depresores sobre diversas funciones orgánicas, ya que se induce una disminución constante de las defensas humorales y celulares (Griffin, 1989). Tales efectos se atribuyen a la presencia de corticosteroides que aparentemente afectan al sistema inmunitario y predisponen a enfermedades, o al

menos producen un bajo rendimiento productivo (Caballero y Sumano, 1994). Si la exposición es prolongada al agente estresor (altas concentraciones de cortisol), puede haber disminución de la aptitud del individuo por inmunosupresión y atrofia de tejidos (Munck, 1984). Además se ha observado que los procesos reproductivos disminuyen (Dobson y Tebble, 2001).

## 2.1.2 Métodos o pruebas para medir el estrés

2.1.2.1. Detección de cortisol en sangre. Es ampliamente usada, pero se debe de tener cuidado ya que la misma obtención de la muestra puede ser por si misma estresante y se pueden confundir los resultados (Möstl y Palme, 2002), ya que la activación del eje hipotálamo/hipófisis/corteza adrenal (HHA) y la liberación de cortisol son comunes a una gran variedad de estímulos, incluyendo la captura y manejo de los animales. Las muestras seriadas presentan el efecto acumulativo del estrés causado por el manejo (Brousset *et al.*, 2005).

2.1.2.2. Detección de metabolitos de cortisol en leche. Varios autores están investigando sobre procedimientos de muestreos no invasivos como la determinación de corticoides en leche. Sin embargo la principal desventaja de este método es que solo se puede hacer en animales lactantes (Möstl y Palme, 2002).

2.1.2.3. Determinación de metabolitos de cortisol en heces. En rumiantes se han demostrado que al menos 21 metabolitos del cortisol pueden ser detectados en muestras fecales usando una Cromatografía de líquidos de alto funcionamiento (HPLC). Sin embargo la ruta del metabolismo y la participación de enzimas bacterianas aun es desconocido (Möstl y Palme, 2002). Este método de medición de los metabolitos de cortisol fecales ofrece la ventaja de una técnica de muestreo simple que no interfiere con los resultados del estudio e incluso puede utilizarse a largo plazo en los estudios longitudinales (Möstl y Palme, 2002).

### 2.1.3 Mecanismos de respuesta al estrés

Más que la intensidad, la duración del estímulo (estresor), es lo que parece diferenciar su impacto, ya que si el estímulo es prolongado, generalmente se considera negativo, y cuando es breve y no se repite, se considera positivo (Breazile, 1987; Wingfield y Ramenofsky, 1999).

Cuando un estímulo actúa sobre los sentidos del animal, el sistema nervioso periférico aferente lo recibe y lo lleva a las áreas sensitivas del sistema nervioso central. Ante este estímulo, el animal organiza una respuesta que va enfocada a disminuir su impacto, a través del sistema nervioso autónomo (SNA) y actividad neuroendocrina. La estimulación de la parte simpática del SNA provoca la secreción de catecolaminas a partir de la medula adrenal. La actividad neuroendocrina activa la respuesta del eje HHA, que empieza con la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) por el hipotálamo. Ésta, a su vez, estimula a la hipófisis anterior para secretar ACTH, que induce la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal (Moberg, 1987). Estos esteroides afectan el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, además de otros efectos. Una vez que el organismo ha respondido al estímulo, se activa una respuesta de retroalimentación negativa, que consiste en que los niveles sanguíneos de cortisol provocan que deje de secretarse ACTH de hipófisis y CRH de hipotálamo, lo que, a su vez, produce que dejen de secretarse catecolaminas (Friend, 1991; Cunningham, 1999).

Como un mecanismo fisiológico el estrés *per se* no es esencialmente malo (Breazile, 1987; Moberg, 2000).

### 2.1.4 Influencia del estrés en la producción

El estrés agudo durante el ordeño puede reducir de manera substancial la producción de leche a través de la inhibición central de la secreción de oxitocina (Bruckmaier *et al.*, 1993, 1997; Bruckmaier y Blum 1998) y de las acciones periféricas de las catecolaminas (Lefcourt y Akers, 1984).

### 2.1.5 Influencia del estrés en la reproducción

La mayoría de las investigaciones están centradas en los mecanismos básicos de interacción estrés-reproducción agudos porque pueden reconocerse y controlarse fácilmente (Dobson y Tebble, 2001). De manera general el estrés induce una estimulación adrenal retardada de la oleada de GnRH-LH o incluso la inhibe (Moberg, 1991; Dobson *et al.*, 2003), afectando también la síntesis de esteroides gonadales (Moberg, 1991). Mucha de la relación entre los sistemas de control de estrés y reproducción involucran neurotransmisores. Estos componentes llevan mensajes entre neuronas y son cruciales para el correcto control de la secreción hipotalámica de GnRH en las diferentes fases reproductivas. En animales normales, la activación del pico preovulatorio de GnRH-LH involucra una señal inicial estimuladora de estradiol pero la modulación restrictiva está mediada por la regulación de adrenalina y opioides o supresión de neuronas de ácido gama amino butírico (GABA) (Dobson *et al.*, 2003).

Dependiendo de la intensidad, el estrés impide las fases de activación o transmisión, o ambas, por la estimulación de la actividad del núcleo paraventricular sensible al estradiol que interfiere con el reclutamiento de neuronas y disminuyendo la pulsatilidad de GnRH y la secreción del pico de LH es interrumpida. Varias situaciones reproductivas involucran la supresión de la pulsatilidad de la GnRH-LH por aumento a la sensibilidad a estradiol en diferentes partes del hipotálamo y cerebro por ejemplo la estacionalidad y la desnutrición (Dobson *et al.*, 2003), probablemente por medio de las neuronas de opioides que se proyectan en las células neurosecretorias de GnRH (Moberg, 1991).

Existen trabajos en mono *Rhesus* que indican que el tratamiento directo con glucocortioides previenen la secreción de GnRH sin disminuir la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Dubey y Plant, 1985), además se ha visto la influencia de los estresores *in vivo* e *in vitro* en la hipófisis por medio de la secreción reducida de LH en respuesta a la GnRH (Phogat *et al.*, 1999)

Por otra parte los glucocorticoides interfieren con la hidrólisis y producción de fosfolípidos bloqueando la actividad enzimática de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, una enzima necesaria para la liberación de aminoácidos. Otro mecanismo por el que los glucocorticoides pueden alterar la función de las gonadotropinas, es mediante la modificación de la retroalimentación de los esteroides gonadales hacia los gonadotropos (Moberg, 1991).

Además en vacas la administración de ACTH bloquea la liberación preovulatoria de LH, disminuyendo también la concentración basal de LH circulante, pero la infusión de cortisol solo bloqueó la secreción preovulatoria de LH, no teniendo efecto en los niveles basales de LH (Moberg, 1991).

Existen trabajos en donde los opioides están implicados en la modificación en la secreción de LH (Dobson y Smith, 2000).

## 2.2 ESTRÉS CALÓRICO (EC)

El término de estrés calórico se puede referir a el clima, los efectos climáticos en la vaca y las respuestas productivas o fisiológicas hechas por la vaca (West, 2003), o bien a un desplazamiento interno del estado basal causado por estrés externo, en este caso, la temperatura (Finch, 1986), y ocurre cuando una combinación de condiciones ambientales tales como la temperatura del aire, humedad relativa, movimiento del aire y radiación solar causan la temperatura ambiental efectiva y es superior que la zona de confort del animal (Bianca, 1962, citado por Silanikove, 2000). La máxima temperatura y la humedad relativa mínima son las variables mas criticas para cuantificar el estrés calórico, éstas variables son combinadas en lo que se denomina índice de temperatura humedad (ITH) (Ravagnolo *et al.*, 2000).

### 2.2.1 ¿Como afecta el estrés calórico en la producción?

La temperatura ambiental ideal para las vacas lecheras es de -5°C a 24°C, independientemente de la edad del animal o del periodo de lactancia de la vaca

(Sharma *et al.*, 1988), además el máximo porcentaje de grasa (3.5%) es alcanzado en temperaturas máximas por debajo de 30.8°C (Sharma, 1988). Los efectos del estrés calórico al final de la gestación en particular la disminución de la tiroxina, afecta el desarrollo del parénquima mamario, la lactogénesis y la producción de leche (Collier *et al.*, 1982; Wolfenson *et al.*, 1988). Por otra parte el EC provoca un enfriamiento del centro rostral del hipotálamo estimulando así el centro medio de saciedad, el cuál inhibe al centro lateral del apetito resultando en una disminución en el consumo de materia seca (Armstrong, 1994). Cuando en el ambiente se superan los 26°C o cuando la temperatura rectal rebasa los 39°C por mas de 16 horas, tanto el consumo de alimento como la producción de leche comienzan a disminuir (Sharma *et al.*, 1988; Mellado, 1995; West, 2003). Con temperaturas de 41°C, el consumo de alimento solo es del 60% en relación al consumo observado cuando no hay EC (Mellado, 1995). Cabe señalar que la influencia del EC es mas pronunciada en la etapa temprana y media de la lactación (Sharma *et al.*, 1988).

### 2.2.2 ¿Como afecta el estrés calórico en la reproducción?

El mecanismo por el cuál el EC afecta la reproducción es de manera diversa entre las cuáles se han descrito:

2.2.2.1. Conducta Estral. El EC disminuye la intensidad y duración del estro, y aumenta la incidencia de anestros y ovulaciones silenciosas (Gwazdauskas *et al.*, 1981; Her *et al.*, 1988). El mecanismo puede ser en parte hormonal, ya que se ha reportado que el EC disminuye las concentraciones plasmáticas de estradiol17 $\beta$  (Hansen *et al.*, 1997). Es probable también que la expresión del estro se vea reducida por la letargia experimentada por la vaca sometida a EC (Hansen *et al.*, 1997).

2.2.2.2. Útero. El EC reduce el flujo de sangre uterino (Roman-Ponce *et al.*, 1978), tales efectos repercuten en la reducción de la afluencia de nutrientes y

hormonas al útero (Hansen, 1997), afectando así de manera directa la actividad metabólica de los embriones estresados (Putney *et al.*, 1988). *In vitro* el EC resultó en un marcado incremento en la liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte de tejido endometrial dentro del medio de cultivo, que puede comprometer la función del cuerpo lúteo (CL) e iniciar una regresión lútea prematura. Debido posiblemente a las alteraciones en las membranas celulares resultando en una aumentada movilización de substratos para la biosíntesis de prostaglandinas (Putney *et al.*, 1988), también se vio aumentado el contenido de proteínas y calcio en el cuerno ipsilateral que contuvo al embrión (Geisert *et al.*, 1988). Otra posibilidad es que el EC altera la actividad de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas endometrial endógeno intracelular (EPSI) (Putney *et al.*, 1989).

2.2.2.3. Dinámica Folicular. El EC reduce la dominancia del folículo dominante, lo cual permite el crecimiento de folículos adicionales (Wilson *et al.*, 1998; Wolfenson *et al.*, 2000), ya que la exposición al EC durante todo el ciclo estral de vacas lactantes indujo un aumento de folículos grandes (>10mm) durante la primera oleada folicular (Wolfenson *et al.*, 1995). También se ha visto una disminución en el número de folículos medianos durante el periodo de dominancia de la primera oleada folicular (Badinga *et al.*, 1993). La disminución en la dominancia también se encontró asociada con la regresión prematura del folículo dominante de la primera oleada folicular y el surgimiento temprano de 2-3 días antes del folículo dominante de la segunda oleada y/o folículo preovulatorio (Wolfenson *et al.*, 1995), siendo esto de gran relevancia debido a que el surgimiento temprano del folículo preovulatorio puede resultar en la ovulación de folículos viejos (Wolfenson *et al.*, 2000; Jordán, 2003).

2.2.2.4. Capacidad esteroideogénica. Estudios han mostrado que cuando las vacas y vaquillas se han sometido al estrés calórico durante la segunda mitad del ciclo estral (Wilson *et al.*, 1998) o durante el ciclo completo (Roth *et al.*, 2001) tuvieron reducidas las concentraciones de estradiol en el pico preovulatorio. La

disminución en la capacidad esteroidogénica de los folículos bajo EC involucra una menor actividad de aromatización en las células de la granulosa y una menor concentración de estradiol en el líquido folicular de los folículos dominantes en el día 8 del ciclo estral, comparando el verano tardío con el verano temprano, repercutiendo en las concentraciones plasmáticas (Badinga *et al.*, 1993), esta disminución se debe en primer lugar a una disminución súbita de la producción de androstenediona por parte de las células de la teca durante el verano, además el porcentaje de células de la granulosa viables en folículos colectados en verano se redujo a un 60% del valor en invierno, contribuyendo *in vivo* a la reducción en la secreción de estradiol a la circulación (Wolfenson y Meidan, datos no publicados). Por otra parte bajo condiciones de EC *in vitro*, la secreción de androstenediona y estradiol generalmente se redujo, empero la secreción de progesterona aumentó (Bridges *et al.*, 2005). La razón por la cuál las células de la teca son susceptibles al EC no es clara, pero se puede relacionar al hecho de que estas se diferencian antes que las células de la granulosa (Wolfenson *et al.*, 2000).

2.2.2.5. Cuerpo Lúteo. Un cuerpo lúteo (CL) funcional es requerido para el mantenimiento de la gestación (Howell *et al.*, 1994), sin embargo estudios previos a través de la medición de progesterona en sangre, han mostrado que las vacas sometidas a condiciones de EC la función del CL se elevó o no se afectó (Wise *et al.*, 1988a; Wilson *et al.*, 1998), o disminuyó (Wise *et al.*, 1988b; Wolfenson *et al.*, 1988). En general el aumento se dio cuando la exposición al EC fue abrupta, pero disminuyó cuando las vacas se adaptaron a las condiciones (Howell *et al.*, 1994). Sin embargo en estudios posteriores se ha sugerido que las concentraciones plasmáticas de progesterona disminuyen en vacas bajo condiciones de EC crónico, distintivo del ambiente natural de verano, y aumenta en vacas sujetas a un EC más agudo tal como la exposición a la radiación solar directa o exposición a cámaras climáticas, sin embargo la disminución en la secreción de progesterona no estuvo relacionada con la alteración en la longitud de la fase lútea o el tamaño del CL, proponiendo que la hipertermia altera la función de las células del CL

(Howell *et al.*, 1994). Por otra parte estudios *in vitro* muestran evidencia de la supresión directa del EC en la producción de progesterona, ya que las células lúteas obtenidas de vacas en verano produjeron menos progesterona durante 2 horas de incubación a 38°C, y la viabilidad celular fue menor que en las células obtenidas de vacas en invierno, de la misma manera las células obtenidas en invierno e incubadas a 40°C produjeron 30% menos progesterona que células similares incubadas a 38°C (Wolfenson *et al.*, 1993), de manera que una inadecuada secreción de progesterona puede tener efectos adversos antes y después de la inseminación.

Las bajas concentraciones plasmáticas de progesterona pueden causar un desarrollo folicular aberrante, que conlleva a una maduración anormal del ovocito en el folículo ovulatorio y una muerte embrionaria temprana (Ahmad *et al.*, 1995). Además de que las bajas concentraciones plasmáticas de progesterona afectan la esteroidogénesis en el folículo dominante y en la subsecuente formación del CL, alterando también la morfología y función endometrial en el subsecuente ciclo estral (Shaham-Albalancy *et al.*, 1996).

2.2.2.6. Gonadotropinas. Los efectos del EC en la secreción de gonadotropinas en bovinos está escasamente documentado a pesar de la importancia de la LH y FSH en la regulación del crecimiento folicular, ovulación y función del CL (Wolfenson *et al.*, 2000). El EC crónico durante el verano disminuyó la concentración media y amplitud de la LH tónica así como la oleada preovulatoria de LH inducida por GnRH en vacas con bajas concentraciones plasmáticas de estradiol (Wolfenson *et al.*, 2000). De manera similar se observó que en vacas alojadas en cámaras climáticas expuestas a EC por 16 horas durante el invierno la FSH inducida por GnRH disminuyó (Gilad *et al.*, 1993).

2.2.2.7. Efecto Residual. La fertilidad durante los meses de otoño en las vacas lecheras permanece más baja que en invierno aunque los animales ya no se encuentren en temperaturas de estrés calórico (Ron *et al.*, 1984, Hansen,

1997). Una de las explicaciones más viables, es que los folículos ováricos son susceptibles al EC (Wolfenson *et al.*, 1995) y que el proceso por el que un folículo antral pequeño se desarrolle a un folículo preovulatorio dura aproximadamente 40-50 días (Lussier *et al.*, 1987 citado por Roth *et al.*, 2001). *In vitro* un shock calórico durante la maduración induce eventos apoptóticos en los ovocitos y la activación de estos procesos es un evento crucial para la pérdida de la competencia de desarrollo (Roth y Hansen, 2004). También se ha visto que los ovocitos colectados después del EC con una baja calidad se asoció con la baja capacidad de desarrollo de embriones *in vitro* durante el otoño (Roth *et al.*, 1999), y se encontraron alteraciones en el patrón de crecimiento y desarrollo de folículos medianos, esto asociado con un marcado aumento en las concentraciones plasmáticas de FSH durante la primera onda folicular del ciclo estral subsecuente a la exposición al calor (Roth *et al.*, 2000). Por lo que respecta a la producción de esteroides se encontró que las células de la teca son más susceptibles que las células de la granulosa y expresaron un efecto residual en los folículos medianos y preovulatorios de los ciclos estrales siguientes a la exposición del EC 20 y 26 días después (Roth *et al.*, 2001a). Todos estos resultados en conjunto podrían ser los responsables de una baja fertilidad en otoño (Roth *et al.*, 2001a). Respecto a este efecto residual se trató de mejorar la calidad de los ovocitos dañados mediante la aspiración de los folículos (3-8mm) de cuatro ciclos estrales consecutivos durante el otoño de vacas previamente expuestas a EC de verano, esto resultó en una emergencia más rápida de ovocitos saludables en el otoño tardío hasta el ciclo estral 3 y 4 (Roth *et al.*, 2001b).

2.2.2.8. Alteraciones estructurales del embrión. El desarrollo embrionario en la etapa de división es demasiado susceptible a la ruptura debido a temperaturas elevadas (Rivera *et al.*, 2001). La exposición de embriones de 2 células a 41.6°C durante 6 horas redujo el porcentaje de embriones de 2 células que desarrollaron a blastocistos al día 8 postfertilización ( $P < 0.001$ ), además que el shock calórico a 43°C causó algunos cambios ultraestructurales que no fueron evidentes a 41.0°C

(Rivera *et al.*, 2003). Por lo que los autores concluyen que las temperaturas elevadas pueden interrumpir el desarrollo embrionario causando alteraciones en el núcleo, citoplasma y mitocondria, algunos de estos cambios ocurren a temperaturas experimentadas por las vacas bajo condiciones de EC (Rivera *et al.*, 2003).

2.2.2.9. Desarrollo embrionario temprano. La susceptibilidad de los embriones al EC probablemente es una de las principales causas para la disminución de la fertilidad y aumento de la mortalidad embrionaria (Ealy *et al.*, 1993). Se ha visto de forma experimental *in vivo* que las vacas sometidas al EC del día 1 al 7 después del estro redujo la etapa de desarrollo y las características morfológicas de embriones cuando fueron colectados al día 7 de hembras superovuladas (Putney *et al.*, 1988a). En estudios mas recientes se ha visto que el embrión es extremadamente sensible al calor durante las primeras tres divisiones (Moore y Thatcher, 2006). Sin embargo los embriones se vuelven mas resistentes a través del desarrollo, adquiriendo termoresistencia desde el día 1 o 2 después de la fertilización, ya que se ha demostrado que el EC en vacas superovuladas redujo el desarrollo y viabilidad de los embriones si las vacas fueron expuestas al EC en el día 1, no teniendo efecto en los días 3, 5 o 7 después del estro (Ealy *et al.*, 1993). La exposición de células del cúmulo del ovocito en cultivo a temperaturas elevadas (40-41°C) durante las primeras 12 horas de maduración disminuyó la tasa de división y la proporción de ovocitos que desarrollaron a blastocisto (Edwards *et al.*, 1997; Roth y Hansen, 2004). Por otra parte el shock calórico puede inducir apoptosis en muchas células, incluyendo embriones en la etapa de preimplantación y la activación de estos procesos es un evento crucial para la pérdida de la competencia de desarrollo (Paula-Lopes y Hansen, 2002; Roth y Hansen, 2004; Jousan y Hansen, 2004). También se discute que es posible que algunos ovocitos que experimentan la activación de las caspasas puedan sobrevivir a la iniciación de la apoptosis y sean fertilizados, aunque con una capacidad reducida para sostener el desarrollo (Roth y Hansen, 2004). Parece

que el shock calórico durante la maduración induce otros cambios celulares que son llevados sobre la etapa embrionaria y que impiden el desarrollo subsecuente (Roth y Hansen, 2004).

### 2.2.3 Respuesta fisiológica del bovino al EC

Los receptores periféricos y unidades termosensitivas en el sistema nervioso central (SNC), regulan la recepción de la temperatura (Baker, 1989), cuando la temperatura se eleva son activados los mecanismos fisiológicos de sudoración y jadeo para aumentar la pérdida de calor mediante evaporación en la superficie corporal y aparato respiratorio (Silanikove, 1992). Las vacas responden a un EC agudo mediante la secreción de grandes cantidades de cortisol que permanecen elevadas en el plasma por 12 horas, después de iniciado el EC, pero van disminuyendo hasta alcanzar valores normales dentro de 1 o 2 días (Christison y Johnson, 1972). En el transcurso de un EC grave existe un pequeño aumento en la producción de calor por parte del animal debido a la actividad de jadeo. Sin embargo, el aumento de la temperatura corporal provocado por la carga de calor ambiental es el hecho que determina una posible hipertermia y puede colocar al animal en una situación precaria. En condiciones de EC severo se ha visto que la frecuencia respiratoria alcanza valores de 200/min. (Thomas y Pearson, 1986). El EC provoca un enfriamiento del centro rostral del hipotálamo estimulando así el centro medio de saciedad, el cuál inhibe al centro lateral del apetito resultando en una disminución en el consumo de materia seca (Albright y Alliston, 1972), y en consecuencia, la disponibilidad de nutrientes para crecimiento y producción es mínima. Sin embargo con una exposición prolongada a los ambientes calurosos, los animales se aclimatan reduciendo su metabolismo en reposo como consecuencia del menor consumo de alimentos y un descenso en la actividad de la hormona tiroidea (Collier *et al.*, 1982). Por consiguiente puede aliviarse la incomodidad del EC aunque no suelen alcanzarse niveles elevados de productividad. Por otra parte cualquier ajuste de las necesidades nutritivas en situaciones de EC se basarán en la gravedad del mismo, que puede variar

considerablemente entre los animales dependiendo de la raza, grado de aclimatación fisiológica, dieta, nivel de productividad, y fluctuaciones diurnas en la carga de calor radiante (Mellado, 1995).

#### 2.2.4 Tratamientos para reducir los efectos del EC

Es de interés vital el desarrollo de estrategias alternativas para reducir los efectos del EC en la reproducción de las vacas lecheras para incrementar la tasa de preñez y así ofrecer la posibilidad de obtener una mejor eficiencia reproductiva (Aréchiga, 2005).

2.2.4.1. Modificación ambiental de la vaca. Un método obvio en la reducción del EC es modificando el ambiente de la vaca para reducir los factores que se manejan dentro de la vaca en la hipertermia ya que las vacas refrescadas pueden aumentar su porcentaje de concepción (Hansen, 1997), por otra parte las grandes variaciones estacionales en la función reproductiva pueden persistir, incluso en granjas que han hecho uso extensivo de tales sistemas de enfriamiento (Hansen y Aréchiga, 1999). Se puede proporcionar un refrescamiento de las vacas por un tiempo limitado, durante la máxima sensibilidad del embrión al EC para que se pueda mejorar moderadamente el porcentaje de concepción (Hansen, 1997). El uso de estos sistemas ha producido algunas mejoras en la fertilidad, pero son incapaces de incrementar el nivel de fertilidad al nivel que puedan coincidir con el de invierno (Armstrong, 1994).

2.2.4.2. Detección de calores. Para disminuir la dependencia en la observación de estros se implemento la Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) la cuál no requiere de la detección de estros (Hansen y Aréchiga, 1999; De Rensis y Scaramuzzi, 2003). El principal beneficio de este tratamiento es el de inducir la ciclicidad y el desarrollo de cuerpos lúteos normales llevando a una buena fertilidad. Aunque esta técnica lleva a un aumento en el número de vacas preñadas por el aumento de vacas que son inseminadas en el momento

adecuado, y aunque esto limita los efectos del EC en la fertilidad no resuelve los problemas ocasionados por el EC (De Rensis y Escaramuzzi, 2003).

2.2.4.3. Suplementación de antioxidantes. Existe cierta evidencia de que la suplementación de antioxidantes a las vacas lecheras, pudieran lograr incrementar el porcentaje de fertilidad por inseminación: probablemente al reducir los niveles de radicales libres que se incrementan a nivel celular a consecuencia de las altas temperaturas (Aréchiga, 2005). La suplementación a largo plazo ( $\geq 90$  días) con  $\beta$ -carotenos incrementó en 14% la proporción de vacas preñadas al día 120 posparto (21% vacas control; 35% vacas tratadas) (Aréchiga *et al.*, 1998).

2.2.4.4. Control Farmacológico de la temperatura corporal. Ha habido poco interés en el ganado para identificar métodos para regular farmacológicamente la temperatura corporal durante el EC (Hansen y Aréchiga, 1999). Empero existen reportes donde se ha observado que cuando se suministra a la ración extracto de cultivo de hongo *Aspergillus Orizae* (Huber *et al.*, 1994, citado por Aréchiga, 2005) se puede disminuir la temperatura corporal de la vaca.

2.2.4.5. Transferencia de embriones. Teniendo en cuenta que los embriones son particularmente sensibles a las temperaturas elevadas se puede emplear la transferencia de embriones dentro de vacas receptoras al día 7 después del estro, cuando los embriones ya hayan pasado el periodo más termosensible de desarrollo (Ealy *et al.*, 1993; Edwards y Hansen, 1997), y es razonable esperar que la transferencia embrionaria durante el verano pueda superar el porcentaje de concepción que la inseminación artificial, como se ha visto en diversos estudios (Hansen y Aréchiga 1999). Por otra parte la recuperación de embriones transferibles de vacas superovuladas es reducida por el EC (Putney *et al.*, 1988a). Esta limitación puede ser omitida por el uso de embriones congelados colectados de vacas en periodos fríos o en regiones no susceptibles al EC (Hansen y Aréchiga, 1999). Otro inconveniente es el alto costo de la transferencia de embriones, que puede ser disminuido a través de la

fertilización *in vitro* de ovocitos colectados usando material de rastro, desgraciadamente la tecnología para el congelamiento de embriones derivados de la fertilización *in vitro* no ha progresado al punto en que se logren porcentajes de fertilidad aceptables bajo condiciones de estrés calórico (Hansen y Aréchiga, 1999).

En un estudio se vio que si se utilizaba el régimen para la sincronización de la ovulación desarrollado para la IATF, la transferencia de embriones fue superior para las vacas que recibieron un embrión previamente criopreservado derivado de la fertilización *in vitro* comparado con las vacas en IATF (Ambrose *et al.*, 1997). Sin embargo, este método tiene muchos inconvenientes por resolver ya que estos embriones son diferentes de los embriones producidos *in vivo* en cuanto se refiere a morfología (Crosier *et al.*, 2001), expresión de genes (Lazzari *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003), metabolismo (Khurana y Niemann, 2000), e incidencia de anomalías cromosómicas (Viuff *et al.*, 2000), y los terneros nacidos de los embriones producidos *in vitro* son más propensos a experimentar defectos de desarrollo (Hastler, 2003). Bajo estas condiciones en un estudio reciente realizó la transferencia de dos embriones dentro del cuerno ipsilateral al CL, para aumentar el aporte de interferón tau y otras moléculas de señalización para el reconocimiento materno, sin embargo este tratamiento no tuvo éxito (Franco *et al.*, 2005).

### **2.3 Hormona del crecimiento (GH)**

La GH es una hormona proteica producida por los somatotropos en la glándula pituitaria anterior (Burton *et al.*, 1994), y se sintetiza de cuatro formas, es decir, puede tener 190 o 191 aminoácidos y leucina o valina en la posición 126 (Wood *et al.*, 1989), estas diferencias en la estructura determinan el potencial de acción (Etherton y Bauman, 1998), ya que se ha visto que tratamientos con valina en la posición 127 provocan un aumento superior en plasma de somatotropina que la variante con leucina-127 (Eppard *et al.*, 1992; Eppard *et al.*, 1993).

Además de su principal función en el proceso de crecimiento por el cuál recibe su nombre, también es conocido su efecto galactopoietico (Asimov y Krouze, 1937, citado por Morales, 2000).

### 2.3.1 Somatotropina recombinante bovina (bST).

Inicialmente se utilizó bST derivado de la pituitaria, hasta que en 1982 se realizó el primer estudio utilizando bST por recombinación genética (Bauman *et al.*, 1982), el cual se ha vuelto uno de los productos biotecnológicos de mayor impacto a nivel mundial (Bauman, 1992).

La magnitud de la ganancia en la eficiencia de la producción de leche con la administración de la bST es igual a la que se lograría normalmente en un periodo de 10 a 20 años utilizando las biotecnologías disponibles (IA y transferencia de embriones; Bauman, 1992).

### 2.3.2 bST en el desarrollo folicular

Diversos estudios han mostrado que los estrógenos potencializan la secreción hepática de IGF-I estimulada por la somatotropina, incrementando el número de receptores hepáticos a somatotropina (Gluckman *et al.*, 1987; Enright *et al.*, 1990; Simpson *et al.*, 1997), por lo tanto la GH puede ejercer un papel paracrino o autocrino durante la maduración del ovocito (Moreira *et al.*, 2002<sup>b</sup>), ya estudios previos han identificado RNAm para receptores de GH en células del cúmulo, murales de la granulosa y en los ovocitos de los folículos ováricos del bovino (Izadyar *et al.*, 1997; Kölle *et al.*, 1998). En folículos primordiales y folículos primarios el ovocito mostró distintos aportes de la transcripción, pero en folículos terciarios el RNAm fue localizado predominantemente en las células del cúmulo oophorus (Schams *et al.*, 1999). *In vitro* la somatotropina aumentó la maduración de ovocitos bovinos, de las células dentro del complejo del cúmulo (Izadyar *et al.*, 1997) y en conjunto con estradiol disminuye la apoptosis de las primeras etapas del desarrollo folicular (Cushman *et al.*, 2001).

### 2.3.3 bST en el cuerpo lúteo

La administración de bST aumenta las concentraciones plasmáticas de progesterona durante la fase lútea (Schemm *et al.*, 1990). También se ha visto que el tejido lúteo es capaz de expresar el mensaje para el receptor de la GH (Tanner y Hauser, 1989). Se han encontrado receptores para bST en las células lúteas grandes del CL del bovino (Lucy *et al.*, 1995, Schams *et al.*, 1999). Por otra parte se ha visto que la administración de bST diariamente incrementó el peso del CL (Lucy *et al.*, 1995). Es posible que la bST tenga efectos directos en las células lúteas grandes o aumente la diferenciación de células lúteas pequeñas a grandes (Lucy *et al.*, 1995). La bST y los factores de crecimiento son necesarios para el crecimiento y desarrollo del CL en rumiantes (Lucy *et al.*, 1995; Reynolds y Redmer, 1999), debido a que se ha visto que la aplicación de bST y LH exógena a ovejas hipofisectomizadas con cuerpos lúteos de bajo peso pueden alcanzar casi el tamaño normal (Juengel *et al.*, 1997).

### 2.3.4 bST en el desarrollo embrionario temprano

Tanto la GH como el IGF-I pueden influenciar el desarrollo embrionario temprano ya que se han identificado RNAm para receptores de GH e IGF-I en el desarrollo del embrión tan temprano como en la etapa de una célula (Izadyar *et al.*, 2000) y la síntesis de estos aumenta dramáticamente del día 2 al 6 de la embriogénesis (Kolle *et al.*, 2001). El RNAm que codifica para el receptor de GH se localizó predominantemente en la masa de células interna de los blastocistos, esto se realizó mediante la hibridación *in situ* (Kölle *et al.*, 2001). Por otra parte, el crecimiento acelerado del concepto bovino durante los días 15 a 18 está correlacionado con una aumentada expresión de RNAm de IGBP-2 e IGF-II (Kolle *et al.*, 2001). Se sugiere que es posible que otros factores de crecimiento estén involucrados posiblemente con el rápido crecimiento del trofoblasto bovino durante la gestación temprana (Geisert *et al.*, 1991). Asimismo, estudios *in vitro* indican que la adición de GH al medio de maduración aumentó la tasa de división de los ovocitos bovinos y que la GH e IGF-I promovieron el desarrollo embrionario

aumentando la proporción de embriones que desarrollaron a la etapa de blastocisto o el porcentaje de blastocistos en etapas de desarrollo avanzadas y el número de células del blastocisto (Moreira *et al.*, 2002a), al igual se vio que la GH afecta el desarrollo embrionario independientemente de las acciones que involucran al IGF-I ya que la adición de un anticuerpo de IGF-I al medio de cultivo inhibió los efectos de la IGF-I pero no afectó los efectos estimulatorios de la GH en el desarrollo embrionario temprano, por lo tanto se sugirió una posible acción paracrina o autocrina durante la maduración del ovocito (Moreira *et al.*, 2002). La forma en que la GH puede afectar la maduración del ovocito independientemente de la IGF-I, es a través de la vía de la señal de transducción de AMPc (Izadyar *et al.*, 1997; Izadyar *et al.*, 1997a).

Mediante estudios empleando la microscopia electrónica por transmisión se sugiere que la GH ejerce distintas acciones en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos de los blastocistos bovinos y esta activación es modulada por la activación de GH embrionaria después del día 8 (Kölle *et al.*, 2001). En un estudio reciente en el cual se administró bST a vacas no lactantes para eliminar el efecto de la producción de leche, se vio que las vacas tratadas tuvieron concentraciones más altas de interferón tau que las vacas testigo, de igual manera el concepto fue mas grande en relación a las vacas testigo (Bilby *et al.*, 2004).

### 2.3.5 Factor de Crecimiento parecido a la Insulina-I (IGF-I)

Muchos de los efectos metabólicos y somatogénicos de la somatotropina se llevan a cabo de manera directa, pero otros los realiza de manera indirecta a través de los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF's), los cuáles son producidos principalmente en el hígado en respuesta a la somatotropina (Hill, 1989; Schemm *et al.*, 1989), ya que se ha visto que las concentraciones de IGF-I en suero se incrementaron 3 veces más aproximadamente 5 a 7 horas después de la primera inyección subcutánea de bST mediante la administración de bST

exógena, sugiriendo que la IGF-I no es liberada de un almacén, si no que es sintetizada de *novo* (Cohick *et al.*, 1989), existe también el IGF-II pero tiene un menor potencial de acción y su secreción no está controlado por la bST (Vicini *et al.*, 1991). Estos factores fueron descubiertos con base en su habilidad para estimular la sulfatación del cartílago y para reemplazar al “factor de actividad de sulfatación” de la GH (Salmon y Daughaday, 1957), sin embargo cuando se logró hacer preparaciones altamente concentradas de estos a partir de concentrados de suero se encontró que estimulaban la incorporación de glucosa dentro de la grasa así como la incorporación de sulfatos dentro del cartílago, concluyendo que estos factores podrían ser muy similares o idénticos en sus estructuras y a su vez a la insulina (Solomon *et al.*, 1967). Esto fue comprobado en 1976 cuando su secuencia fue deducida y mostró ser 48% homólogo con la proinsulina humana (Rinderknecht y Humbel, 1978). Basado en esto, fue renombrado como factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I por sus siglas en inglés; Jones y Clemmons, 1995). Los factores de crecimiento son proteínas con un peso molecular menor a 30000 Daltons, los cuáles tienen la función de hormonas circulantes y/o factores paracrinos, o autocrinos que actúan localmente en diferentes tejidos (Monget y Monniaux, 1995), su estructura consiste de cadenas de 70 aminoácidos (McCusker, 1998, Citado por Morales, 2000).

### 2.3.6 IGF-I en el desarrollo folicular

De manera general los IGFs funcionan como moduladores de las acciones de las gonadotropinas a nivel celular y estimulan la proliferación y diferenciación de las células de la teca y de la granulosa (Armstrong y Webb 1997). El tratamiento con bST aumentó de manera significativa la población de folículos antrales 2-5mm en diámetro en vaquillas, esto a través del aumento en las concentraciones plasmáticas de IGF-I, aunque no se excluye un efecto directo de la bST a nivel ovárico (Gong *et al.*, 1991).

*In vitro* el IGF-I ha demostrado tener un efecto mitogénico más potente que la insulina en las células de la granulosa (Spicer y Echterkamp, 1995) y de la teca (Spicer y Stewart 1996), por lo tanto el IGF-I ha sido implicado como un potencial regulador del crecimiento y diferenciación folicular (Adashi *et al.*, 1985; Hammond *et al.*, 1988). Las células de la granulosa sintetizan IGF-I, un potente promotor de la diferenciación y proliferación celular ovárica (Adashi *et al.*, 1985). La IGF-I facilita la proliferación de las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985; Spicer *et al.*, 1993). Por otra parte *in vivo* se ha visto que las concentraciones de IGF-I incrementan conforme aumenta el tamaño folicular (Spicer *et al.*, 1988; Spicer y Enright, 1991) y la infusión de IGF-I directamente dentro del estroma ovárico altera el crecimiento folicular y concentraciones de estradiol en el líquido folicular (Spicer *et al.*, 2000). Además se ha visto que la FSH junto con la LH actúan de manera sinérgica en el efecto mitogénico de la IGF-I (Lucy, 2000) en células de la granulosa de folículos pequeños (<5mm) no así de los largos (<10mm) (Gong *et al.*, 1993), al mismo tiempo amplifican la acción de las gonadotropinas sobre las células foliculares (Gutiérrez *et al.*, 1997), y en ausencia de FSH la IGF-I actúa como un regulador parácrino de la proliferación de las células del cúmulo en folículos antrales pequeños (Armstrong y Xia, 1993). El sinergismo ocasionado con la LH y FSH es causado por la habilidad del IGF-I para aumentar la actividad y el número de receptores del sistema de segundos mensajeros de los receptores de gonadotropinas (Giudice, 1992). Al mismo tiempo, las gonadotropinas incrementan la expresión del receptor tipo I a IGF y pueden aumentar la síntesis de IGF-I en las células de la granulosa (Spicer y Echterkamp, 1995).

El IGF-I está involucrado también en la etapa de desviación folicular. Esta etapa es el fin de la fase de crecimiento común de los folículos reclutados y es el evento más importante durante la selección del folículo (Ginther *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2003), ocurre cuando el futuro folículo dominante alcanza un diámetro promedio de 8.5mm en vaquillas Holstein (Ginther *et al.*, 2004). En esta etapa las concentraciones de IGF-I libre permanecen elevadas en el futuro folículo dominante de manera concomitante con el estradiol, y comienzan a disminuir en

los futuros folículos subordinados (Ginther *et al.*, 2004). Las altas concentraciones del IGF-I son asociadas temporalmente con una mayor degradación proteolítica de las IGFbps -4 y -5 (Rivera y Fortune, 2003). Esto está apoyado mediante un estudio *in vivo* en el cuál se aplicó una inyección intrafolicular de 20µl (10µg/µl) de IGF-I recombinante humano (rh) en el segundo folículo mas grande después de la ablación del folículo dominante, los resultados demostraron cambios en el líquido folicular que favorecieron el establecimiento de la dominancia y subsiguiente ovulación por el folículo mas largo después de la ablación del folículo dominante (Ginther *et al.*, 2004).

Se ha visto que el IGF-I es un factor importante para el desarrollo del folículo dominante durante el desarrollo de la primera oleada folicular posparto, esto después de que conjuntamente la insulina con el pico de estradiol pueden asegurar la maduración y ovulación (Kawashima *et al.*, 2007). Algunos autores concluyen que grandes cantidades de IGF-I dentro del folículo pueden llevar a una acelerada producción de folículos dominantes (Lucy *et al.*, 1995). Así mismo se ha visto que el RNAm para el receptor tipo I del IGF-I está presente tanto en las células intersticiales de la teca como de la granulosa con niveles crecientes durante el desarrollo final del folículo dominante (Schams *et al.*, 1999).

También se ha visto que la IGF-I estimula la producción de estradiol por parte de las células de la granulosa, pero la magnitud de sus efectos varía con el tamaño del folículo y la presencia de otras hormonas (Spicer *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1994; Spicer y Chamberlain, 1999), de la misma manera estimula la producción de androstenediona (4 o 5 veces más) y progesterona (2 o 3 veces más) inducido por la LH (Stewart *et al.*, 1995; Spicer y Stewart, 1996).

### 2.3.7 IGF-I en el cuerpo lúteo

Se ha visto que las células de la granulosa de folículos antrales son capaces de secretar IGF-I *in vitro* (Adashi *et al.*, 1985; Hammond *et al.*, 1985), mediante estas observaciones se propuso que la IGF-I puede actuar como una señal autocrina que incrementa el número de receptores a LH y la producción de progesterona

(Schemm *et al.*, 1990; Spicer y Echterkamp, 1995). Un aumento en las concentraciones de IGF-I es asociado con una secreción de progesterona aumentada durante el diestro del primero y segundo ciclo estral posparto (Spicer *et al.*, 1990). Asimismo se ha visto que la actividad lútea reducida por un balance energético negativo puede asociarse con la reducción en las concentraciones de IGF-I en suero (Spicer *et al.*, 1990), siendo así que *in vivo* están correlacionadas positivamente las concentraciones de progesterona e IGF-I en el ganado lechero al momento del posparto (Spicer *et al.*, 1990; Spicer *et al.*, 1993). Conjuntamente la insulina con el IGF-I aumentan la producción de progesterona por parte de las células de la granulosa inducida por la FSH (Spicer *et al.*, 1993). Por lo tanto se concluye que tanto la somatotropina y el sistema de IGFs juegan un papel importante en la secreción de progesterona por el CL, tanto *in vitro* como *in vivo* (Spicer y Echterkamp, 1995), debido a que el IGF-I aumentado puede llevar a un aumento en la síntesis de DNA y crecimiento del CL (Lucy *et al.*, 1995).

#### 2.3.8 IGF-I en el desarrollo embrionario temprano

Tanto el IGF-I como el IGF-II están presentes en los fluidos uterinos de la vaca, pero los cambios en sus niveles no son temporalmente asociados con una rápida elongación trofoblástica (Geisert *et al.*, 1991). Los componentes del sistema de factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFs) pueden estimular el desarrollo del concepto y jugar un papel importante en el proceso del reconocimiento materno (Lucy *et al.*, 1995). El crecimiento del concepto puede ser parcialmente dependiente del IGF (Lucy *et al.*, 1995), debido a que los embriones bovinos producen y tienen receptores a IGF-I y -II en todas las etapas de desarrollo de ovocito a blastocisto (Watson *et al.*, 1992; Winger *et al.*, 1997). *In vitro* Matsui *et al.* (1995) reportaron que el desarrollo a la etapa de mórula proveniente de ovocitos se incrementó de 33 a 45% después de la adición de IGF-I (2-200ng/ml) al medio de cultivo. Además la adición de IGF-I (100ng/ml) al medio de cultivo mejoró de manera significativa el desarrollo a la etapa de blastocisto de 11 a 17% (Prelle *et al.*, 2001).

Estudios realizados con embriones producidos *in vitro* han demostrado la acción mitogénica del IGF-I al aumentar el número de células y evitando la apoptosis cuando éste fue adicionado (100ng/ml) al medio de cultivo, no así cuando se adicionó al medio de maduración (Makarevich y Markkula, 2002). De manera similar se mejoró en un 14.4% la proporción de ovocitos que alcanzaron la etapa de blastocisto cuando se adicionó 50ng/ml de IGF-I a un medio definido 18 horas posinseminación (Sirisathien *et al.*, 2003). Se especula que la IGF-I puede incrementar el número de las células de la masa interna reduciendo la prevalencia de la apoptosis dentro de esta (Shirisathien *et al.*, 2003).

En ovinos los mecanismos a través del cuál el IGF-I mejora el desarrollo embrionario temprano es que puede ser liberado dentro del líquido oviductal para estimular el crecimiento embrionario directamente o alternativamente estimular la actividad secretoria de la ampulla, que alcanza su máxima expresión durante este periodo (Murray, 1996), ya que se ha visto que glicoproteínas moduladas por esteroides son liberadas en este periodo y han sido postuladas para aumentar el porcentaje de fertilización y la competencia de desarrollo de los embriones (Murray, 1996).

El IGF-I tiene también relevancia como factor de supervivencia en la preimplantación de los embriones expuestos a estrés, uno de los estresores en las zonas áridas que compromete el desarrollo embrionario son las temperaturas elevadas (Jousan y Hansen, 2004) como se revisó en el capítulo anterior. En un estudio reciente realizado con embriones cultivados *in vitro* sometidos a 41°C por 9 horas seguidas, la adición de 100ng/ml de IGF-I al medio de cultivo incremento el porcentaje de embriones  $\geq 16$  células que desarrollaron a la etapa de blastocisto al día 5 después de la inseminación, es probable que esto se debió a que disminuye el porcentaje de apoptosis en comparación a los embriones a los que no se les adicionó IGF-I ( $P < 0.05$ ) y permite a una mayor proporción de embriones con una alta proporción de células viables (Block *et al.*, 2003) a desarrollar exitosamente a esta etapa, además se sugiere otra posibilidad independiente de la proliferación y apoptosis que aumente la capacidad de

desarrollo de los embriones y los haga más aptos para sobrevivir a las temperaturas elevadas, uno de ellos es bloqueando los efectos deletéreos de los radicales libres (Jousan y Hansen, 2004). De igual manera el porcentaje de preñez en las vacas receptoras de transferencia de embriones en el verano (estrés calórico) fue mas alto para las vacas que recibieron embriones cultivados con IGF-I (100ng/ml) que para las vacas que recibieron embriones control, sin afectar el peso del becerro al nacimiento o la proporción del sexo (Block *et al.*, 2003).

### 2.3.9 Proteínas ligadoras de los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IBGPs)

La bioactividad de los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFs) I y II está controlado por su asociación con una familia de proteínas ligadoras a los IGFs (Armstrong y Webb, 1997), en la actualidad se han caracterizado 6 diferentes IGFBPs a través de purificación o aislamiento y secuenciamiento de DNA (Clemmons *et al.*, 1995). La manera en como controlan la actividad de los IGFs es diversa; las IGFBPs son encontradas en asociación con la matriz extracelular y membranas celulares, siendo así que mediante la localización inmunohistoquímica de los IGFs se ha visto que están codistribuidos con las IGFBPs y así, proveen un almacén extracelular de IGFs que pueden ser dirigidas a poblaciones específicas de células mediante la interacción de las IGFBPs de las membranas celulares y la acción de proteasas específicas (Hill *et al.*, 1989). La liberación de los IGFs de las IGFBPs está controlada por la acción de proteasas específicas de IGFBP (Parker *et al.*, 1995). Por consiguiente, si ocurre una disminución en la producción folicular de IGFBP se puede esperar que aumente la actividad biológica del IGF producido localmente y aumente la respuesta del folículo hacia las gonadotropinas (Armstrong y Webb, 1997), esto se sugiere a partir que en estudios previos se ha observado una disminución en las concentraciones de IGFBP-2, -4 y -5 en el líquido folicular durante el desarrollo de la dominancia (Armstrong *et al.*, 1996).

El sistema de IGF (IGF-I y -II; IGF receptor-I y las IGFBPs) no está involucrado en la iniciación del crecimiento del folículo primordial, contrario a los eventos subsecuentes.

Se ha hipotetizado que la IGFBP-2 y -3 pueden unirse a cualquier IGF que llegue de la circulación o de folículos antrales adyacentes y regulan su acceso a los receptores tipo-I en las células del ovocito y de la granulosa de los folículos preantrales (Armstrong *et al.*, 2002).

Un rasgo importante en el desarrollo de la dominancia folicular es la inhibición FSH-dependiente de la expresión de RNAm que codifica para IGFBP-2 en las células de la granulosa. El incremento consiguiente en la bioactividad de IGF en estos folículos podría aumentar la sensibilidad de sus células de la granulosa a la FSH (Armstrong y Webb, 1997). Por lo que respecta a la disminución de la concentración de IGFBP-4 en el líquido folicular de ovejas durante el desarrollo de la dominancia es debido al correspondiente aumento de la actividad de proteasas específicas a IGFBP-4 (Besnard *et al.*, 1996).

El establecimiento de la dominancia del folículo seleccionado parece estar asociado con un aumento de receptores a LH en las células de la granulosa, esto, acoplado con el aporte de la IGFBP-2 y -4 (Hunter *et al.*, 2004), ya que se ha observado que las concentraciones de IGFBP-2 y posiblemente la -4 y -5, es superior en el líquido folicular de folículos medianos y pequeños así como de los folículos atrésicos, contrariamente se encuentra reducido de manera significativa o son indetectables en el líquido folicular de los folículos dominantes y/o largos (Nicholas *et al.*, 2002).

En rumiantes aparentemente un nuevo hallazgo es la asociación de la IGFBP-I con la luteólisis (Sayre *et al.*, 2000), ya que la IGFBP-I se presenta en el endometrio bovino por el día 13 de preñez (Keller *et al.*, 1998) y podría estar involucrado regulando los efectos de la IGF-I e IGF-II en el desarrollo embrionario (Palma *et al.*, 1997). La presencia temprana de IGFBP-I podría causar inesperadamente cambios en la acción o disponibilidad de los IGFs, y así contribuir al efecto embriotóxico lúteo en la preñez prematura (Inskeep, 1995).

La IGFBP-I puede promover la regresión lútea antagonizando los efectos de la IGF-I en la función lútea (Sayre *et al.*, 2000).

#### 2.3.10 bST en la fertilidad

Los estudios de la somatotropina en la fertilidad son amplios. La aplicación de 500mg de bST el día del estro y una segunda inyección 10 días después (Morales, 1993) resultó en una mejora del 10.57% en el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras (mas de 4 servicios fallidos), resultando en 36.59% y 26.02% para las vacas tratadas y testigo respectivamente ( $P < 0.05$ ). En un estudio posterior de manera similar se administraron dos inyecciones de 500 mg de bST a diferencia de que fue a un intervalo de 14 días, en el día 3 y 17 post-inseminación tanto de vacas de primer servicio como repetidoras (Rodríguez, 1999), no encontrando diferencias en los grupos tanto de primer servicio (42.1% y 40.2%) como de repetidoras (40.4% y 40.9%), a partir de estos resultados se determinó la importancia del momento de la primera aplicación. La aplicación de bST solamente en el día del estro en vacas de primer servicio como de repetidoras (Mendoza, 2000), mostró una diferencia estadística en las vacas repetidoras (46.2% y 34.9%) pero no en las vacas de primer servicio (39.7% y 34.8%), tales resultados concordaron con los obtenidos anteriormente con la doble administración (Morales, 1993), concluyendo que tal mejora en la fertilidad se puede lograr con solo una aplicación de bST. También se ha analizado el porcentaje de concepción de más de 100 días en vacas a las que se les administró bST al momento de la inseminación, resultando en una mejora del 38.5% (64.3% y 25.8% respectivamente), no así en el grupo de vaquillas o vacas lactantes especializadas en la producción de carne (Starbuck *et al.*, 2006).

La bST se ha aplicado también en programas de superovulación tanto a vacas de primer servicio como de repetidoras al inicio del estro, mejorando solamente la calidad embrionaria de las hembras repetidoras (Morales, 2000). Por otra parte se ha analizado la aplicación de bST tanto a las donadoras al momento de la inseminación como a las receptoras un día después de la presentación del estro,

mejorando la tasa de preñez del grupo en el que solo a la donadora se le administró la bST (56.1%) en comparación con los otros grupos (control/control: 25.6%; receptora bST/embrión control: 43.2%, receptora bST/embrión bST: 43.3%), sin embargo se observó que no hubo ningún efecto aditivo cuando a los dos grupos de vacas se les administró bST (Moreira *et al.*, 2002b).

Dados los resultados de todos los trabajos previos en donde se ve involucrado el IGF-I en respuesta a la administración de bST y como el EC deteriora la fertilidad; el objetivo del presente estudio fue el de conocer el efecto de dos inyecciones (250mg) de bST sobre la fertilidad de vacas Holstein de primer servicio bajo condiciones de estrés calórico.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó entre junio y diciembre de 2006, en una unidad de producción lechera de la Comarca Lagunera, México. El sitio experimental está ubicado a 25°32' latitud norte y 103°27' longitud oeste, a 1,013msnm, en una región cálida donde en los meses mas calurosos la temperatura mínima es de 18.7 C y la máxima media de 34 C y la precipitación pluvial es de 326.8 mm anuales (García, 1987).

Se realizaron dos experimentos. El primer experimento denominado estrés calórico agudo (ECA) se realizó en los meses de junio a septiembre con un índice de temperatura-humedad (ITH) medio de 75.9. Se utilizaron 185 vacas multíparas de primer servicio ( $47.4 \pm 8.4$  días posparto,  $2.7 \pm 0.5$  condición corporal y  $2.5 \pm 1.7$  partos;  $X \pm DE$ ), se formaron dos grupos bST (n=119) que recibió una inyección de 250 mg de bST (Boostin®-S, Schering-Plough División Veterinaria®, México) de liberación prolongada por vía subcutánea en la fosa isquiorectal, 7 días antes del servicio y una segunda inyección al momento de la inseminación artificial, alternando el lado anatómico en cada aplicación. El grupo testigo (n=66 vacas) recibió 2ml de solución salina fisiológica en lugar de bST (Figura 1).

El segundo experimento, denominado estrés calórico residual (ECR) se llevó a cabo en los meses de septiembre a noviembre con un ITH medio de 68.6; se emplearon 262 vacas multíparas de primer servicio ( $50.7 \pm 4.8$  días posparto,  $2.6 \pm 0.4$  condición corporal y  $2.5 \pm 1.4$  partos) que se dividieron en dos grupos: bST (n = 126) cuyos animales recibieron una inyección de 250 mg de bST (Boostin®-S, Schering-Plough División Veterinaria®, México) de liberación prolongada por vía subcutánea como se describió en el experimento ECA. El grupo testigo (n=136 vacas) donde las vacas recibieron 2 ml de solución salina fisiológica en lugar de bST (Figura 1). En ambos experimentos, las vacas recibieron una dieta integral constituida de heno de alfalfa, silo de sorgo, heno de avena, silo de maíz, grano de destilería, semilla de algodón, maíz rolado, y una premezcla de minerales. Todas las vacas después del parto fueron sometidas periódicamente a exámenes del aparato reproductor por vía rectal.

La detección de estros fue realizada de manera visual, por 2 personas con experiencia, durante las 24 horas como tarea exclusiva. Se consideró como positiva a estro cuando una vaca se dejaba montar por una compañera o desaparecía la marca con crayón en la grupa o cuando el registro de su actividad locomotora lo indicaba (podómetro). Las vacas positivas a cualquiera de los métodos anteriores fueron revisadas por el inseminador por vía rectal para confirmar el estro. La inseminación artificial (IA) se realizó aproximadamente 12 horas después de iniciado el estro por 2 inseminadores. Al momento de la IA se tomó la temperatura rectal y se registró la condición corporal (en escala de 1 a 5, con incrementos de .25; Edmondson *et al.*, 1989).

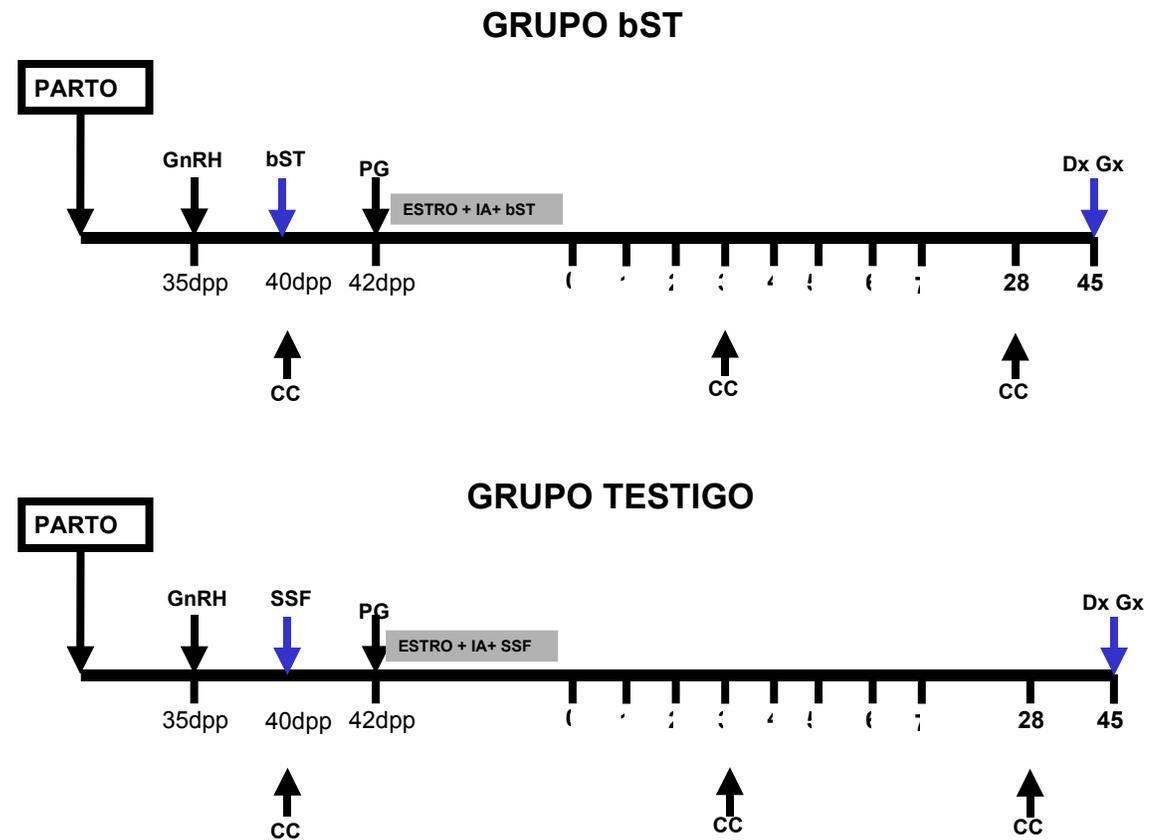
De la base de datos de la unidad de producción se obtuvo la producción de leche el día de la inseminación, el número de partos, número de servicios, días posparto, y tipo de puerperio. Se consideró puerperio anormal cuando la vaca tuvo cualquiera de los siguientes padecimientos: retención de placenta, metritis o piometra. El diagnóstico de gestación se realizó a través de palpación rectal a los 45 días posteriores a la IA.

#### Análisis estadístico

El porcentaje de concepción (la proporción de vacas que quedaron gestantes de aquellas que mostraron estro y fueron inseminadas), así como el porcentaje de vacas inseminadas (la proporción de vacas inseminadas del total de vacas que fueron consideradas dentro del estudio) se compararon entre grupos mediante una prueba de Ji-cuadrada para comparación de homogeneidad entre dos grupos ( Procedimiento de CATMODE; SAS, 1993).

Para determinar si las variables: temperatura rectal, condición corporal al momento de la inseminación, días posparto, tipo de puerperio, número de partos y producción de leche al momento de la inseminación influyeron en el porcentaje de vacas inseminadas o en el porcentaje de concepción, se realizó un análisis de regresión logística para variables binarias, calculando la oportunidad relativa “odds ratio” y el intervalo de confianza al 95% de las variables tipo de puerperio, número de lactación y porcentaje de concepción (SAS, 1993; Daniel, 2002).

Figura 1. Secuencia de la aplicación de los tratamientos bST y testigo en los experimentos



ECA y ECR.

#### IV. RESULTADOS

En el primer experimento, no se observó efecto ( $P>0.05$ ) de la temperatura rectal, días posparto, producción de leche al momento de la inseminación artificial, número de partos, tipo de puerperio y condición corporal en el porcentaje de concepción (Cuadro 1), en el experimento posterior a la exposición del estrés calórico la condición corporal fue menor ( $P<0.05$ ) en el grupo bST.

Cuadro 1. Comparación de variables incluidas en el estudio de acuerdo al tipo de vaca en el experimento estrés calórico agudo (ECA)

Tratamientos	N	Días posparto	Número de partos	Condición corporal	*Prod. Lact. a IA	Temperatura rectal	Puerperio
TESTIGO	66	48.97±6.92	2.9±1.53	2.83±0.39	31.07±18.03	39.36±0.22	0.21±0.41
bST	119	46.60±9.04	2.57±1.75	2.61±0.48	30.71±16.51	39.39±0.16	0.20±0.40

Cuadro 2. Comparación de variables incluidas en el estudio de acuerdo al tipo de vaca en el experimento posterior a la exposición al estrés calórico (ECR).

Tratamientos	N	Días posparto	Número de partos	Condición corporal	*Prod. Lact. a IA	Temperatura rectal	Puerperio
TESTIGO	136	51.53±5.45	2.51±1.35	2.66±0.35 <sup>a</sup>	35.73±15.86	38.28±0.18	0.19±0.39
bST	126	47.79±3.93	2.50±1.37	2.62±0.38 <sup>b</sup>	36.41±16.37	38.31±0.18	0.21±0.41

a.,b Para una determinada columna, diferente literal indica diferencia entre grupos experimentales ( $P>0.05$ ).

\* Prod. Lact. a IA: Producción de leche al momento de la inseminación artificial.

El porcentaje de vacas inseminadas fue similar ( $P>0.05$ ) entre los grupos testigo y tratado con bST tanto en el experimento ECA como en el de ECR (cuadro 3). El intervalo de confianza del porcentaje de concepción del experimento ECA es de 34.93% a 59.01% y en el ECR de 18.7% a 43.12% con una confianza del 95%.

La producción de leche fue similar ( $P>0.05$ ) entre las vacas tratadas con bST y las del grupo testigo (cuadro 5). Por lo que respecta al porcentaje de concepción, éste fue mayor ( $P<0,05$ ) en las vacas del grupo testigo que en el grupo bST tanto en el

experimento ECA como en el de ECR (Cuadro 4). No se encontró efecto ( $P>0.05$ ) de la bST sobre la condición corporal (Cuadro 6).

Cuadro 3. Porcentaje de vacas Holstein inseminadas con dos inyecciones de 250 mg de bST (7 días antes del servicio y al momento de la inseminación) en condiciones de estrés calórico agudo (ECA) y después de la exposición (ECR).

	Tratamientos	N	Número de vacas inseminadas	Porcentaje de vacas inseminadas	P
ECA	Testigo	66	31/66	46.9	>0.05*
	bST	119	64/119	53.8	
ECR	Testigo	136	55/136	40.4	>0.05
	bST	126	61/126	48.4	

\* $P>0.05$ , no se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos de cada experimento.

Cuadro 4. Porcentaje de concepción en vacas Holstein con dos inyecciones de 250 mg de (bST 7 días antes del servicio y al momento de la inseminación) en condiciones de estrés calórico agudo (ECA) y después de la exposición (ECR).

	Tratamientos	N	Número de vacas gestantes	Porcentaje de concepción	P
ECA	Testigo	31	17/31	54.8	<0.05*
	bST	64	19/64	29.7	
ECR	Testigo	55	17/55	30.9	<0.05
	bST	61	6/61	9.8	

\* $P<0.05$  se encontró diferencia entre los tratamientos de cada experimento.

Cuadro 5. Comparación de la producción de leche por grupo en el experimento posterior a la exposición del estrés calórico (ECR)

Tratamientos	N	*Primera medición de leche (kg)	**Segunda medición de leche (kg)
bST	92	39.6±15.6 <sup>a</sup>	43.7±11.4 <sup>a</sup>
Testigo	78	39.7±15.6 <sup>a</sup>	44.1±11.7 <sup>a</sup>

No se detectaron diferencias entre valores medios de los tratamientos en ninguno de los experimentos ( $P>0.05$ ).

(\*) Esta medición se realizó a 7 días después de la administración de la primera dosis de 250mg de bST.

(\*\*) Esta medición se realizó 15 días después de la administración de la segunda dosis de 250 mg de bST.

Cuadro 6 Efecto de la aplicación de dos inyecciones de 250 mg de bST sobre la condición corporal (7 días antes del servicio y al momento de la inseminación) en condiciones de estrés calórico agudo (ECA) y después de la exposición (ECR)

	Tratamientos	*Primera CC	**Segunda CC	***Tercera CC
<b>ECA</b>	bST	2.6±.5	2.4±.5	2.4±.2
	Testigo	2.8±.4	2.8±.4	2.8±.4
<b>ECR</b>	bST	2.6±.4	2.6±.4	2.7±.4
	Testigo	2.7±.3	2.7±.4	2.7±.4

No se detectaron diferencias entre valores medios de los tratamientos en ninguno de los experimentos ( $P>0.05$ ).

\* El primer registro de la condición corporal (CC) se realizó al momento de la primera aplicación de bST

\*\* El segundo registro de la CC se realizó 14 días después de la primera aplicación de la bST

\*\*\* La tercera CC se registro 28 días después de la primera aplicación de la bST

## V. DISCUSIÓN

El tratamiento con 250 mg de bST 7 días antes y al momento de la inseminación tuvo un efecto desfavorable en la fertilidad tanto en el periodo de estrés calórico como en los meses posteriores. En los dos experimentos las vacas tratadas con bST tuvieron un porcentaje de concepción significativamente menor que las vacas del grupo testigo.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros estudios con vacas de primer servicio, en los cuales el tratamiento con 500 mg de bST antes del servicio y aplicaciones subsiguientes cada 14 días incrementaron el porcentaje de concepción (Moreira *et al.*, 2000; 2001; Santos *et al.*, 2004); sin embargo, concuerdan con los resultados obtenidos en estudios realizados en vacas no lactantes y en vaquillas, en los cuáles la bST inyectada al momento de la inseminación o cada 14 días a partir del servicio redujo el porcentaje de concepción (Bilby *et al.*, 2004; Rorie *et al.*, 2004). Asimismo, los datos aquí obtenidos son similares a los obtenidos por Cole *et al.* (1991), en los cuales fue evidente una reducción del porcentaje de concepción de 18% en las vacas que recibieron bST en comparación con vacas no tratadas.

Las causas de la reducción del porcentaje de concepción en las vacas tratadas con bST tanto en el periodo de estrés calórico como en los meses posteriores observadas en el presente estudio, se desconocen; sin embargo estos resultados pueden estar relacionadas con los días posparto al momento de la administración de la bST, ya que en estudios en los cuáles se ha encontrado un efecto positivo en la fertilidad, la bST comenzó a aplicarse a los 63 días (Moreira *et al.*, 2000; 2001; Santos *et al.*, 2004), mientras que en el presente estudio la primera dosis de bST se aplicó en promedio a los 48 días posparto. De esta forma, es muy probable que las vacas recibieran la bST cuando todavía estaban en balance energético negativo (Zurek *et al.*, 1995).

El balance energético negativo (BEN) es una condición que se presenta en la lactancia temprana, en la cuál el consumo de materia seca es incapaz de cubrir

las demandas de energía requeridas por la alta producción de leche, por lo tanto la vaca necesita movilizar sus reservas corporales para compensar el déficit de energía (Collard *et al.*, 2000). Bajo estas circunstancias, la respuesta endocrina al tratamiento con bST está disminuida, lo que se refleja en bajas concentraciones de IGF-I (Fenwick *et al.*, 2006). Por lo que respecta a la respuesta del IGF-I al tratamiento con bST, aunque no se realizó la determinación de la concentración de IGF-I en plasma, se sabe que bajo condiciones similares a las de las vacas del presente estudio, la secreción de IGF-I en respuesta a la bST es limitada (Butler, 2000).

Por otra parte, la concentración plasmática de la hormona del crecimiento (GH) en vacas durante el posparto temprano se encuentra elevada, contrario a los niveles de insulina que se encuentran disminuidos, además, la respuesta de la GH se encuentra alterada por el BEN (Bradford y Allen, 2007). Durante esta etapa los receptores a somatotropina en el hígado tienen una baja afinidad por dicha hormona, además de que se sugiere que puede haber una secreción disminuida o un incremento en la eliminación de la circulación sanguínea del IGF-I (Vicini *et al.*, 2001). La secreción aumentada de GH ha sido observada como una adaptación homeorrética para dirigir los nutrientes de las reservas corporales hacia la síntesis de leche (Bauman, 1982). Lo que permite sugerir que al momento de administrar bST de manera exógena posiblemente se saturaron los receptores que de manera normal se encuentran disminuidos durante esta etapa (Fenwick *et al.*, 2006), lo cual explicaría la ausencia de un efecto favorable en la fertilidad, pero no el efecto negativo del tratamiento.

Además, en un estudio realizado por Bilby *et al.* (2004), se observó que cuando se sobrestimula la secreción de IGF-I puede haber un efecto negativo en la fertilidad ya que se causa una asincronía entre el ambiente uterino y el desarrollo del embrión. Aunque en el presente estudio la sobreestimulación de la secreción de IGF-I es poco probable, debe ser considerada como una posible causa de depresión de la fertilidad. Cabe señalar que en un estudio reciente, la administración de una dosis de 250 mg de bST en vacas con 56 días postparto,

incrementó 3 veces la concentración plasmática de IGF-I y la mantuvo elevada durante 7 días en comparación con las vacas que no recibieron el tratamiento (García *et al.*, 2006).

Loeffler *et al.* (1999) encontraron que la condición corporal al momento de la inseminación afecta la fertilidad, sin embargo, en el presente estudio no se encontró diferencia entre los grupos tratados con la bST y los grupos testigo de ambos experimentos, todos los grupos al momento de la inseminación tuvieron una condición corporal promedio de 2.7 y además no hubo cambios de la CC después del tratamiento con bST.

En cuanto a la producción de leche, se ha observado que la administración de la dosis comercial (500 mg) de bST puede agudizar el balance energético negativo, ya que tiene un efecto rápido en la producción de leche, que se acompaña de un incremento lento en el consumo de materia seca (Kirby *et al.*, 1997). La ausencia de un efecto en la producción de leche en el presente estudio no es clara, pero pudo obedecer a la administración de dos aplicaciones de la dosis reducida (250 mg) de bST, ya que en un estudio en el cuál se administró la misma dosis de 250 mg de bST a vacas de primer servicio en el día 63 incrementó la producción de leche solo en un 5%, contrario a lo que sucede cuando se administra la dosis de 500 mg que aumenta la producción de leche hasta en un 25% (García *et al.*, 2006).

Aunado a las razones anteriores se debe considerar también el efecto que el estrés calórico pudo tener en la respuesta al tratamiento, ya que en estudios en los que se aplicó un choque de estrés calórico a embriones *in vitro*, disminuyó el número de células del trofoectodermo en un 30% y promovió la apoptosis, lo que en conjunto afectó la viabilidad de las células del cúmulo, teniendo como efecto una disminución en la tasa de división y en la proporción de embriones que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto (Paula-Lopes y Hansen, 2002; Roth y Hansen, 2004; Ju *et al.*, 2005). No obstante, en un estudio realizado bajo condiciones de estrés calórico las vacas que recibieron un tratamiento con una

dosis completa de bST (500 mg) al momento del servicio, la fertilidad fue similar a la del grupo testigo. Por lo tanto, es poco probable que el tratamiento con bST en vacas bajo estrés calórico agudice los problemas de infertilidad.

Después del tratamiento con bST se observa una movilización de grasa (lipólisis) la cual pudo afectar la viabilidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano, ya que se tiene evidencia que los ácidos grasos circulantes durante el periodo de lipólisis afectan dichos procesos (Leroy *et al.*, 2005). Si embargo, lo anterior no coincide con lo observado en experimentos realizados con suplementación de grasa de sobrepeso en vacas, en las cuales se ha observado un incremento en la fertilidad. Lo cuál obedece a que los ácidos grasos no son los mismos, ya que los ácidos grasos involucrados en el efecto nocivo son el palmítico y esteárico, mientras que el alfa-lipoico es el que mostró un efecto favorable en la fertilidad (Petit y Twagiramungu, 2006).

Los datos del porcentaje de concepción atípicos obtenidos en el presente trabajo (Cuadro 2) son elevados en comparación con los reportados por Jousan *et al.* (2007) durante los mismos meses de estudio, pero concuerdan con los obtenidos por otros autores (Ingraham *et al.*, 1973; Townson *et al.*, 2002; Starbuck-Clemmer *et al.*, 2007) quienes, encontraron que el porcentaje de concepción a primer servicio resultó superior al obtenido de forma general por el hato bajo estudio. La alta fertilidad observada puede deberse al manejo frecuente de los animales durante el desarrollo del estudio y el óptimo momento de la inseminación, así como la inseminación de las vacas que realmente se encontraban en estro. Asimismo el tamaño de muestra también pudo afectar el resultado.

Otro de los aspectos que se debe considerar en el tratamiento de las vacas con bST es el efecto negativo sobre la expresión y duración del estro ya que esto afecta negativamente el porcentaje de estros detectados y a su vez el porcentaje de vacas inseminadas (Santos *et al.*, 2004). Se ha demostrado (Lefebvre y Block, 1992) que la bST disminuye la expresión del estro en vaquillas ovariectomizadas, en éste estudio propusieron que la bST disminuye la expresión del estro a nivel cerebral, Otra de las razones de este efecto negativo, es que hay una elevación

de la temperatura corporal como consecuencia del calor metabólico debido al aumento en la producción de leche (West *et al.*, 1990), aunque éste incremento en la temperatura corporal puede ser independiente del efecto lactacional (Elvinger *et al.*, 1992; Cole y Hansen, 1993). Este incremento en la temperatura corporal contribuye en conjunto con el estrés calórico para aumentar la letargia en las vacas (Hansen *et al.*, 1997), disminuyendo así el porcentaje de detección de estros.

En la actualidad existen varias técnicas y tecnologías aplicadas en la detección de estros para mejorar el funcionamiento reproductivo en los hatos lecheros, de las cuales en el hato en estudio se emplean de forma rutinaria la técnica del pintado en la base de la cola o “crayoneo”, el podómetro y la detección visual, los cuales tienen una eficiencia en la detección de calores de 88%, 60 a 100% y más del 50%, respectivamente (Kerr y McCaughey, 1984; Senger, 1994). Por otra parte, Rorie *et al.* (2002) concluyen que los podómetros son una tecnología aplicable en el ganado lechero y que tienen más exactitud en la detección de estros cuando se combina con la detección por observación de personal calificado.

En los resultados obtenidos en el presente estudio no se encontró diferencia en el porcentaje de vacas inseminadas entre grupos, lo que sugiere que tanto la aplicación de dosis reducidas, así como el empleo de tecnologías en conjunto que ayuden en la detección de estros (podómetro, crayoneo, detección visual) disminuyen el efecto negativo de la bST y el estrés calórico en la expresión del estro. Esta observación se confirma mediante un estudio realizado en condiciones de estrés calórico en el cual se demostró que la aplicación en conjunto del podómetro, detector de montas (Heat Watch®) y detección visual tuvo como efecto un porcentaje de detección de estros de 80%, más elevado que cuando se utilizaron cada uno de ellos por separado (49%, detección visual; 37%, podómetro y 48% para detector de montas; Peralta *et al.*, 2005).

Se concluye que tanto en la época de máximo calor así como en los meses posteriores, el tratamiento con dos aplicaciones de 250 mg de bST con siete días de diferencia disminuye el porcentaje de concepción en vacas de primer servicio. Por otra parte, el empleo de técnicas y tecnologías tales como la detección visual por personal calificado, el crayoneo y el podómetro en conjunto, disminuyen el efecto negativo de la bST sobre la expresión del estro.

## VI. LITERATURA CITADA

1. Adashi E. Y., Resnick C. E., D'Ercole A. J. D., Svodoba M. E., Van Wyk J. J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr. Rev.* 1985; 6:400.
2. Ahmad N., Schrick F. N., Butcher R. L., Inskeep E. K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Rep.* 1995; 52: 1129-1135.
3. Albright J. L., Alliston C. W. Effects of varying the environment upon performance of dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 1972; 32: 566-577.
4. Ambrose, J. D., Drost M., Monson R. L., Rutledge J. J., M. L., Liebfried-Rutledge, Thatcher M. J., Kassa T., Binelli M., Hansen P. J., Chenoweth P. J., Thatcher W. W. Timed embryo transfer in heat-stressed dairy cattle: A field trial with IVF-derived embryos. *J. Dairy Sci.* 1997; 80 (Suppl. 1):239 (Abstr.).
5. Aréchiga Flores C. F. Efectos adversos del estrés calórico en la reproducción del ganado bovino. Simposio de estrés calórico en ganado lechero, abril de 2005, 5-17.
6. Aréchiga C.F., Staples C.R., McDowell L.R., Hansen P.J. Effects of timed insemination and supplemental  $\beta$ -carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:390-402.
7. Armstrong D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.* 1994; 77: 2044-2050.
8. Armstrong T. D., Xia P. Differential mitogenic actions of insulin-like growth factor-I and FSH on bovine cumulus cell and granulosa cells. *Theriogenology.* 1993; 39: 181.
9. Armstrong D. G., Hogg C. O., Campbell B. K., Webb R. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effect of IGF-I, gonadotropin and follicle size. *Biol. Reprod.* 1996; 55: 1163-1171.
10. Armstrong D. G., Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* 1997; 2: 139-146.

11. Armstrong D. G., Baxter G., Hogg C. O., Woad K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reprod.* 2002; 123: 789-797.
12. Asimov G. J., Krouze N. K. The lactogenic preparations from the anterior pituitary and the increase of milk yield in cows. *J. Dairy Sci.* 1937; 20: 289 citado por Morales R. S. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovárica y desarrollo embrionario en hembras Holstein. Tesis de Doctorado. FMVZ (UNAM), México D. F. 2000.
13. Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Rep. Fert.* 1978; 54: 483-493.
14. Badinga L., Thatcher W. W., Díaz T., Drost M., Wolfenson D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 1993; 39: 797-810.
15. Baker, M.A. Effect of dehydration and rehydration on thermoregulatory sweating in goats. *J. Physiol. Lond.* 1989; 417: 421-435.
16. Bauman D. E. Bovine Somatotropin review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* 1992; 3432-3451.
17. Bauman D. E., DeGreeter M. J., Peel C. J., Lanza G. M., Gorewit R. C., Hammond R. W. Effect of recombinantly derived bovine growth hormone (bGH) on lactational performance of high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1982; 65 (Supl. 1): 121. (Abstr.).
18. Bauman D. E. Bovine somatotropina and lactation: from basic science to comercial application. *Dom. Anim. Endocrin.* 1999; 17: 101-116.
19. Besnard N., Pisselet C., Zapf J., Hornebeck W., Monniaux D., Monget P. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor binding protein levels during growth and atresia of ovine follicles. *Endocrinology.* 1996; 55: 1356-1367.
20. Bianca W. Thermoregulation. In: Hafez. E. S. E. (ed), *Adaptation of domestic animals.* Lea and Febiger. Philadelphia. PA, 1968 pp. 97-118. Chapter 7 citado

- por Silanikove, N. Effect of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Liv. Prod. Sci.* 2000; 67: 1-18.
21. Bilby C.R., Bader J. F., Salfen B. E., Younquist R. S., Murphy C. N., Garverick H. A., Crooker B. A., Lucy M. C. Plasma GH, IGF-I and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. *Theriogenology.* 1999; 51: 1285-1296.
  22. Bilby T. R., Guzeloglu A., Kamimura S., Pacancarci S. M., Michel F., Head H. H., Thatcher W. W. Pregnancy and bovine somatotropina in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. *J. Dairy Sci.* 2004; 87: 3256-3267.
  23. Block J., Drost M., Monson R. L., Tledge J. J., Rivera R. M., Paula-Lopes F. F., Ocon M. O., Krininger C. E., Liu J., Hansen P. J. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J. Anim. Sci.* 2003; 81: 1590-1602.
  24. Bradford B. J., Allen M. S. Negative energy balance increases peripandrial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2007; (artículo en prensa, 8 páginas).
  25. Breazile J. E. Physiologic basis and consequences of distress in animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987; 10: 1212-1215.
  26. Bridges P. J., Brusie M.A., Frtune J. E. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Dom. Anim. Endocrin.* 2005; 29: 508-522.
  27. Brousset HJ, Galindo MF, Valdez PR, Romano PM, Schuneman AA. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Vet. Méx.* 2005; 36: 325-337.
  28. Bruckmaier, RM., Schams, D., Blum, J.W. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentrations of oxytocin, prolactin, cortisol and beta-endorphin. *J. Dairy Res.* 1993; 60: 449-456.

29. Bruckmaier, R. M., wellnitz, O., Blum, J. W. Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade,  $\alpha$ -adrenergic stimulation and in unfamiliar surroundings. *J. Dairy Res.* 1997; 63: 191-200.
30. Bruckmaier, R. M., Blum, J. W. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 939-949.
31. Burton L. J., Mc Bride W. B., Block E., Glimm R. D., Kenelly J. J. A review of bovine growth hormone. *Can. J. Anim. Sci.* 1994; 74: 167-201.}
32. Butler W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 449-457.
33. Byrne A. T., Southgate J., Brison D. R., Leese H. J. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol. Rep. Dev.* 2002; 62: 489-495.
34. Caballero Chacon Sara y Sumano López Héctor. Es el estrés el que controla la respuesta inmune o viceversa? *Vet. Méx.* 1994; 25: 99-103.
35. Cavestany, D, El-Whishy, AB, Foot R., H. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 1985; 68: 1471-1478.
36. Christison G. I., Johnson H. D. Cortisol turnover in heat-stressed cows. *J. Anim. Sci.* 1972; 35: 1005-1010.
37. Clemmons D. R., Busby W. H., Arai T., Nam T. J., Clarke J. B., Jones J. I., Ankrapp D. K. Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Progress in Growth Factor Research.* 1995; 6: 357-366.
38. Cohick W. S., Plaut K., Sechen S. J., Bauman D. E. Temporal pattern of insulin-like growth factor-I response to exogenous bovine somatotropina in lactating cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1989; 6: 263-274.
39. Cole W. J., Madsen K. S., Hintz R. L., Collier R. J. Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. *Theriogenology* 1991; 36: 573-595.

40. Cole J. A., Hansen P. J. Effect of administration of recombinant bovine somatotropin on the responses of lactating and non lactating cows to heat stress. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993; 203: 113-117.
41. Collard B. L., Boettcher P. J., Dekkerst J. C. M., Peticlerc D., Schaeffer L. R. Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.* 2000; 83: 2683-2690.
42. Collier, R.J., Doelger, S. G., Head, H. H., Thatcher, W. W., and Wilcox, C. J. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight, and postpartum milk yield of Holstein cows.
43. Crosier A., Farin P. W., Dykstra M. J., Alexander J. E., Farin C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 2001;64:1375–85.
44. Cunningham JG. *Fisiología Veterinaria*, México, D.F., 1999. Ed. McGraw-Hill Interamericana: 465-477.
45. Cushman A. R., DeSouza J. C., Hedgpeth S. V., Britt H. J. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropina. *Biol. Reprod.* 2001; 65: 581-586.
46. Daniel W. W. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*, 4ª Ed. México D. F., 2002. Ed. Limusa S. A. de C. V. 177.
47. De Moura MD, Choi D, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor –I mediated amplification of follicle stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: Enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod* 1997; 56:946-953.
48. De Rensis F., Escaramuzzi R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology.* 2003; 60: 1139-1151.
49. Díaz B. R. F., Efecto del tratamiento de somatotropina bovina al momento de la inseminación en la fertilidad de vacas Holstein de primer servicio sincronizadas con PGF2 $\alpha$  (Tesis de Maestría). México D. F. 2004.

50. Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Teble JE, Ward WR. Ultrasound and hormone profiles of ACTH-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod. Fert.* 2000 (in press).
51. Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sc.* 2000; 60-61: 743-752.
52. Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. Is stress really all that important?. *Theriogenology.* 2001; 55:65-73.
53. Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 2003; 125: 151-163.
54. Ealy A. D., Drost M., Hansen P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 1993; 76: 2899-2905.
55. Edmondson A. J., Lean I. J., Weaver I. D., Farvert T., Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1989; 72: 68-78.
56. Edwards J. L., Ealy A. D., Monterroso V. H., Hansen P. J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol. Rep. Dev.* 1997; 48: 25-33.
57. Elvinger F., Natzke R. P., Hansen P. J. Interactions of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 1992; 75: 449-462.
58. Enright W. J., Quirke J. F., Gluckman P. D., Breier B. H., Kennedy L. G., Hart I. C., Roche J. F., Coert A., Allen P. Effects of long-term administration of pituitary-derived bovine growth hormone and estradiol on growth in steers. *J. Anim. Sci.* 1990; 68: 2345- 2356.
59. Eppard P. J., Bentle L. A., Violland B. N., Ganguli S., Hintz R. L., Kung Jr. L., Krivi G. G., Lanza G. M. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived and recombinant-derived variants of bovine growth hormone. *J. Endocrinol.* 1992; 132: 47-56.
60. Eppard P. J., White T. C., Brimingham B. K., Hintz R. L., Bentle L. A., Wood D. C., Salsgiver W. J., Rowold E., Miller M. A., Ganguli S., Hale M. D., Krivi G. G.,

- Collier R. J., Lanza M. G. Pharmacokinetic and galactopoietic response to recombinant variants of bovine growth hormone. *J. Endocrinol.* 1993; 139: 441-450.
61. Espinet R. G. Los "stress"-su naturaleza-sus reacciones. *Vet. Arg.* 1987; 40: 882-888.
62. Etherton D. T., Bauman D. E. Biology of Somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 745-761.
63. Ewbank R. Use and abuse of the term "stress" in husbandry and welfare. *Vet. Rec.* 1973; 30: 709-710.
64. Fenwick M. A., Fitzpatrick R., Kenny D. A., Diskin M. G., Patton J., Murphy J. J., Wathes D. C. Domestic. Interrelationships between negative energy balance and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2006; (Artículo en prensa, 14 páginas).
65. Finch V. A. Body temperature in beef cattle: Its control and relevance to production in the tropics. *J. Anim. Sci.* 1986; 62: 531-542.
66. Fraser D., JSD Ritchie, and A. F. Fraser. The term "stress" in a veterinarian context. *Br. Vet. J.* 1975; 131: 653-662.
67. Franco M., Block J., Jousan F. D., de Castro e Paula L. A., Brad A. M., Franco J. M., Grises F., Monson R. L., Rutledge J. J., Hansen P. J. Effect of transfer of one or two in vitro-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriyogenology* 2005 (artículo en prensa, 10 hojas)
68. Friend TH. Symposium response of animals to stress: behavioral aspects of stress. *J Dairy Sci* 1991; 74: 292-303.
69. García E. Modificación al sistema de clasificación climática de Köpen . 4<sup>a</sup> ed. México D. F. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 1987.
70. García S. F., Elizondo V. C., Hernández C. J., Lastra D. G., Fernández G. I. Tasas de concepción en respuesta a dosis reducidas de somatotropina en vacas holstein durante la sincronización del estro. *Memorias del XXX Congreso*

Nacional de Buiatría, 10 al 12 de agosto de 2006 Acapulco (Gro.) México D. F. 231.

71. Geisert R. D., Zavy M.T., Bigger B. G. Effect of heat stress on conceptus and uterine secretion in bovine. *Theriogenology*. 1988; 29: 1075-1082.
72. Geisert D. R., Lee Y. C., Simmen A. F., Zavy T. M., Fliss E. A., Bazer W. F., Simmen C. M. R. Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 1991; 45: 975-983.
73. Giudice L. C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrin. Rev.* 1992; 13: 641-669.
74. Gilad E., Meidan R., Berman A., Graber Y., Wolfenson D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 315-321.
75. Ginther O. J., Beg M. A., Bergfelt D. R., Donadeu F. X., Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 2001; 65: 638-647.
76. Ginther O. J., Beg M. A., Donadeu F. X., Bergfelt D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78: 239-257.
77. Ginther O. J., Bergfelt D. R., Beg M. A., Meira C., Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol. Reprod.* 2004; 70: 99-105.
78. Gluckman P. D., Breier B. H., Davis S. R. Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant. *J. Dairy Sci.* 1987; 70: 442-466.
79. Gong GJ, Bramley TA, Webb R. Effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fert.* 1993; 97: 247-254.
80. Gong J. G., McBride D., Bramley T. A., Webb R. Effect of recombinant somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.* 1993; 139: 67-75.

81. Gong J. G., McBride D., Bramley T. A., Webb R. Effect of recombinant somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J. Endocrinol.* 1994; 143: 157- 164.
82. Gong J. G., Bramley T., Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropina on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol. Reprod.* 1991; 45: 941-949.
83. Griffin, J. F. T.: Stress and immunity: Unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1989; 20: 263-312.
84. Gulay M. S., Hayen M. J., Teixeira L. C., Wilcox C. J., Head H. H. Responses of Holstein cows to a low dose of somatotropin (bST) prepartum and postpartum. *J. Dairy Sci.* 2003; 86: 3195-3205.
85. Gutierrez G. C. Campbell K. B., Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell cultura system: Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 608-616.
86. Gwazdauskas F. C., Thatcher W. W., Kiddy C. A., Paape M. J. and Wilcox C. J. Hormonal patterns during heat stress following PGF<sub>2α</sub>-tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology* 1981; 16:271-285.
87. Hammond J. M., Baranao J. L. S., Skaleris D., Knight A. B., Romanus J. A., Rechler M. M. Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 1985; 117: 2553-2555.
88. Hammond J. M., Hsu C. J., Mondschein J. S., Canning S. F. Paracrine and autocrine functions of growth factors in the ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 1988; 66 (suppl): 21.
89. Hansen P. J. Effects of environment on bovine reproduction. In current therapy in large animal *Theriogenology.* Youngquist R. S., Saunders W. B. Ed. Philadelphia. 1997:403–415
90. Hansen P. J., Aréchiga C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J Anim. Sci,* 1999; 77 (Suppl 2):36-50.

91. Hansen P. J., Drost M., Rivera R. M., Paula-Lopes F. F., Al-Katanani Y. M., Krininger C. E., Chase Jr. C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes y strategies for mitigation. *Theriogenology*. 2001; 91-103.
92. Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 79: 245–64.
93. Her E., Wolfenson D., Flamembaum I., Folman Y., Kaim M., Berman A. Thermal, productive, and reproductive responses of high yielding cows exposed to short-term cooling in summer. *J. Dairy Sci.* 1988; 71: 1085-1092.
94. Hernández CJ y Morales RJS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Mex.* 2001; 32: 279-287.
95. Hernández-Cerón J., Mendoza M. G., Morales S., Gutiérrez G. C. A single dose of recombinant bovine somatotropin improves fertility in dairy cattle. *J. Rep. Fert.* 2000; 54: (Abstr. 140).
96. Hill D. J. Growth factors and their cellular actions. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 85: 723-734.
97. Hill D. J., Clemmons D. R., Wilson S., Han V. K. M., Strain A. J., Milner R. D. G. Immunological distribution of one form of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein and IGF peptides in fetal tissues. *J. Molecular Endocrinol.* 1989; 2: 31-38.
98. Howell J. L., Fuquay J. W., Smith A. E. Corpus Luteum Growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.* 1994; 77: 735-739.
99. Hunter M. G., Robinson R. S., Mann G. E., Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 82-83: 461-477.
100. Huber J. T. Amelioration of heat stress in dairy cattle. In: Phillips, C. J. C. (Ed.), *Progress in Dairy Science*. CAB Int. Oxon, UK, pp. 211-243 citado por Aréchiga Flores C. F. Efectos adversos del estrés calórico en la reproducción del ganado bovino. Simposio de estrés calórico en ganado lechero, abril de 2005, 5-17.

101. Ingraham R. H., Stanley R. W., Wagner W. C. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. *J. Dairy Sci.* 1973; 59: 2086-2090.
102. Inskeep E. K. Factors that affect fertility during oestrous cycles with short or normal luteal phases in postpartum cows. *J. Reprod. Fertil.* 1995; 49 (Suppl): 493-503.
103. Izadyar F., Van Tol H. T. A., Colenbrander B., Bevers M. M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol. Reprod. Dev.* 1997; 47: 175-180.
104. Izadyar F., Van Tol H. T. A., Colenbrander B., Bevers M. M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3', 5'-diphosphate signaling pathway. *Biol. Reprod.* 1997a; 57: 1484-1489.
105. Izadyar F., Van Tol H. T. A., Hage W. G., Bevers M. M. Pre-implantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol. Reprod. Dev.* 2000; 57: 247-255.
106. Jones I. J., Clemmons R. D. Insuline-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 1995; 16: 3-34.
107. Jordan E. R. Effects of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci.* 2003; 86 (suppl): E104-E114.
108. Jousan F. D., Hansen P. J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod.* 2004; 71: 1665-1670.
109. Jousan F. D., de Castro e Paula L. A., Block J., Hansen P. J. Fertility of lactating dairy cows administered recombinant bovine somatotropin during heat stress. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 341-351.
110. Ju J., Jiang S., Tseng J., Parks E. J., Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2005; 64: 1677-1689.

111. Juenguel J. L., Nett M. T., Anthony R. V., Niwsvender D. G. Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factors and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 1997; 110: 219-228.
112. Kawashima C., Fukihara S., Maeda M., Kaneko E., Amaya M. C., Matsui M., Shimizu T., Matsunaga N., Kida K., Miyake Y., Schams D., Miyamoto A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction.* 2007; 133:155-163.
113. Keller M. L., Roberts A. J., Seidel Jr. G. E. Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biol. Reprod.* 1998; 59: 632-642.
114. Kerbler TL, Burh MM, Jordan LT, Leslie K, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997;47:703-714.
115. Kerr O. M., McCaughey W. J. Tail painting technique as an aid to oestrus detection in cattle. *Vet. Rec.* 1984; 114 (Abst.): 605-607.
116. Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 2000;62: 847-56.
117. Kirby C., Smith M. F., Keisler D. H., Lucy M. C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 1997; 80: 273-285.
118. Kölle S., Sinowatz F., Boie G., Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 1998; 59: 836-842.
119. Kölle S., Stojkovic M., Prella K., Waters M., Wolf E., Sinowatz F. Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biol. Reprod.* 2001; 64: 1826-1834.

120. Korte SM., Bouws GAH., Bohus B. Central actions of corticotrophin-releasing hormone (CR-H) on behavioral, neuroendocrine and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement. *Horm Behav.* 1993; 127: 167-183.
121. Lazzari G., Wrezycki C., Herrmann D., Duchi R., Kruij T., Niemann H., Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* 2002;67:767–75.
122. Lefebvre DM, Block E. Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *J. Dairy Sci.* 1992; 75: 1461-1464.
123. Lefcourt, A. M., Akers, R. M.,. Small increases in peripheral noradrenalin inhibit the milk-ejection response by means of a peripheral mechanism. *J. Endocrinology.* 1984; 100: 337-344.
124. Leroy J. L. R. M., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., de Kruif A., Genicot G., Van Soom A. Non-esterified acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod.* 2005; 130: 485-495.
125. Loeffler S. H., de Vries M. J., Schukken Y. H., The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1999; 82: 2589-2604.
126. Lonergan P., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Moreira P. M., Pintado B., De La Fuente J. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 2003; 69:1424–31.
127. Lozano D. R. R., Vásquez P. C. G., González P. E. Efecto del estrés calórico y su interacción con otras variables de manejo y productivas sobre la tasa de gestación de vacas lecheras en Aguascalientes, México. *Vet. Mex.* 2005; 36: 245-260.
128. Lucy M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 2000; 83: 1635-1647.

129. Lucy M.C., Collier R. J., Kitchell M. L., Dibner J. J., Hauser S. D., Krivi G. G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptors populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 1993; 48: 1219-1227.
130. Lucy M. C., Savio J. D., Badinga L., De La Sota R. L., Thatcher W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 1992; 70: 3615-3626.
131. Lucy M. C., Thatcher W. W., Collier R. J., Simmen F. A., Ko Y., Savio J. D., Badinga L. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1995; 12: 73-82.
132. Lucy M. C., Bilby R. C., Kirby J. C., Yuan W., Boyd K. C. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 54 (suppl): 49-59.
133. Lussier J. G., Matton P., Dufour J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Rep. Fert.* 1987; 81: 301-307 citado por Roth<sup>a</sup> Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw Tal R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-size and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001;121: 745-751.
134. Macmillan KL, Taufa VK, Day AM, Peterson AJ. Effects of supplemental progesterone on pregnancy rates in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1991;43 (suppl Abstr):304.
135. Makarevich V. A., Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Rep.* 2002; 66: 386-392.
136. Mann GE y Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001;121:175-180.
137. Matsui M., Takahasi Y., Hishinuma M., Kanagawa H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. *J. Vet. Med. Sci.* 1995; 57: 1109-1111.

138. McBride B. W., Burton J. L., Gibson J. P., Burton J. H., Eggert R. G. Use of recombinant bovine somatotropin for up to two consecutive lactations on dairy production traits. *J. Dairy Sci.* 1990; 73: 3248-3257.
139. McCusker R. H. Controlling insulin-like growth factor activity and the modulation of insulin-like growth factor binding protein and receptor binding. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 1790-1800 citado por Morales R. S. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovárica y desarrollo embrionario en hembras Holstein. Tesis de Doctorado. FMVZ (UNAM), México D. F. 2000.
140. Mellado M. Respuesta fisiológica, producción de leche, eficiencia reproductiva y salud del ganado lechero expuesto a temperaturas ambientales elevadas. *Vet. Méx.* 1995; 26: 389-399.
141. Mendoza M. G. Efecto de una dosis de 500mg de somatotropina bovina recombinante (rbST) en la fertilidad de vacas Holstein al primer servicio y repetidoras. Tesis de Maestría. FMVZ (UNAM), México D. F. 2000.
142. Moberg G. P. Problems in defining stress and distress in animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987; 10: 1207-1215.
143. Moberg G. P. How behavioral stress disrupts endocrine control of reproduction in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991; 74: 304-311.
144. Moberg G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg G. P., Mench JA, editors. *The biology of animal stress*. CABI Publishing, 2000. p. 123-46.
145. Monget P., Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 1995; 49 (suppl.): 321-333.
146. Morales R. S. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina sobre la fertilidad. Tesis de Maestría. FMVZ (UNAM), México D. F. 1993.
147. Morales R. S. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovárica y desarrollo embrionario en hembras Holstein. Tesis de Doctorado. FMVZ (UNAM), México D. F. 2000.

148. Morales-Roura J. S., Zarco L., Hernández-Cerón J., Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology*. 2001; 55: 1831-1841.
149. Moreira F., Risco C. A., Pires M. F. A., Ambrose J. D., Drost M., Thatcher W. W. Use of Bovine Somatotropin in Lactating Dairy Cows Receiving Timed Artificial Insemination. *J Dairy Sci*. 2000; 83: 1237-1244
150. Moreira F., Orlando C., Risco C. A., Mattos R., Lopes F., Thatcher W. W. Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 2001; 84: 1644-1659.
151. Moreira F., Paula-Lopes F. F., Hansen P. J., Badinga L., Thatcher W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*. 2002a; 57: 895-907.
152. Moreira F., Badinga L., Burnley C., Thatcher W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*. 2002b; 57: 1371-1387.
153. Morgan W. F., Lean I. J. Gonadotropin-releasing hormone treatment in cattle: a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. *Austr. Vet. J*. 1993;70:205-209.
154. Moodie E. M., Chamove A. S. Brief Threatening events beneficial for captive tamarins? *Zoo Biol* 1990; 9: 275-286.
155. Moore K., Thatcher W. W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 2006; 89: 1254-1266.
156. Möstl E., Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*. 2002; 23: 67-74.
157. Munck A., Guyre P. M., Holbrook N. I., Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocr. Rev*. 1984; 5: 25-44.

158. Murray M. K. Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 1996; 106: 173-183.
159. Nicholas B., Scougall R. K., Armstrong D. G., Webb R. Changes in insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) isoforms during bovine follicular development. *Reprod.* 2002; 124: 439-446.
160. Palma G. A., Müller M., Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1997; 110: 347-353.
161. Paula-Lopes F. F., Hansen P. J. Heat shock induced apoptosis in bovine preimplantation embryos is a developmentally-regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1169-1177.
162. Parker A., Gockerman A., Busby W. H., Clemmons D. R. Properties of an insulin-like growth factor binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells. *Endocrinology.* 1995; 136: 2470-2476.
163. Peralta O. A., Pearson R. E., Nebel R. L. Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd. *Anim. Rep. Sci.* 2005; 87: 59-72.
164. Petit H. V., Twagiramungu H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology.* 2006; 66: 1316-1324.
165. Phogat P. B., Smith R. F. and Dobson H. Effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH1-24) on ovine pituitary gland responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in vivo. *Animal Reproduction Science.* 1999; **55**: 193-203.
166. Prella K., Stojtovic M., Boxhammer K., Motlik J., Ewald D., Arnold G. J., Wolf E. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and long R(3) IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in in vitro produced bovine embryos. *Endocrinology.* 2001; 142: 1309-1316.

167. Price CA, Webb R. Ovarian response to hCG treatment during the oestrus cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 86: 303-308.
168. Putney D. J., Malayer J. R., Gross T. S., Thatcher W. W., Hansen P. J., Drost M. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. *Biol. Reprod.* 1988; 39: 717-728.
169. Putney D J, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 postinsemination. *Theriogenology* 1988a; 30:195-209
170. Putney D. J., Torres C. A. A., Gross T. S., Thatcher W. W., Plante C., Drost M. Modulation of uterine prostaglandin biosynthesis by pregnant and nonpregnant cows at day 17 post-estrus in response to in vivo and in vitro heat stress. *Anim. Rep. Sci.* 1989; 20: 31-47.
171. Ravagnolo, O., I. Misztal, and G. Hoogenboom. Genetic components of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J. Dairy Sci.* 2000; 83: 2120-2125.
172. Reynolds P., Redmer A. D. Growth and development of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 1999; (suppl)54: 181-191.
173. Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *J. Reprod Fert* 1998; 112: 123-130.
174. Rinderknecht E., Humbel R. E. Te amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 2769-2776.
175. Rivera R. M., Hansen P. J., Development of cultured bovine embryos after exposure o high temperatures in the physiological range. *Reproduction.* 2001; 121: 107-115.
176. Rivera M. R., Kelley L. K., Erdos W. G., Hansen P. J. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in

- vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 2068-2077.
177. Rivera G. M., Fortune J. E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 y -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 2003; 144: 2977-2987.
178. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanism; a review. *Biol. Reprod.* 1991; 45: 523-532.
179. Roberts RM, Farin CE, Leaman DW. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr. Rev.* 1992; 13: 432-452.
180. Robinson NA, Leslie KE, Walton JS. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 1989; 72:202-207.
181. Roman-Ponce H., Thatcher W. W., Canton D., Barron D. H., Wilcox C. J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 1978; 46:175-180.
182. Rodríguez T. G. R. Efecto de la administración de somatotropina bovina recombinante (rbST) los días 3 y 17 postinseminación sobre la fertilidad y la función del cuerpo lúteo en vacas Holstein de primer servicio y repetidoras. Tesis de Maestría. FMVZ (UNAM), México D. F. 1999.
183. Ron M., Bar-Anan R., Wiggans GR. Factors affecting conception rate of Israeli Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 1984; 67: 854–860.
184. Rorie R. W., Bilby T. R., Lester T. D. Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 137-148.
185. Rorie R. W., Rosenkrans C. F., Aishman A. J. Effects of bovine somatotropin treatment on AI pregnancy rate in dairy heifers *Nutr. Fert. Dev.* 2004; 132.
186. Roth<sup>a</sup> Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw Tal R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-size and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001;121: 745-751.

- 187.Roth<sup>b</sup> Z, Arav A, Bor A., Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from preovulatory heat-stressed cows. *Reproduction* 2001;122:737-744.
- 188.Roth Z., Arav A., Bor A., Zeron Y., Ocheretny A., Wolfenson D. Enhanced removal of impaired follicles improves the quality of oocytes collected in the autumn from summer heat-stressed cows. *J. Reprod. Fertil. Abstract Series* 1999; **23**: 78 (Abstract).
- 189.Roth Z., Meidan R., Braw-Tal R., Wolfenson D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Fertil.* 2000; **120**: 83–90.
- 190.Roth Z., Arav A., Braw-Tal R., Bor A., Wolfenson D. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. *J. Dairy Sci.* 2002; **85**: 1398-1405.
- 191.Roth Z., Hansen P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 2004; **71**: 1898-1906.
- 192.Salmon Jr. W. D., Daughaday W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.* 1957; **68**: 357-368.
- 193.Santos J. E. P., Juchem S. O., Cerri R. L. A., Galvao K. N., Chebel R. C., Thatcher W. W., Dei C. S., Bilby C. R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2004; **87**: 868-881.
- 194.SAS. SAS/STAT User's guide, version 6.11 1993.5<sup>th</sup> ed. SAS institute inc. Cary, NC.
- 195.Sayre B. L., Taft R., Inskeep E. K., Killefer J. Increased expression of insulin-like growth factor binding protein-I during induced regression of bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 2000; **63**: 21-29.

196. Shaham-Albalancy A., Meidan R., Rosenberg M., Folman Y., Wolfenson D., The effect of plasma progesterone on steroidogenic capacity of granulosa and theca cells from dominant follicles. *Biol. Reprod.* 1996; 45 (Suppl.), 59.
197. Sharma AK., Rodriguez LA., Wilcox CJ., Collier RJ., Bachean KC., Martin FG. Interactions of climatic factors affecting milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 1988; 71: 819-825.
198. Selye, H. The evolution of the stress concept. *Am. Sci.* 1973; 61: 692-699.
199. Senatore E. M., Butler W. R., Oltenacu P. A. Relationships between energy balance and post/partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *Anim. Sci.* 1996; 62:17-23.
200. Senger P. L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities *J. Dairy Sci.* 1994; 77: 2745-2753.
201. Schams D., Berisha B., Kosmann M., Einspanier R., Amselgruber W. M. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1999; 17: 279-285.
202. Schemm S. R., Deaver D. R., Griel Jr., L. C., Muller L. D. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol. Rep.* 1990; 42: 815-821.
203. Schmitt EJP, Díaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson E., W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 1996;74:1074-1083.
204. Shirisatien S., Hernandez-Fonseca H. J., Brackett B. G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 77: 21-32.
205. Silanikove, N. Effect of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Liv. Prod. Sci.* 2000; 67: 1-18.
206. Silanikove N. Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. *Liv. Prod. Sci.* 1992; 30: 175-194.

207. Simpson R. B., Chase Jr. C. C., Spicer L. J., Carroll J. A., Hammond A. C., Welsh Jr. T. H. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahma cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1997; 14: 367-380.
208. Solomon S. S., Paffenbarger P. L., Hepp D. K., Feinstein L. F., Ensinck J. W., Williams R. H. Quantitation and partial characterization of nonsuppressible insulin like activity in serum and tissue extracts in the rat. *Endocrinology.* 1967; 81: 213-224.
209. Spicer L. J., Enright W. J. Concentrations of Insulin-like growth factor 1 and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarians follicles. Effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analog an (or) thyrotropin releasing hormone. *Journal Animal Science* 1991; 69: 1133-1139.
210. Spicer L. J., Alpizar E., Echtenkamp S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 1993; 71: 1232-1241.
211. Spicer L. J., Echtenkamp S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1995; 12: 223-245.
212. Spicer L. J., Tucker W. B., Adams G. D. Insulin- like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *J. Anim. Sci.* 1990; 73: 929-937.
213. Spicer L. J., Echtenkamp S. E., Cannig S. F., Hammond J. M. Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers af differentiation in bovine antral follicles. *Biol. Rep.* 1988; 39: 573.
214. Spicer L. J., Stewart R. E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor- I (IGF-I) on cell

- numbers and steroidogenesis of bovine theca cells: role of IGF-I receptors. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 255-263.
- 215.Spicer L. J., Chamberlain C. S. Insulin-like growth factor binding protein-3: its biological effect on bovine granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1999; 16: 19-29.
- 216.Spicer L. J., Alvarez P., Prado T. M., Morgan G. L., Hamilton T. D. Effects of intraovarian infusion of insulin-like growth factor-I on ovarian follicular function in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2000; 18: 265-278.
- 217.Stanisiewski E. P., Krabill L. F., Lauderdale J. W. Milk yield, health, and reproduction of dairy cows given somatotropin (somavubove) beginning early postpartum. *J. Dairy Sci.* 1992; 75: 2149-2164.
- 218.Staruck-Clemmer M. J., Hernandez-Fonseca H., Ahmad N., Seidel G., Inskeep E. K. Association of fertility with numbers of antral follicles within a follicular wave during the oestrus cycle in beef cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 2007; 42: 337-342.
- 219.Stewart R. E., Spicer L. J., Hamilton T. D., Keefer B. E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine theca cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 1995; 73: 3719-3731.
- 220.Staruck J. M., Inskeep E. K., Dailey R. A. Effect of a single growth hormone (rbST) treatment at breeding on conception rates and pregnancy retention in dairy and beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 93: 349-359.
- 221.Tanner J. W., Hauser S. D. Molecular evidence for the presence of the somatotropin receptor in the bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 1989; 67 (suppl. 1): 413.
- 222.Thatcher W. W., Staples C. R., Danet-Desnoyers G., Oldick B., Schmitt E. P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 1994; 72 (suppl 3): 16-30.
- 223.Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples CR, Ambrose JD, Coelho. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology* 1997; 47:131-140.

224. Thatcher W. W., Moreira F., Santos J. E. P., Mattos R. C., Lopes F.L., Pancarci S. M., Risco C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001;55:75-89.
225. Thomas, C. K., Pearson, R. A. Effects of ambient temperature and heat cooling on energy expenditure, food intake and heat tolerance of Brahman and BrahmanXFresian cattle working on treadmills. *Anim. Prod.* 1986; 43: 83-90.
226. Townson D. H., Tsang P. C. W., Butler W. R., Frajblat M., Griel Jr. L. C., Johnson C. J., Milvae R. A., Niksic G. M., Pate J. L. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2002; 80: 1053-1058.
227. Vicini J. L., Buonomo F. C., Venhuizen J. J., Millar M. A., Clemmons D. R., Collier R. J. Nutrient balance and stage of lactation affect response of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. *J. Nutr.* 1991; 121: 1656- 1664.
228. Viuff D, Greve T, Avery B, Hyttel P, Brockhoff PB, Thomsen PD. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2–5 post-insemination. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 1143–8.
229. Watson A. J., Hogan A., Hahnel A., Wiemer K. E., Schultz G. A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 31: 87-95.
230. Waterman D. F., Silvía W. J., Hemken R. W., Heersche Jr. G., Swenson T. S., Eggert R. G. Effect of bovine somatotropin on reproductive function in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1993; 40: 1015-1028.
231. West J. W., Mullinix B. G., Johnson Jr. J. C., Ash K. A., Taylor V. N. Effects of bovine somatotropin on dry matter intake, milk yield and body temperature in Holstein and Jersey cows during heat stress. *J. Dairy Sci.* 1990: 73: 2896-2906.
232. West JW. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2003; 86: 2131-2144.

233. Wilson S. J., Marion R. S., Spain J. N., Spiers D. E., Keisler D. H., Lucy M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating Cows. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 2124-2131.
234. Winger Q. A., de los Rios P., Han V. K. M., Armstrong D. T., Hill D. J., Watson A. J. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of "embryotrophic" insulin-like growth factor circuits. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 1415-1423.
235. Wingfield J. C., Ramenofsky M. Hormones and the behavioral ecology of stress. In: Balm PHM, editor. *Stress physiology in animals*. England Sheffield Academic Press-CRC Press; 1999: 1-41.
236. Wise M. E., Armstrong D. V., Huber J. T., Hunter R., Wiersma F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J. Dairy Sci.* 1988a; 71: 2480-2485.
237. Wise M. E., Rodriguez R. E., Armstrong D. V., Huber J. T., Hunter R., Wiersma F., Hunter R. Fertility and hormonal response to temporary relief of heat stress in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1988b; 29: 1027-1035.
238. Wolfenson D., Thatcher W. W., Badinga L., Savio J. D., Meidan R., Lew B. J., Braw-Tal R., Berman A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 1106-1113.
239. Wolfenson D., Flamenbaum I., Berman A. Dry period heat stress relief effects on prepartum progesterone, calf birth weight, and milk production. *J. Dairy Sci.* 1988; 71: 809-818.
240. Wolfenson D., Luft O., Berman A., Meidan R. Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  production in bovine luteal cells. *Anim. Rep. Sci.* 1993; 1993: 32: 27-40.
241. Wolfenson D., Roth Z., Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Rep. Sci.* 2000; 60-61: 535-547.
242. Wood D. C., Salsgiver W. J., Kasser T. R., Lange G. W., Rowold E., Violand B. N., Johnson A., Leimgruber R. M., Parr G. R., Siegel N. R., Kimack N. M., Smith C. E., Zobel J. F., Gangulli S. M., Garbow J. R., Bild G., Krivi G. G. Purification

- and characterization of pituitary bovine somatotropin. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 14741-14747.
243. Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF) IGF II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1998; 15: 55-63.
244. Young B. A., Church C. D. *El Rumiente. Fisiología Digestiva y Nutrición.* Editorial Acribía, S. A. Zaragoza, España. 1993: 525-531.
245. Zarco Q. L. A., Efectos del balance energético en la reproducción de la vaca lechera de alta producción: mecanismos, importancia y prevención. *Mejoramiento Animal: Reproducción.* FMVZ-UNAM, Editorial, División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia, México. 151-170.
246. Zurek E., Foxcroft G. R., Kenelly J. J. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1995; 78: 1909-1920.