

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE GONADOTROPINA
CORIÓICA HUMANA EN EL DÍA 5 POSINSEMINACIÓN
EN LA FUNCIÓN LÚTEA Y PORCENTAJE DE
CONCEPCIÓN EN VACAS LECHERAS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA
ERNESTO URZÚA GONZÁLEZ

TUTOR
JOEL HERNÁNDEZ CERÓN

COMITÉ TUTORAL
CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR
MARIA TERESA SÁNCHEZ TORRES ESQUEDA

MÉXICO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Ernesto Urzúa González

DEDICATORIAS

A mis padres

Gracias por el apoyo incondicional que me dan en todo lo que emprendo, esto me ha ayudado a superarme como persona y profesionista.

A mis hermanos

Gracias por su apoyo, su aliento y sobre todo su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

A los Miembros de mi comité tutorial:

Dr. Joel Hernández Cerón muchas gracias por todas las puertas que me ha abierto, esto me ha ayudado a formarme como profesionista.

Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar muchas gracias por la confianza y la oportunidad que me ha dado.

Dra. Teresa Sánchez Torres Esqueda muchas gracias por su apoyo para realizar esta tesis.

A Intervet Schering-Plough Animal Health, en especial a la MVZ Gabriela Mapes y al MVZ Carlos Corona, por la ayuda económica que me dieron durante y después de realizar el experimento, además de brindarme su amistad.

A todo el personal que labora en el rancho Beta San Gabriel y en especial a los Médicos Agustín Garza, Jesús Moran, Donato González, y al Ingeniero Remigio del Hoyo.

A todos mis amigos del departamento de Reproducción Adrianita, Circe, Yolanda, Linda, Anita, Mario, Bruno, Paty, Carla, Gloria, Rafael, Gil, Álvaro, Ale, Adrian,

Y gracias también a mis mejores amigos Axel, Ángel, Juan y Ricardo.

RESUMEN

En la vaca lechera las pérdidas embrionarias se han asociado con bajas concentraciones séricas de progesterona durante el desarrollo temprano del embrión. La inducción de la ovulación del folículo dominante en los días 4 a 7 del ciclo ocasiona la formación de un cuerpo lúteo y un aumento en los niveles de progesterona. En este estudio se probó si la inyección de hCG el día 5 después de la inseminación incrementa los niveles de progesterona y el porcentaje de concepción en vacas lecheras. Se utilizaron 989 vacas Holstein de distinta paridad (rango 1 a 9 partos), de diferente número de servicio (rango 1 a 4 servicios) y con una producción láctea promedio de 11700 kg por lactación. Las vacas fueron inseminadas a tiempo fijo después de la aplicación del protocolo Ovsynch, o posterior a la presencia de estro natural. En el día 5 posinseminación las vacas fueron asignadas al azar a dos tratamientos: 1) hCG (n=482), las vacas recibieron por vía intramuscular 3500 UI de hCG; 2) Testigo (n=507), las vacas recibieron 3.5 ml de solución salina fisiológica. En el día 30 posinseminación se diagnosticó la gestación mediante ecografía y se confirmó el día 60 por palpación rectal. En 15 vacas de cada grupo se determinaron las concentraciones plasmáticas de progesterona en los días 5, 11 y 15 posinseminación. En las vacas tratadas con hCG el porcentaje de concepción global fue mayor ($P < 0.05$) en el día 30 (47.5 vs 37.5%), y 60 (41.1 vs 31.6%) en comparación con el grupo testigo. Cuando los datos fueron analizados por número de servicio, la hCG mejoró la fertilidad sólo en las vacas de primer servicio [hCG, (día 30= 55.9% y día 60= 45.3%) vs testigo (día 30= 41.0% y día 60= 33.2%)], pero no en vacas de segundo, tercero o cuarto servicio ($P > 0.2$). Las concentraciones de progesterona fueron más altas en las vacas tratadas con hCG que en las testigo ($P < 0.05$). El mantenimiento o ganancia de condición corporal posterior a la inseminación influye positivamente en el porcentaje de concepción en ambos grupos. Así, el tratamiento con hCG aumentó el porcentaje de concepción sólo en las vacas de primer servicio que perdieron condición corporal. Se concluye que la inyección de 3500 UI de hCG el día 5 posinseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas de primer

servicio pero no en vacas de más servicios, y este efecto fue más evidente en las vacas que perdieron condición corporal.

Palabras clave: hCG, fertilidad, progesterona, vacas lecheras.

ABSTRACT

Low serum progesterone concentration after breeding is associated with pregnancy losses. Human chorionic gonadotropin (hCG) treatment on day 5 after estrus induces ovulation of the first-wave dominant follicle and the formation of an accessory corpus luteum. Here, we tested whether an injection of hCG on day 5 after artificial insemination (AI) increases conception rate and plasma progesterone concentration in lactating dairy cows. We used nine hundred eighty-nine Holstein cows of different parity (range 1 to 9 parts) of different service number (range 1 to 4 services) and an average milk production than 11,700 kg per lactation. Cows were inseminated at fixed timed after an Ovsynch protocol or after natural estrus. Five days after AI, cows were randomly assigned to either a treated (hCG; n =482) or a control (n = 507) group; animals in the treated group were given 3500 UI of hCG. Pregnancy diagnoses were performed on day 30 and 60 post-AI by ultrasonography and rectal palpation respectively. Blood samples were taken on days 5, 11 and 15 from fifteen cows in each group for progesterone quantification. Conception rates were higher for hCG-treated cows on day 30 (47.5 vs 37.5%), and 60 (41.1 vs 31.6%) after AI. The number of previous inseminations affected the response to the hCG treatment. First insemination cows improved conception rate when treated with hCG both on day 30 (55.9% > 41.0%) and 60 (45.2% > 33.1%). However, this effect was not observed in cows of two or more inseminations ($P>0.2$). Progesterone concentrations were higher ($P<0.05$) in cows treated with hCG than in control cows. Changes in body condition score (BCS) from AI to day 30 were associated with changes in conception rate. In both groups, cows that gained or maintained BCS from AI to day 30 had higher pregnancy rate than those that lost BCS. Treatment with hCG improved conception rate in cows losing body condition score (BCS) between AI and day 30 after AI. It is concluded that hCG on day 5 after AI increases conception rate and plasma progesterone in first service lactating dairy cows, and this effect was evident in cows losing BCS.

Key words: hCG, Fertility, progesterone, dairy cows

CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN	I
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1 Infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos	3
2.1.1 Producción de leche e infertilidad	4
2.1.2 Número de vacas por hato	4
2.1.3 Inicio de la actividad ovárica posparto	6
2.1.4 Alteraciones hormonales	6
2.1.5 Nutrición	11
2.1.6 Estrés calórico	12
2.1.7 Estrés oxidativo	14
2.1.8 Detección de estros y momento de la inseminación artificial	15
2.1.9 Condición corporal y fertilidad	16
2.1.10 Quistes ováricos	17
2.1.11 Intervalos entre servicios	19
2.1.12 Mastitis y fertilidad	20
2.2 Tratamientos enfocados en disminuir la mortalidad embrionaria	21
2.2.1 Tratamiento con GnRH posinseminación	21
2.2.2 Administración de progesterona	23

2.2.3 Papel de la Gonadotropina Coriónica Humana en la reproducción	24
2.2.3.1. Formación de cuerpo lúteo accesorio	24
2.2.3.2 Cambio en la dinámica folicular	26
2.2.3.3 Uso de hCG en el tratamiento de la infertilidad	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1 Manejo de los animales	30
3.2 Tratamientos	30
3.3 Radioinmunoensayo	31
3.4 Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIONES	45
7. BIBLIOGRAFIA	46

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Porcentaje de concepción de diferentes estudios donde se aplicó hCG en distintos días posterior a la IA.	Página. 29
Cuadro 2.	Porcentaje de concepción a 30 y 60 días en vacas tratadas con hCG al día 5 posinseminación agrupadas por número de servicio.	33
Cuadro 3.	Riesgo relativo de gestación en vacas tratadas con hCG de acuerdo al cambio en condición corporal y número de servicio que influyen en el porcentaje de concepción al día 30.	34
Cuadro 4.	Riesgo relativo de gestación en vacas tratadas con hCG de acuerdo al cambio en condición corporal y número de servicio que influyen en el porcentaje de concepción al día 60.	35
Cuadro 5.	Porcentaje de concepción a 30 días en vacas tratadas con hCG que ganan, mantienen o pierden condición corporal, del momento de la IA al diagnóstico de gestación.	36
Figura 1.	Concentraciones plasmáticas de progesterona en los días 5, 11 y 15 del ciclo en los grupos hCG y testigo.	37

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 40 años la intensa selección genética del ganado lechero y el mejoramiento de las prácticas de manejo ha aumentado la eficiencia biológica para producir leche, pero también ha disminuido la fertilidad (Morris y Diskin, 2008). En promedio, el porcentaje de pérdidas embrionarias y fetales en la vaca alta productora es cercano al 60% y se estima que de 70 a 80% de estas pérdidas ocurren en los primeros 16 días posinseminación (Diskin y Morris, 2008).

Una de las causas de la falla en la concepción es la disminución de la capacidad del embrión para sintetizar interferón- τ durante el reconocimiento materno de la gestación. Dicha condición puede estar determinada por un retraso en el desarrollo, lo cual se ha asociado con una disminución en las concentraciones séricas de progesterona (Binelli *et al.*, 2001; Mann y Lamming, 2001). Está bien establecido que la progesterona estimula la producción de diferentes secreciones endometriales necesarias para el desarrollo del embrión (Geisert *et al.*, 1992). Se han relacionado bajas concentraciones de progesterona con anomalías del desarrollo embrionario temprano (Mann *et al.*, 2001) mientras que la administración de progesterona ha favorecido el desarrollo del embrión y la secreción de interferón- τ (Mann *et al.*, 2006).

En condiciones de campo hay varios enfoques para aumentar los niveles séricos de progesterona y mejorar el porcentaje de concepción en vacas lecheras. En diversos estudios se ha suplementado progesterona mediante implantes o dispositivos intravaginales, con resultados variables (Van Cleef *et al.*, 1991; Larson *et al.*, 1995). También se ha logrado aumentar las concentraciones sanguíneas de progesterona mediante la inducción de un cuerpo lúteo adicional. El tratamiento con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en los días 4-7 posinseminación provoca la ovulación del folículo dominante y la formación de un cuerpo lúteo adicional (Price y Webb, 1989), lo cual se refleja en un incremento en los niveles

de progesterona. Además, la luteinización del folículo con la hCG en el día 5 del ciclo permite la emergencia temprana de la segunda oleada folicular, lo que provoca que una alta proporción de las vacas presenten 3 ondas foliculares. La presencia de tres oleadas foliculares posterior a la inseminación puede ser un factor que regule la fertilidad; ya que la fase lútea es más larga lo que favorece que los embriones tengan más tiempo para establecer el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación (Díaz *et al.*, 1998).

Santos *et al.* (2001) aplicaron 3300 UI de hCG en el día 5 después de la inseminación y lograron incrementar 7.1% el porcentaje de concepción, lo que coincidió con un incremento en las concentraciones de progesterona sanguínea. Sin embargo, estudios realizados en vaquillas lecheras de reemplazo (Schmitt *et al.*, 1996b), vacas lecheras (Walton *et al.*, 1990; Schmitt *et al.* 1996b; Chagas e Silva y Lopes da Costa, 2005; Hanlon *et al.*, 2005; Galvao *et al.*, 2006; Shams-Esfandabadi *et al.*, 2007; Fischer-Tenhagen *et al.*, 2008) y novillas de carne (Funston *et al.*, 2005) no se han encontrado resultados favorables en fertilidad. Esta falta de consistencia en los resultados indica que hay factores particulares de los hatos estudiados que determinan el éxito de dicho tratamiento.

En este estudio se probó si la aplicación de hCG el día 5 después de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein de diferente número de servicio.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos

La fertilidad de las vacas lecheras ha disminuido en los últimos 30 años casi un punto porcentual por año, lo que ha coincidido con un incremento sostenido en la producción de leche. En los hatos lecheros de Norteamérica (Butler, 1998; Lucy, 2007) se ve una clara reducción del porcentaje de concepción en los últimos 40 años. Así en los años 60 se lograba gestar al 65% de las vacas servidas mientras que actualmente el porcentaje de concepción es alrededor de 30.

Aunque es evidente una relación entre la alta producción de leche y la fertilidad, la producción por sí misma no disminuye la fertilidad, sino son los cambios metabólicos que impone la lactación, asociados con un manejo inadecuado de la alimentación y con la industrialización de la producción lechera caracterizada por un aumento del número de vacas por hato (Villa-Godoy *et al.*, 1988; Lucy *et al.*, 1992, Butler, 2000).

La baja fertilidad es provocada por la falla en la fertilización del óvulo y por la alta incidencia de muerte embrionaria temprana; se ha observado que cerca de 80 a 90% de los ovocitos es fertilizado, sin embargo, una alta proporción de los embriones muere antes del día 18 posinseminación (Ayalon, 1978; Thatcher *et al.*, 1994; Zavy, 1994). De esta forma, dado que la muerte del embrión ocurre antes del reconocimiento materno de la gestación, las vacas regresan al estro en un periodo equivalente a un ciclo normal. En algunos casos la muerte del embrión sucede después del día 18 y las vacas retornan al estro más allá del día 21 posinseminación (Thatcher *et al.*, 2006).

Las causas de la falla en la fertilización y de la muerte embrionaria temprana están asociadas con diferentes condiciones, tales como la alta producción de leche, el intervalo del parto a la primera ovulación, la profundidad del balance energético negativo, condición corporal antes y después del parto, problemas del puerperio,

momento de la inseminación, técnica de inseminación, características de la dieta, estrés calórico y factores genéticos.

2.1.1 Producción de leche e infertilidad

La relación entre producción y reproducción ha motivado muchas investigaciones para determinar si efectivamente la producción de leche tiene un efecto negativo en la fertilidad. Algunos investigadores veterinarios toman como un hecho que las vacas más productoras de leche son intrínsecamente menos fértiles; sin embargo, un estudio reciente demostró que las vacas con producciones mayores a los 50 kg en el día 50 posparto fueron más fértiles que las vacas con menor producción (López-Gatius *et al.*, 2006). Posiblemente la relación entre el aumento de la producción de leche y la disminución de la fertilidad tiene que ver más con la intensificación del manejo en los hatos lecheros que con el efecto *per se* de la alta producción. Es sabido que la lactación ocasiona cambios metabólicos en todas las vacas, por ejemplo, después del parto caen en un balance energético negativo (BEN), y se sabe que dicha condición afecta negativamente el desarrollo folicular (Beam y Butler, 1999), el potencial de ovocitos para desarrollar un embrión viable (Leroy *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006) y la función del cuerpo lúteo (Villa-Godoy *et al.*, 1988), repercutiendo en la fertilidad al primer servicio.

Sin embargo, los efectos de la lactación en la reproducción se mitigan si las vacas llegan con buena condición corporal al parto y reciben buena alimentación durante el periodo de transición. En México, en un análisis que incluyó la información de 72 hatos (26676 vacas) con un rango de producción de 7503-12225 kg (365 días), se observó que la producción de leche no afectó el intervalo entre partos, servicios por concepción ni días abiertos (Hernández y Gutiérrez, 2007).

2.1.2 Número de vacas por hato

Al mismo tiempo que ha aumentado la producción de leche por vaca, la ganadería lechera también ha experimentado un crecimiento en el número de cabezas por

hato. En México se ha observado en los últimos años un crecimiento de los hatos y el establecimiento de otros nuevos con más de 1000 vacas en ordeño. El crecimiento de los hatos ocasiona que las prácticas más elementales de manejo no se realicen correctamente. Un ejemplo de errores de manejo debidos al tamaño del hato es durante la administración de las hormonas para la sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo. El manejo de lotes grandes conlleva a que algunas vacas reciban una inyección equivocada y en otros casos que algunas vacas reciban una prostaglandina cuando están gestantes. El tamaño del hato ocasiona otro tipo de problemas asociados con el manejo general. Al ser el hato más grande y al tener prácticas de manejo más intensivas el ganadero y los trabajadores pierden fácilmente el control de las vacas. Por otra parte, el confinamiento en grandes grupos también puede afectar la fertilidad, ya que se sabe, por ejemplo, que el confinamiento se asocia con la incidencia de diferentes afecciones que repercuten negativamente la reproducción (ejemplo: retención de placenta e infecciones uterinas) (Gröhn y Rajala-Schultz, 2000; Chebel *et al.*, 2004).

El incremento en el tamaño del hato se asocia con la disminución de la eficiencia reproductiva. En el análisis de la información de 72 hatos mexicanos (hatos de 44 a 2191 vacas) se observó que el número de vacas por hato no afectó el intervalo entre partos ni los días abiertos. No obstante, fue evidente un efecto significativo ($P < 0.05$) en el número de servicios por concepción, observándose que por cada 100 vacas que aumenta el tamaño del hato hay un incremento de 0.05 servicios por concepción (Hernández y Gutiérrez, 2007).

El efecto de la carga excesiva de trabajo o la mala capacitación del personal involucrado en el manejo reproductivo pueden ser más importantes que los mencionados factores intrínsecos, como causas de infertilidad. Aunque la disminución de la fertilidad en el ganado lechero también obedece a factores

genéticos, sin duda, el peso específico de los errores de manejo asociados con el tamaño del hato es mayor.

2.1.3 Inicio de la actividad ovárica posparto

El intervalo del parto a la primera ovulación es uno de los parámetros que se ha asociado con la fertilidad. Así, las vacas que tienen más ciclos estrales antes de la primera inseminación son más fértiles que las vacas que tienen menos ciclos (Thatcher y Wilcox 1973; Butler y Smith, 1989; Butler, 2001; Darwash *et al.*, 2001). El periodo del parto a la primera ovulación ha aumentado en los últimos 40 años; así, en 1964 era de 29 ± 3 días y actualmente es de 43 ± 5 días (Lucy, 2001). En México, el intervalo entre el parto a la primera ovulación en ganado lechero en sistemas de producción en pequeña escala (hatos de 5 a 20 vacas), es de 32.3 ± 2.3 días (Salas, 1998). En contraste, en un hato bajo condiciones de producción intensiva con 1150 vacas, el intervalo del parto a la primera ovulación es de 45.8 ± 2.7 . Cabe señalar que en este último estudio, 23% de las vacas aun no habían ovulado en el día 70 posparto (Lara *et al.*, 2002).

El intervalo del parto a la primera ovulación es afectado principalmente por los cambios metabólicos que ocurren durante el periodo de transición. Se ha observado que la pérdida de condición corporal de más de 1 punto (escala 1 a 5) durante las primeras cuatro semanas posparto alarga el periodo del parto a la primera ovulación (Butler, 2000).

2.1.4 Alteraciones hormonales

Durante el desarrollo embrionario temprano, el embrión bovino es dependiente del ambiente que existe en el oviducto y útero. La progesterona al unirse a sus receptores en el estroma o endometrio uterino desencadena una cascada de eventos que incluyen: cambios en la expresión de genes, un aumento en la permeabilidad a iones, aminoácidos o metabolitos del plasma y la síntesis de factores de crecimiento (Revelli *et al.*, 1998; Duras *et al.*, 2005), lo que favorece un ambiente propicio para el desarrollo del embrión.

Algunos estudios muestran que las vacas subfértiles tienen afectada la función del cuerpo lúteo (Lamming y Darwash, 1998; Mann y Lamming, 1999; Mann y Lamming, 2001; Stronge *et al.*, 2005). Así, bajas concentraciones en el día 5 postinseminación (Shelton *et al.*, 1990; Lamming y Darwash, 1995; Larson *et al.*, 1997) o un retraso en el aumento de las concentraciones de progesterona entre los días 4 y 5 posterior al servicio (Larson *et al.* 1997; Darwash y Lamming, 1998; Starbuck *et al.*, 1999) se han asociado con una reducción en el porcentaje de concepción. Además, se ha observado que estas condiciones tienen como resultado el desarrollo de embriones de menor tamaño que secretan cantidades inferiores de interferón- τ , de esta forma se disminuye la habilidad del embrión para inhibir el mecanismo luteolítico (Kerbler *et al.*, 1997; Mann y Lamming 2001). Por otro lado, la inserción de un CIDR en los días 5 a 9 incrementa 4 veces el tamaño del trofoblasto y 6 veces las concentraciones uterinas de interferón- τ en vacas no lactantes (Mann *et al.*, 2006), y por esto, se han planteado diferentes factores que afectan la función lútea.

Una de los factores investigados, es el incremento de la producción láctea y los efectos metabólicos que esto desencadena. Varios estudios en vacas lecheras han evaluado las concentraciones circulantes de esteroides y se han encontrado diversos resultados. Sartori *et al.* (2004) compararon en vacas (60 días postparto) y novillas, las concentraciones de progesterona y el volumen lúteo, y encontraron que las concentraciones circulantes de progesterona eran menores en las vacas, sin embargo, el volumen lúteo fue mayor en las vacas que en las novillas. De igual forma las concentraciones circulantes de estradiol fueron menores en las vacas, mientras que, el diámetro folicular fue mayor en las vacas. Una explicación a este efecto es que en las vacas en producción el metabolismo de las hormonas esteroides aumenta conforme la producción láctea se incrementa.

Por otra parte, se ha asociado el incremento de la producción láctea con un aumento en el consumo de materia seca. Se ha propuesto que el incremento en el consumo de materia seca, incrementa el flujo sanguíneo, el metabolismo hepático y por consiguiente se aumenta la excreción de progesterona y estradiol. Sangsritavong *et al.* (2002) probaron esta hipótesis, y encontraron que previo al momento de alimentarse, el flujo sanguíneo hepático es mayor en vacas en lactación (1561 ± 57 L/hr) que en vacas no lactantes (747 ± 47 L/hr) de la misma edad y talla. El flujo sanguíneo hepático, así como el metabolismo de progesterona y estrógenos se incrementó inmediatamente después del consumo de alimento en vacas en lactación y no lactantes, también se observó que el metabolismo de progesterona y estradiol fue 2.3 veces mayor en vacas en lactación. Así, los cambios en el metabolismo de los estrógenos y la progesterona en respuesta a la alimentación fueron inmediatos y parecen estar relacionados con cambios agudos en el flujo sanguíneo hepático. Estos resultados indican, que incluso en un mismo nivel de producción hormonal, las vacas lecheras que consumen mayor cantidad de materia seca pueden tener una baja concentración de esteroides circulantes.

Con el objetivo de determinar el momento en el que bajas concentraciones de progesterona afectan el desarrollo embrionario, se han realizado varias investigaciones. Mann *et al.* (1998) demostraron que el retraso en el incremento de las concentraciones de progesterona posterior a la ovulación, resulta en un desarrollo asincrónico del embrión, mientras que Lamming y Darwash (1995) bajo estas mismas condiciones encontraron una marcada disminución del porcentaje de concepción. El mismo grupo de investigadores demostraron que las concentraciones de progesterona en leche incrementan más de 3 ng/ml del día 4 a 5 postinseminación en vacas que resultaron gestantes en comparación con las que no gestaron (Darwash y Lamming, 1998). Por otro lado, Mann y Lamming (2001) mostraron que el retraso de un día (entre los días 4 a 5) en el aumento postovulatorio de las concentraciones de progesterona, tuvo como resultado la

recuperación de embriones de menor tamaño y que producen menor cantidad de interferón- τ en el día 16, mientras que la administración de progesterona durante la fase lútea temprana, favorece el desarrollo embrionario y la secreción de interferón- τ (Mann *et al.*, 2006).

La función lútea durante el diestro temprano se han relacionado con las características del folículo preovulatorio, así, se ha observado que las vacas que tienen bajas concentraciones de progesterona entre los días 4 a 5 del posteriores a la ovulación, presentan un incremento del intervalo entre la luteolisis y la ovulación, una disminución del diámetro del folículo, además de una reducción de las concentraciones de estradiol durante la fase folicular previa a la ovulación (Mann *et al.*, 2001; Wathes *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2005). Así, Robinson *et al.* (2005) quienes al promover la ovulación de folículos <10 mm (folículos pequeños) y >10 mm (folículos grandes), encontraron mayores concentraciones de progesterona entre los días 3 a 8 de las vacas que ovularon folículos grandes, lo que sugiere que las vacas con folículos preovulatorios grandes y fases foliculares de corta duración, producen cuerpos lúteos con mayor capacidad de producir progesterona.

Posiblemente durante el desarrollo de dichos folículos la frecuencia inadecuada de pulsos de LH afectó el desarrollo folicular y la función lútea. Starbuck *et al.* (2000) demostraron que las vacas con bajas concentraciones de progesterona posterior a la ovulación, tenían una frecuencia pulsátil de LH disminuida en el día 5 postovulación. Por otro lado se ha observado que LH estimula la síntesis del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) (Schams y Berisha, 2004) y que junto con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) participan en el proceso de angiogénesis del cuerpo lúteo (Fraser y Wulff, 2003) y es por esto que una secreción atenuada de LH puede afectar el proceso de angiogénesis. El crecimiento y desarrollo del cuerpo lúteo es extremadamente rápido y requiere de un proceso de angiogénesis de la misma magnitud, para cubrir las demandas de

oxígeno y nutrientes de esta glándula. En primates se ha observado que la inhibición del VEGF y del factor de crecimiento angiogénico, puede suprimir el crecimiento y ovulación del folículo preovulatorio (Fraser *et al.*, 2000; Hazzard *et al.*, 2002). Además, en la vaca se ha suprimido el desarrollo del cuerpo lúteo en estadios tempranos, por medio de la aplicación de anticuerpos contra VEGF (Kamada *et al.*, 2004).

También se ha evaluado la participación del sistema IGF en el desarrollo y función del cuerpo lúteo. Se ha reportado que la adición de IGF-I a cultivos de células lúteas bovinas, incrementa la síntesis de ADN y la secreción de progesterona (Schams *et al.*, 1988; Niswender *et al.*, 2000). Por otro lado, Green *et al.* (2007) demostraron que IGF-II también estimula la síntesis de progesterona en cultivos de células lúteas bovinas en el día 5 del ciclo. Esto coincide con los resultados de Yung *et al.* (1996) quienes encontraron un aumento en la expresión de RNAm de IGF-I entre los días 5 al 15 del ciclo estral en bovinos, en tanto que el IGF-II tuvo un comportamiento inverso, además sugieren que el sistema IGF potencia la capacidad de unión de LH a sus receptores lo que favorece el efecto luteotrópico de esta hormona.

Durante el balance energético negativo (BEN) se presentan alteraciones metabólicas que afectan la función lútea. De esta forma, se encuentran disminuidas las concentraciones plasmáticas de leptina (Kadokawa *et al.*, 2000; Liefers *et al.*, 2003), simultáneamente existe una disminución de insulina e IGF-I y un incremento en las concentraciones circulantes de hormona del crecimiento (Block *et al.*, 2003), y este ambiente metabólico y endocrino influyen en la secreción pulsátil de LH (Butler 2003).

Se ha observado que la secreción pulsátil de LH se encuentra alterada durante el BEN y esto se ha asociado, con una disminución en las concentraciones de IGF-I. Ya que IGF-I incrementa la respuesta celular a las gonadotropinas en células de la

granulosa (Gong *et al.*, 1994; Beam y Butler, 1998; Scaramuzzi *et al.*, 1999). Además, se ha reportado que la adición de IGF-I a cultivos de células lúteas de bovino incrementa la síntesis de ADN y la secreción de progesterona, mientras que *in vivo*, en novillas con BEN se observó un decremento en el desarrollo del cuerpo lúteo y disminución tanto de las concentraciones circulantes de IGF-I como del contenido de progesterona en el cuerpo lúteo (Rivera y Fortune, 2001). Este desequilibrio endocrino y metabólico puede afectar el desarrollo del folículo preovulatorio y la formación del cuerpo lúteo, lo que se refleja en una disminución en la capacidad de sintetizar progesterona durante el desarrollo embrionario.

2.1.5 Nutrición

Independientemente del efecto de los cambios metabólicos provocados por el balance energético negativo, las dietas ofrecidas a las vacas altas productoras también pueden afectar la fertilidad. Las dietas con contenidos de proteína cruda de 17 a 19 % llegan a afectar negativamente la fertilidad (Butler *et al.*, 1996); se ha demostrado que las vacas alimentadas de esta forma tienen altas concentraciones de urea en sangre y en los fluidos uterinos, lo cual afecta la viabilidad de los espermatozoides, óvulo y embrión (Elrod y Butler, 1993; Butler, 1998; Sinclair *et al.*, 2000; Melendez *et al.*, 2003).

Proveer todos los nutrimentos a las vacas con niveles altos de producción obliga a ofrecer dietas altas en energía, basadas en granos. Así, con frecuencia se presentan alteraciones subclínicas en el pH ruminal, lo cual se ha asociado con la baja fertilidad. Un factor de riesgo en la pérdida de gestaciones tempranas es la acidosis ruminal (Ortiz, 1997).

La semilla de algodón se utiliza en las dietas de las vacas bajo sistemas intensivos de producción. Esta semilla, además de ser una excelente fuente de energía, proteína y fibra, contiene altas concentraciones de gossipol. Esta sustancia es

altamente tóxica en especies monogástricas, sin embargo, el rumiante es relativamente resistente al gossipol debido a que este pigmento se inactiva en el rumen. Las dietas comunes ofrecidas a las vacas lecheras (10% de la MS) provocan concentraciones de gossipol en plasma dentro del margen de seguridad (<5 µg/ml de gossipol). Sin embargo, el uso de mayores cantidades de semilla de algodón y/o la utilización de variedades con mayor contenido de este pigmento (Pima), generan concentraciones plasmáticas de gossipol mayores (>5 µg/ml), las cuales afectan la fertilidad. Observaciones de Santos *et al.* (2003), en vacas lecheras con dietas que contenían semilla de algodón con mayor contenido de gossipol, mostraron una disminución significativa de la fertilidad.

2.1.6 Estrés calórico

El ganado lechero es altamente susceptible a las altas temperaturas, prueba de ello está en la reducción de la fertilidad cuando este ganado se encuentra en climas cálidos o durante la época del año con mayor temperatura. De esta manera, el porcentaje de concepción llega a ser menor a 40%, obtenido en los meses templados o fríos, hasta 15% durante el verano (Aréchiga y Hernández, 2007).

Los efectos del estrés calórico en la reproducción del ganado lechero se han incrementado en los últimos años, lo que ha coincidido con el incremento en la producción de leche (Wolfenson *et al.*, 2000). Se ha observado que el aumento en la producción de leche se refleja en un incremento de la generación de calor metabólico. Esta generación de calor se ha asociado con el incremento del peso vivo de las vacas lecheras. De esta forma, vacas más grandes tienen un aparato digestivo con mayor capacidad, lo que les permite consumir y digerir más alimento. Durante el metabolismo de los nutrientes se genera calor, el cual contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal, condición favorable en climas fríos. Sin embargo, en climas cálidos el calor se debe eliminar para mantener la temperatura corporal dentro de los rangos normales. La capacidad de

termorregulación de la vaca lechera es insuficiente, lo cual ocasiona un incremento de la temperatura rectal. En vacas en estrés calórico es común que la temperatura corporal alcance valores entre 39.5 a 41 °C (Hansen *et al.*, 2001).

El aumento de la temperatura corporal tiene efectos negativos en la reproducción. En México hay regiones en donde es evidente el efecto negativo del estrés calórico en la fertilidad, así, en las cuencas lecheras de Aguascalientes, Torreón, Chihuahua y Mexicali, se observa una reducción del porcentaje de concepción en los meses cálidos (Lozano, 2004). En otras regiones del centro del país como Querétaro, San Luis Potosí o Guanajuato, todavía no se observa una reducción de la fertilidad; sin embargo, dado que las vacas llevan una tendencia ascendente en la producción de leche y, en consecuencia, en la generación de calor, es posible que en los próximos años comience a ser evidente este fenómeno. Una reducción de la fertilidad durante el verano ya se observa en regiones de EU y Canadá, en donde hasta hace pocos años no era evidente dicho efecto (Kadzere *et al.*, 2002).

En condiciones *in vivo*, el estrés calórico durante los días 1 al 7 después del estro afecta el desarrollo embrionario en vacas superovuladas. *In vitro*, la exposición de los embriones a temperaturas equivalentes a la temperatura rectal de las vacas bajo estrés calórico (41 °C), disminuye la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Hansen *et al.*, 2001). La susceptibilidad de los embriones al estrés calórico disminuye conforme estos avanzan en su desarrollo (Edwards y Hansen, 1997). Así, los embriones de dos células son más susceptibles que los embriones en la etapa de mórula. Independientemente de la etapa del desarrollo en que los embriones son susceptibles al estrés térmico, el resultado final es un aumento de la muerte embrionaria. Por otro lado, el estrés calórico puede afectar el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación. Las altas temperaturas comprometen la capacidad de los embriones para producir cantidades suficientes de interferón- τ (Putney *et al.*, 1988).

Por otra parte, el efecto del estrés calórico no solo se observa durante los meses más calurosos, sino que también es evidente un efecto a largo plazo (efecto residual) ya que las vacas sometidas a estrés calórico mantienen afectada su función reproductiva aun después que terminó dicho estrés. Este efecto se puede explicar por el efecto negativo de las altas temperaturas en los ovocitos durante las diferentes etapas del desarrollo folicular (Roth *et al.*, 2001).

2.1.7 Estrés oxidativo

Las vacas lecheras altas productoras tienen un metabolismo intenso; bajo estas condiciones, aproximadamente 1-2% del oxígeno metabolizado se convierte en especies reactivas de oxígeno, las cuales dañan el ADN y las proteínas (Nockels, 1996). Las especies reactivas de oxígeno son removidas por sistemas bioquímicos presentes en las células y en los fluidos extracelulares, estos mecanismos se conocen como sistemas antioxidantes. Estos sistemas incluyen moléculas como el β -caroteno y la vitamina E, las cuales actúan a nivel de la membrana celular hidrolizando peróxidos para mantener la integridad de los fosfolípidos. En este mecanismo también participan enzimas como la glutatión peroxidasa, la cual es dependiente del selenio (Aréchiga *et al.*, 1998).

Un incremento en la generación de radicales libres puede superar a los mecanismos antioxidantes y comprometer la función celular; este problema es más drástico cuando existe una deficiencia en el consumo de sustancias antioxidantes. La producción excesiva de radicales libres puede afectar la fertilidad debido a que los tejidos esteroideogénicos del ovario, los espermatozoides y los embriones en etapas tempranas de desarrollo, son muy sensibles al daño causado por ellos (Aréchiga, 1999).

La suplementación con antioxidantes es una forma de enfrentar el problema de la baja fertilidad y en varios estudios, en los cuales se han administrado β -caroteno o

vitamina E y selenio, se ha mejorado la fertilidad (Aréchiga *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2009).

2.1.8 Detección de estros y momento de la inseminación artificial

La baja eficiencia en la detección de estros es la causa más importante de ineficiencia reproductiva en el ganado lechero. Este problema lo padecen todos los hatos lecheros en todo el mundo. En México se detecta, en el mejor de los casos, el 60% de las vacas en estro del total esperado y hay casos extremos en los cuales escasamente observan el 30% (Hernández *et al.*, 1994).

La mala detección de estros no sólo afecta la fertilidad a través de disminución del número de vacas inseminadas, sino que también lo hace mediante la alteración de la relación temporal entre el momento de la inseminación y el momento de la ovulación. Desde hace más de 50 años se ha aplicado el programa de inseminación am-pm y pm-am, lo que significa que las vacas que presentan el estro en la mañana son inseminadas en la tarde y las de la tarde se inseminan en la mañana siguiente (Trimberger, 1948). Este programa proporciona buenos resultados en fertilidad, siempre y cuando se cuente con una eficiente y precisa detección de estros. En condiciones deficientes en la detección de estros, no se sabe si la vaca observada en estro se encuentra en las primeras o en las últimas horas del periodo de aceptación. De tal forma que si se programa la inseminación 12 h después, es probable que se insemine cuando ya ocurrió la ovulación (inseminación tardía). Esta situación aumenta la probabilidad de encontrar óvulos viejos, ya que la viabilidad de estos es de 10 h; de esta forma, si un óvulo viejo es fertilizado, da origen a un embrión que muere en los siguientes días (Hunter, 1985). Otro error consiste en inseminar a las vacas cuando no están en estro; este problema es bastante frecuente y contribuye en forma significativa con la baja fertilidad en los hatos lecheros.

2.1.9 Condición corporal y fertilidad

Los sistemas de calificación de la condición corporal en el ganado lechero permiten hacer una apreciación del estado nutricional del animal, lo cual se logra mediante la estimación visual del porcentaje de grasa corporal. Los cambios en la condición corporal están correlacionados positivamente con las concentraciones séricas de insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y leptina; así, a mayor calificación de la condición corporal es mayor la concentración sérica de dichas hormonas, las cuales actúan principalmente como señales que llegan al hipotálamo e hipófisis y modifican la frecuencia de secreción de la GnRH y LH (Butler, 2000). También se sabe que estas hormonas actúan a nivel ovárico y embrionario.

La leptina es una hormona que se produce en las células del tejido graso y se ha propuesto como la señal más importante de los cambios de la condición corporal (Reist *et al.*, 2003). La transición del anestro a la ciclicidad coincide con un mejoramiento de la condición corporal y un incremento de las concentraciones de insulina, IGF-I y leptina. La insulina y el IGF-I estimulan el desarrollo folicular, la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario (Gutiérrez *et al.*, 1997ab; Armstrong *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002b; Sirisathien *et al.*, 2003). Además de los mensajes dados por las hormonas mencionadas, otras sustancias presentes en la sangre aportan información del estado corporal; por ejemplo, los ácidos grasos no esterificados y el β -hidroxibutirato son indicadores de la movilización y uso de la grasa corporal; así, el aumento de estas sustancias proporciona un mensaje negativo para la reproducción (Reist *et al.*, 2000).

La condición corporal no sólo afecta el inicio de la actividad ovárica posparto sino también el porcentaje de concepción. En algunos estudios (Santos *et al.* 2001, Riest *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2009) se ha encontrado que las vacas que ganan condición corporal en el periodo de espera voluntario, o bien, posterior al primer servicio, son más fértiles que las vacas que pierden condición corporal. El

mecanismo por el cual las vacas que ganaron condición corporal fueron más fértiles que las que perdieron, puede estar determinado por los efectos que tienen la insulina y el IGF-I en el desarrollo embrionario. El embrión bovino tiene receptores para la insulina e IGF-I (Izadyar *et al.*, 2000) y en condiciones *in vitro* la adición de IGF-I al medio, incrementa la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Moreira *et al.*, 2002b). La insulina en condiciones *in vitro* previene la apoptosis, favorece el desarrollo embrionario (Butler, 2000), y estimula la proliferación y función esteroidogénica en las células de la granulosa y de la teca (Ayalon, 1978). En estudios *in vivo* la administración de insulina mejora la función lútea (Simpson *et al.*, 1994) y el porcentaje de concepción en vacas repetidoras (Selvaraju *et al.*, 2002).

En un estudio (Ortega *et al.*, 2006) se encontró que un incremento en las concentraciones de insulina provocado por la administración oral de una sustancia glucogénica (glicerol) durante los primeros días siguientes al servicio aumentó el porcentaje de concepción en vacas Holstein [Glicerol (47.4%) vs Testigo (31.6) (P<0.05)].

2.1.10 Quistes ováricos

Los quistes foliculares (QF) son la patología ovárica más frecuente en el ganado bovino lechero y provocan pérdidas económicas debido al retraso del periodo del parto al primer servicio, por el costo de los tratamientos y por el riesgo de que las vacas sean desechadas. La incidencia de los QF ha aumentado conforme se ha intensificado la producción de leche. Así, entre 5 y 30% de las vacas desarrollan esta patología en los primeros 60 días posparto; sin embargo, cerca de 60% de ellas se recupera espontáneamente (López-Gatius *et al.*, 2002). Los signos clínicos de las vacas con QF descritos en la literatura son: ninfomanía, ciclos cortos, masculinización y relajamiento de los ligamentos pélvicos. Actualmente una alta proporción de las vacas con QF muestran anestro.

Durante muchos años se definió un quiste folicular como un folículo de un diámetro de 2.5 mm, que está presente en uno o en ambos ovarios durante un mínimo de 10 días, en ausencia de un cuerpo lúteo (Garverik, 1997). Los conocimientos actuales han modificado el concepto clásico; así, no todos los QF tienen un diámetro de 2.5 mm; además, algunos pueden persistir más de 10 días, pero otros son estructuras dinámicas las cuales sufren regresión y pueden ser sustituidos por nuevos QF. Por tal motivo, la definición más acertada de un QF es: un folículo de un diámetro de al menos 20 mm, que está presente en uno o en ambos ovarios en la ausencia de tejido lúteo y que interfiere con el ciclo estral normal.

La patogénesis de los QF no se conoce. Se propone que las vacas que desarrollan QF tienen una anomalía en los mecanismos de retroalimentación entre el hipotálamo y la hipófisis en conjunción con una disfunción a nivel folicular (Isobe, 2006).

Durante el proestro de un ciclo estral normal, el folículo dominante se desarrolla hasta alcanzar su estado preovulatorio, lo cual es apoyado por un incremento en la frecuencia de los pulsos de secreción de LH. En esta fase, el folículo secreta concentraciones altas de estrógenos, los cuales retroalimentan positivamente al hipotálamo para que ocurra la secreción preovulatoria de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y en consecuencia de LH. Después del pico preovulatorio de LH ocurre la ruptura y salida del ovocito (ovulación) y la subsiguiente formación del cuerpo lúteo (luteinización). Se propone que en las vacas con QF, el pico preovulatorio de LH no ocurre o es de menor amplitud, o no tiene una relación sincrónica con la maduración del folículo, lo cual ocasiona la falla ovulatoria. La alteración en la secreción de LH puede obedecer a falta de sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación positiva de los estrógenos.

También se señala que algunas anomalías a nivel folicular tales como alteraciones en la síntesis de hormonas esteroides y una menor sensibilidad a la

LH, pueden contribuir con la patogenia. Una vez que se ha establecido el QF, se ha propuesto que un incremento en la frecuencia de secreción pulsátil de LH contribuye con la persistencia de ésta patología (Isobe, 2006).

Existen factores que están asociados con el desarrollo de los QF, los cuales, de acuerdo con la patogenia propuesta, pueden influir a nivel del eje hipotálamo-hipofisiario y ovárico. Los QF ocurren principalmente durante la transición del anestro posparto a la ciclicidad. En este periodo las vacas se encuentran en balance energético negativo (BEN). Se ha observado una asociación entre la profundidad del BEN y el tiempo posparto en que ocurre el nadir del BEN, con la incidencia de QF. Así, las vacas que padecen un BEN más grave tienden a presentar una incidencia mayor de QF. Por otra parte, hay una correlación positiva entre la producción de leche y la incidencia de QF, lo que indica que las vacas que producen más leche tienen mayor riesgo de padecer QF (López-Gatius *et al.*, 2002). También existen otros factores asociados con la incidencia de QF tales como, estrés, genéticos, infecciones uterinas, estrés calórico y presencia de fitoestrógenos en la dieta.

La presentación de quistes ováricos disminuye en forma significativa la proporción de vacas gestantes en el día 90 posparto (Tixi *et al.*, 2009a). En éste estudio es evidente la reducción del porcentaje de vacas gestantes en el día 90 posparto [Quistes (11.4%) vs Sin Quistes (38.6) ($P < 0.007$)].

2.1.11 Intervalos entre servicios

La evaluación de los intervalos entre servicios permite identificar problemas relacionados con la eficiencia y precisión en la detección de estros. Después de la inseminación artificial se espera que las vacas no gestantes regresen en estro en un periodo equivalente a la duración de un ciclo estral normal; sin embargo, algunas lo hacen en periodos diferentes. Los intervalos se clasifican en: normales (18–24 días; deseable >60%), cortos (≤ 17 días; deseable <10%), largos (25-35

días; deseable <10%), dobles (36-48 días; deseable <10%) y de más de 48 días (deseable 0%) (Ortiz y Hernández, 2007). En un estudio reciente (Tixi *et al.*, 2009b) se determinó la proporción de vacas con diferentes intervalos entre servicios y se comparó el porcentaje de concepción obtenido en las inseminaciones realizadas con diferentes intervalos. Se utilizaron registros reproductivos de 1412 vacas (3154 lactaciones). El porcentaje de concepción fue menor en las vacas con intervalos entre servicios cortos (30%), largos (29.9%) y dobles (32.5%) en comparación con las vacas con intervalos normales (37.3%) y mayores de 48 días (34%). La elevada proporción de vacas con intervalos entre servicios anormales (66.5%) indica graves deficiencias en la detección de estros.

2.1.12 Mastitis y fertilidad

La mastitis en la vaca no solo ocasiona pérdidas económicas por el costo de los tratamientos, eliminación de la leche, disminución de la producción y calidad de la leche, aumento de la tasa de desechos, sino también por su efecto que tiene en la fertilidad. Existen diferentes estudios que han demostrado una correlación negativa entre mastitis y fertilidad. Así, las vacas que tuvieron mastitis clínica antes del primer servicio, y entre el primer servicio y el diagnóstico de gestación fueron menos fértiles que las vacas sanas (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004). Asimismo, las vacas que padecieron mastitis clínica, entre la inseminación y el diagnóstico de gestación, tuvieron mayor riesgo de perder la gestación entre los días 31 a 45 (Chebel *et al.*, 2004). El mecanismo por el cual la mastitis clínica afecta la fertilidad se desconoce, sin embargo, se proponen diferentes posibilidades, todas ellas fundamentadas en investigaciones realizadas en condiciones *in vivo* e *in vitro*: el incremento de la temperatura secundario a la mastitis puede afectar la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario, tal y como ocurre en vacas expuestas a estrés calórico (Edwards y Hansen, 1997; Krininger *et al.*, 2002); las sustancias producidas por las células durante el proceso inflamatorio (citocinas y prostaglandina F₂α) afectan la maduración de los ovocitos

y disminuyen la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Hockett *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2003; Waller *et al.*, 2003); las citocinas promueven la liberación de cortisol, el cual afecta la secreción de la LH (Li *et al.*, 1983; Padmanabhan *et al.*, 1983); la prostaglandina F2 α (liberada durante el proceso infeccioso) puede ocasionar luteolisis, lo que podría explicar la mayor incidencia de abortos en vacas con mastitis. La disminución de la fertilidad no sólo se observa en las vacas que padecen mastitis en forma clínica sino también en aquellas que la presentan de manera subclínica. Las vacas que padecieron mastitis subclínica antes de la inseminación tuvieron mayor riesgo de perder la gestación entre los días 28 a 45 (McDougall *et al.*, 2005). La mastitis subclínica afecta la síntesis de estradiol en los folículos y el intervalo del estro a la ovulación (Wolfenson *et al.*, 2009), lo cual podría ocasionar una asincronía entre la inseminación y el momento de la ovulación.

2.2 Tratamientos enfocados en disminuir la mortalidad embrionaria

2.2.1 Tratamiento con GnRH posinseminación

Existen diversos tratamientos a nivel de campo para mejorar la fertilidad, estos tienen como objetivo disminuir la mortalidad embrionaria, sin embargo, debido a que la etiología de la falla en la concepción es diversa, los resultados en estos tratamientos son inconsistentes.

La eficiencia del tratamiento con GnRH (o análogos sintéticos) sobre el mejoramiento de la fertilidad de vacas repetidoras ha sido extensamente estudiado en los últimos años. La eficiencia del tratamiento con GnRH al momento de la inseminación puede estar relacionada con el momento de la ovulación, la luteinización y la capacidad de secretar progesterona por el cuerpo lúteo (Kharche y Srivastava, 2007). Gustafsson *et al.* (1986) encontraron que las novillas repetidoras presentaban un atraso en el momento de la liberación del pico preovulatorio de LH y una menor cantidad de LH secretada, y como consecuencia

se incrementaba el intervalo entre la presentación del estro y la ovulación, y esta condición reduce la fertilidad. McDougall *et al.* (1995) también confirmaron que un incremento en las concentraciones de LH puede ser inducido por el tratamiento con GnRH y de esta forma corregir los problemas de ovulación retardada.

Otro manejo de rutina en los hatos lecheros es la aplicación de GnRH en la mitad del ciclo (entre los días 11 a 14) posterior a la inseminación. La administración de GnRH durante el ciclo estral tiene como resultado un incremento en la liberación de LH (McDougall *et al.*, 1995) esto causa la ovulación y/o luteinización de los folículos dominantes presentes en el ovario, de esta forma se sincroniza el reclutamiento de una nueva oleada folicular, y es posible que se alargue la fase lútea, o bien que durante los días que se lleva a cabo el reconocimiento materno de la gestación, no exista un folículo con la capacidad de sintetizar estrógenos que contribuyan al mecanismo de luteolisis (Díaz *et al.*, 1998). Además, no se ha demostrado que exista una respuesta negativa de la aplicación de GnRH sobre la síntesis de prostaglandinas que afecten el cuerpo lúteo espontáneo o inducido (Twagiramungu *et al.*, 1995). Numerosos estudios han evaluado el efecto de la aplicación de GnRH en los días 11 a 14 posinseminación sobre la fertilidad. Esto llevó a Peters *et al.* (2000) a realizar un meta-análisis de los trabajos publicados, y concluyeron que de acuerdo con el riesgo relativo, la probabilidad de que una vaca quedara gestante incrementaba por un factor de 1.33 ($P < 0.01$) en vacas tratadas con GnRH entre los días 11 a 14 posinseminación.

La aplicación de GnRH también se puede realizar en el día 5 posinseminación, lo que provoca la ovulación y/o luteinización del folículo dominante de la primera oleada folicular y la formación de un cuerpo lúteo accesorio, de esta forma se incrementa las concentraciones sanguíneas de progesterona, se alarga la fase lútea y mejora la fertilidad. Sin embargo, la cantidad de estudios realizados es limitada y los resultados son inconsistentes (Howard *et al.*, 2006). Peters (2005) encontró en varios estudios un aumento global del 18% en el porcentaje de

concepción en vacas repetidoras que eran tratadas con GnRH. No obstante, los resultados de estos estudios son inconsistentes y esto puede ser debido a condiciones particulares de manejo de cada hato.

2.2.2 Administración de progesterona

La progesterona tiene un papel clave durante el desarrollo embrionario, ya que estimula la producción de secreciones endometriales necesarias para el crecimiento del embrión (Geisert *et al.*, 1992), así, bajas concentraciones de dicha hormona se han relacionado con pérdidas embrionarias durante los primeros 16 días posinseminación, pobre desarrollo embrionario, y bajas concentraciones de interferón- τ (Mann y Lamming, 2001), mientras que la suplementación con progesterona mejora el desarrollo del embrión; sin embargo, los resultados en fertilidad son inconsistentes.

En diferentes estudios se ha suplementado progesterona con resultados variables. En un meta-análisis realizado por Mann y Lamming (1999), de diferentes estudios en los cuales se suplementó progesterona en diferentes días posinseminación, encontraron que cuando el tratamiento con progesterona comienza seis días posterior al servicio, no existe un efecto en el porcentaje de concepción, sin embargo cuando el tratamiento inicia antes del día seis se observa un aumento de 10% en el porcentaje de concepción. Además, si la tasa de concepción inicial es baja (<50%), el tratamiento con progesterona incrementa hasta un 19% el porcentaje de concepción; sin embargo, cuando el porcentaje de concepción es alto (>50%) no se observa ningún efecto. Los autores concluyen que la suplementación temprana con progesterona en vacas con baja fertilidad mejora significativamente la tasa de concepción, una posible explicación a esto es que las vacas con baja fertilidad tienen un incremento posovulatorio de progesterona insuficiente lo que compromete el desarrollo del embrión, el cual es incapaz de secretar interferón- τ en cantidades adecuadas y no se establece el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación.

2.2.3 Papel de la Gonadotropina Coriónica Humana en la reproducción

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona que químicamente pertenece a la familia de las glicoproteínas (Pierce y Parsons, 1981). Estas hormonas son heterodímeros compuestos por una subunidad alfa y una beta; la alfa es común entre las glicoproteínas, y es producida por un mismo gen, mientras que la subunidad beta de hCG es codificada por genes diferentes y es la que le da la especificidad (Policastro *et al.*, 1983; Fiddes y Talmadge, 1984; Bo y Boime, 1992). La hCG tiene una actividad similar a la LH y comparten más del 80% de la misma secuencia de aminoácidos. La subunidad beta de hCG y LH tienen 145 y 121 aminoácidos de longitud respectivamente, además los oligosacáridos terminales de la subunidad beta de hCG contienen ácido siálico, mientras que los oligosacáridos de LH contienen sulfato. La presencia de sulfato disminuye dramáticamente la vida media de LH en comparación con hCG, así el ácido siálico es el factor que aumenta la vida media de hCG (Muyan y Boimea, 1997).

La hCG tiene una actividad similar a la LH y ocupa los receptores para LH en la membrana de las células del cuerpo lúteo, activa segundos mensajeros y aumenta la síntesis de progesterona (Santos *et al.*, 2001), y en el ganado bovino ha sido utilizado para mejorar la fertilidad ya que puede incrementar la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo (Nishigai *et al.*, 2001), formar un cuerpo lúteo accesorio que incrementa las concentraciones circulantes de dicha hormona (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz, *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001) y también promueve el recambio folicular (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001), que alarga la duración de la fase lútea.

2.2.3.1. Formación de cuerpo lúteo accesorio

El tratamiento con hCG en los días 4 a 7 del ciclo induce la ovulación de la primera oleada folicular y la formación de un cuerpo lúteo accesorio. Nishigai *et al.* (2001) demostraron que después de aplicar hCG en el día 5, las concentraciones

circulantes de progesterona, se incrementaban a las 6, 24 y 48 horas posteriores a la aplicación, y esto se atribuye a que la hCG puede tener efecto sobre el cuerpo lúteo existente. En vacas a las cuales se han tratado con hCG durante la primera oleada folicular, se ha observado un aumento en el volumen lúteo total tres días después del tratamiento (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001) lo que sugiere que la formación del cuerpo lúteo accesorio se da en este periodo, y esto también coincide con un incremento en las concentraciones circulantes de progesterona.

Díaz *et al.* (1998) al tratar vacas con hCG en el día 5 del ciclo, encontraron un aumento en las concentraciones plasmáticas de progesterona de los días 8 a 17, y las máximas concentraciones se presentan en el día 15. El diámetro del cuerpo lúteo inducido fue menor en comparación con el espontáneo y el inicio en la regresión de los cuerpos lúteos es simultáneo. El tratamiento con hCG no modificó el diámetro del cuerpo lúteo espontáneo, sin embargo, si aceleró su patrón de crecimiento (Díaz *et al.*, 1998).

La aplicación de GnRH en el día 5 del ciclo, también promueve la formación de un cuerpo lúteo accesorio, sin embargo, Schmitt *et al.* (1996b) aplicaron GnRH o hCG en novillas y encontraron diferencias en las características de los cuerpos lúteos formados por ambos tratamientos. En el grupo tratado con hCG los cuerpos lúteos accesorios fueron más pesados que los inducidos por GnRH, además el cuerpo lúteo original no difirió entre grupos. Las concentraciones circulantes de progesterona fueron mayores del día 6 al 13 en el grupo tratado con hCG en comparación con las vacas tratadas con GnRH. En este mismo estudio se incubaron los cuerpos lúteos accesorios y fueron analizados, así, se encontró que las células lúteas de las novillas tratadas con hCG producían mayor cantidad de progesterona que las tratadas con GnRH, y esto fue atribuido a que en las novillas tratadas con hCG, los cuerpos lúteos tuvieron en promedio más células chicas en el día 13. Además, al realizar microscopía electrónica de las células lúteas

encontraron que la aplicación de hCG o GnRH retrasa la involución de las células esteroidogénicas. Estos resultados indican que el aumento de las concentraciones de progesterona es debido en mayor parte a la formación del cuerpo lúteo inducido.

2.2.3.2 Cambio en la dinámica folicular

En la mayoría de los ciclos estrales en el bovino (> 95%) se presentan dos o tres oleadas foliculares (Savio *et al.*, 1988; Sirois y Fortune, 1988; *et al.*, 2008). En ambos patrones de ciclos (dos o tres oleadas), la emergencia de la primera oleada folicular ocurre en el día de la ovulación. La emergencia de la segunda oleada ocurre en el día 9 o 10 en los ciclos de dos oleadas, o en los días 8 o 9 en los ciclos de tres oleadas; mientras que la emergencia de la tercera oleada se presenta en los días 15 o 16 del ciclo. En el diestro, los folículos dominantes sufren atresia, debido al efecto de retroalimentación negativa de la progesterona sobre la liberación de GnRH y LH. El inicio de la luteolisis se presenta aproximadamente en el día 16 o en el día 19 en los ciclos de dos o tres oleadas respectivamente; esto cambia la duración del ciclo resultando en ciclos de 19-20 y 22-23 días (Adams *et al.*, 2008).

La inducción de la ovulación del folículo dominante de la primera oleada folicular, promueve el incremento en las concentraciones de FSH, esto permite el reclutamiento de folículos antrales (Badinga *et al.*, 1992) y la emergencia temprana de la segunda oleada. En diferentes estudios, se ha observado que en la segunda oleada folicular de las vacas tratadas con hCG presentan un folículo dominante de menor tamaño y que ejerce menor tiempo de dominancia (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001), lo que se atribuye al aumento en las concentraciones plasmáticas de progesterona presentes en el grupo tratado con hCG, lo que provoca la reducción en la secreción de LH, y como resultado una disminución en el crecimiento del folículo dominante (Díaz *et al.*, 1998). En diferentes trabajos se ha observado que el periodo de selección del

folículo dominante es similar en el grupo tratado con hCG y el testigo. Sin embargo, la duración de la segunda oleada es más corta en el grupo hCG y también el tiempo que ejerce dominancia el folículo dominante de la segunda oleada (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001). Díaz *et al.*(1998) observaron una emergencia temprana de la tercera oleada folicular en las vacas tratadas con hCG en comparación con el grupo testigo (día 14.7 vs 18.2) y la duración del periodo de selección del folículo dominante fue similar en ambos grupos (3.7 días).

La presencia de dos o tres oleadas foliculares posterior a la inseminación puede ser un factor que regule la fertilidad; ya que los días en los que se presenta un folículo preovulatorio difiere en vacas con dos o tres oleadas foliculares (13.5 vs 17.7 d respectivamente). Debido a que el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación ocurre entre los días 15 a 17, las vacas inseminadas con tres oleadas foliculares tienen mayores probabilidades de rescatar el cuerpo lúteo (Díaz *et al.*, 1998). Además, en diferentes estudios las vacas tratadas con hCG tienen un aumento en promedio de un día en la duración del ciclo (Sianangama y Rajamahendran, 1996; Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001), aunque este aumento no ha sido estadísticamente significativo. Sin embargo, el alargamiento de la fase lútea puede influir en la fertilidad, permitiendo así que los embriones establezcan el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación.

2.2.3.3 Uso de hCG en el tratamiento de la infertilidad

En diferentes estudios se ha evaluado el efecto de hCG en la fertilidad y función lútea. Santos *et al.* (2001) aplicaron 3300 UI de hCG en vacas lecheras 5 días después de la inseminación; en este estudio se observó que una mayor proporción de vacas tratadas con hCG presentó más de un cuerpo lúteo comparado con el grupo testigo. Las concentraciones plasmáticas de progesterona aumentaron en las vacas tratadas con hCG y el porcentaje de concepción en los días 28, 42, y 90 fueron mejorados por el tratamiento con hCG.

En ganado de carne también se ha evaluado dicho tratamiento. Nishigai *et al.* (2002) aplicaron 1500 UI de hCG en el día 6 del ciclo a vacas receptoras de transferencia embrionaria; en este estudio se observó un porcentaje de concepción mayor (67.5%, $P < 0.05$), en las vacas tratadas con hCG, en comparación con el grupo testigo (42.5%); pero no se encontró diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de progesterona.

La vida media de la hCG es mayor que la de GnRH, y puede persistir por mayor tiempo en la circulación. Stevenson *et al.* (2007) compararon los tratamientos entre GnRH, hCG y CIDR y evaluaron las concentraciones plasmáticas de progesterona, la formación de cuerpos lúteos accesorios, volumen total de los cuerpos lúteos, y el porcentaje de concepción en vacas Holstein en lactación. Los tratamientos se aplicaron entre los días 4 a 9 posinseminación, y el CIDR se retiró 7 días después de su inserción intravaginal. En este estudio se observó que el tratamiento entre los días 4 a 9 posinseminación con GnRH o hCG induce la ovulación e incrementa el número de cuerpos lúteos, sin embargo el volumen total del cuerpo lúteo sólo incrementa con el tratamiento con hCG, no así con la aplicación de GnRH. Solo se encontró un incremento en las concentraciones de progesterona en las vacas tratadas con hCG. Los porcentajes de concepción tienden a incrementarse en el grupo tratado con CIDR, mientras que el tratamiento con hCG incrementa el porcentaje de concepción, pero solo en algunos establos donde se llevó a cabo el experimento. Además, de estos estudios también se han realizado trabajos en vaquillas lecheras de reemplazo (Schmitt *et al.* 1996b), vacas lecheras (Walton *et al.*, 1990; Schmitt *et al.* 1996b; Chagas e Silva y Lopes da Costa, 2005; Hanlon *et al.*, 2005; Galvao *et al.*, 2006; Shams-Esfandabadi *et al.*, 2007; Fischer-Tenhagen *et al.*, 2008) y novillas de carne (Funston *et al.*, 2005) y no se han encontrado resultados favorables en fertilidad. Esta falta de repetibilidad (Cuadro 1) indica que hay factores particulares de los hatos estudiados que determinan el éxito de dicho tratamiento.

Cuadro 1. Porcentaje de concepción de diferentes estudios donde se aplicó hCG en distintos días posterior a la IA.

Día de inicio del Tratamiento	Porcentaje de Concepción Testigo	Porcentaje de Concepción hCG	Diferencia porcentual	Referencia
-4, 4	55 (n=12)	92 (n=12)	37%	Breuel <i>et al.</i> , 1989
4	59 (n=51)	55 (n=60)	-4.0%	Breuel <i>et al.</i> , 1990
5	57 (n=22)	57 (n=22)	0.0%	Walton <i>et al.</i> , 1990
7	37.5 (n=8)	77 (n=9)	39.0%	Rajamahendran y Sianangama, 1992
7	40 (n=19)	62 (n=20)	22.0%	Sianangama y Rajamahendran, 1992
5	62.9 (n=112)	64.8 (n=131)	1.9%	Schmitt <i>et al.</i> , 1996b
5	38.7 (n=234)	45.8 (n=245)	7.1%	Santos <i>et al.</i> , 2001
7	35 (n=57)	39 (n=64)	4.0%	Chagas e Silva y Lopes da Costa, 2005
5	43.6 (n=220)	46.3 (n=222)	2.7%	Hanlon <i>et al.</i> , 2005
6	59 (n=90)	62 (n=90)	3.0%	Funston <i>et al.</i> , 2005
5	31.8 (n=66)	34.8 (n= 69)	3.0%	Galvao <i>et al.</i> , 2006
5	35.2 (n=88)	27.5 (n=70)	-7.7%	Shams-Esfandabadi <i>et al.</i> , 2007
4	Ovsynch 35.0 (n=123)	Ovsynch-hCG 35.4 (n=127)	0.4%	Fischer-Tenhagen <i>et a.</i> , 2008
	PG 38.0 (n=308)	PG-hCG 37.0 (n=300)	-1.0%	
5	Ovsynch 32.8 (n=116)	Ovsynch-hCG 40.2 (n=112)	7.4%	Shabankareh <i>et al.</i> , 2009
	Heatsynch 24.8 (n=129)	Heatsynch-hCG 41.5 (n=123)	16.7%	
	Control 34.4 (n=93)	Control-hCG 48.9 (n=94)	14.5%	

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Manejo de los animales

El presente estudio se realizó en un hato lechero ubicado en el municipio de Francisco I. Madero, estado de Coahuila, a 103° 16' latitud norte y 24° 46' longitud oeste, a 1100 msnm (García, 1988). El estudio se realizó en un periodo de 5 meses (de Febrero a Julio del 2008). El hato está compuesto por 6000 vacas Holstein-Friesian en producción, las cuales se ordeñan dos veces al día y tienen una producción láctea promedio de 11 700 kg por lactación. Las vacas fueron alimentadas tres veces al día con una dieta integral compuesta por ensilado de maíz, maíz rolado, heno de alfalfa, pasta de soya, semilla de algodón, cáscara de soya, remolacha, harina de sangre, premezcla mineral, grasa de sobrepaso y levadura; los porcentajes de inclusión de los ingredientes variaban de acuerdo al nivel de producción y la ración se elaboró de acuerdo a las recomendaciones del National Research Council (2001).

En el día 25 posparto todas las vacas iniciaron un tratamiento de tres inyecciones de 625 µg de Cloprostenol sódico (Celosil, Intervet Schering-Plough Animal Health, Inc) con un intervalo de doce días entre cada inyección. Las vacas que no manifestaban signos de estro en el día 60 posparto iniciaban el protocolo Ovsynch para inseminación a tiempo fijo. Las vacas seleccionadas para ser inseminadas fueron aquellas que presentaron aumento en la actividad locomotora medida por medio de podómetro o aquellas que eran sometidas al protocolo de Ovsynch. Se siguió el esquema de inseminación am-pm/pm-am. En todos los casos se evaluó la presencia de tono uterino y moco cervical.

3.2 Tratamientos

Se utilizaron 989 vacas de diferente paridad, y diferente número de servicios. En el día 5 posinseminación las vacas fueron asignadas al azar a dos tratamientos: 1) hCG (n= 482), las vacas recibieron por vía intramuscular 3500 UI de hCG (Chorulon, Intervet Schering-Plough Animal Health, Inc); 2) Testigo (n= 507), las vacas recibieron 3.5 ml de solución salina fisiológica. En el día 30

posinseminación se determinó el número de cuerpos lúteos y se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía (Agroscan AL equipado con un transductor de 5.0 MHz; Noveko International Inc, Francia); se consideró a una vaca como gestante cuando se observó la vesícula amniótica y el embrión viable (presencia de latido cardíaco embrionario). En el día 60 se realizó un segundo diagnóstico de gestación por palpación rectal. Se registró la condición corporal (escala 1-5) en el día de la IA (día 0) y en el día 30 en ambos grupos. Los cambios registrados fueron divididos en tres categorías: las vacas que ganaron condición corporal (≥ 1 punto), las que mantuvieron (las vacas que ganaron o perdieron 0.5 punto o menos) y las que perdieron condición corporal (≤ 1 punto).

En los días 5, 11 y 15 posinseminación, en 15 vacas de cada grupo se obtuvieron muestras sanguíneas en tubos al vacío con EDTA sódico (Becton Dickinson Vacutainer Systems Franklin Lakes, NJ, USA) para la determinación de progesterona plasmática. Las muestras fueron colocadas inmediatamente en refrigeración, y posteriormente se centrifugaron a 2000 xg por 20 minutos para la separación del plasma, el cual se conservó en congelación (-20 °C) hasta el día de su análisis.

3.3 Radioinmunoensayo

La determinación de progesterona plasmática se realizó por medio de un estuche comercial para radioinmunoensayo (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). El coeficiente de variación intraensayo fue 8.32% y la sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng mL⁻¹.

3.4 Análisis estadístico

Se determinó la contribución relativa de cada factor en la probabilidad de gestación por métodos de regresión logística. Con el paquete estadístico JMP7 (JMP, Release 7. 2007 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) se realizó una regresión logística por pasos hacia atrás de acuerdo a lo descrito por Hosmer y Lemeshow (1989). Las variables fueron continuamente removidas del modelo

tomando como criterio el estadístico de Wald, si la significancia era mayor a 0.20. El modelo inicial incluyó: efecto del tratamiento (hCG/testigo), número de servicios (1, 2, 3, ≥ 4), días en leche (variable continua), puerperio (normal/anormal), producción láctea promedio (variable continua), paridad (primípara/multípara), cambio en condición corporal (gana/mantiene/pierde), tipo de estro (natural/ovsynch/PGF2 α), y las interacciones de las variables explicativas con el efecto del tratamiento.

El modelo final incluyó las variables: cambios en condición corporal y la interacción de hCG por número de servicio. Se realizó la regresión logística nominal y se obtuvo el riesgo relativo y el intervalo de confianza al 95% de Wald (Hosmer y Lemeshow, 1989).

Posteriormente se analizó con pruebas de Ji-cuadrada (Wayne, 2002) el porcentaje de concepción por número de servicio (1, 2, 3, ≥ 4) y por cambio de condición corporal (gana/mantiene/pierde) por número de servicio (1, ≥ 2).

4. RESULTADOS

Las 989 vacas utilizadas en el estudio promediaron (media \pm error estándar) 91 \pm 37.5 días en leche, 42.2 \pm 9.2 kg de producción láctea y 2.3 \pm 1.3 partos. El porcentaje de concepción fue mayor en el día 30 posinseminación (47.5% vs 37.5%; $P < 0.0014$), y 60 (41.1% vs 31.6%; $P < 0.0018$) en el grupo tratado con hCG. Sin embargo, el número de servicios afectó la respuesta al tratamiento con hCG (Cuadro 2); las vacas de primer servicio tratadas con hCG tuvieron un aumento en el porcentaje de concepción en el día 30 (55.9% vs 41.0%; $P < 0.015$) y 60 (45.2% vs 33.1%, $P < 0.015$), sin embargo este efecto no se observó en las vacas con dos o más servicios ($P > 0.2$).

Cuadro 2. Porcentaje de concepción a 30 y 60 días en vacas tratadas con hCG al día 5 posinseminación agrupadas por número de servicio.

Días Post IA	Tratamiento	Primer Servicio	Segundo Servicio	Tercer Servicio	Cuarto Servicio
Día 30	hCG	55.9% ^a (100/179)	43.4% ^a (66/152)	42.6% ^a (40/94)	40.4% ^a (23/57)
	Control	41.0% ^b (73/178)	38.2% ^a (58/152)	36.0% ^a (36/100)	29.9% ^a (23/77)
Día 60	hCG	45.3% ^a (81/179)	39.5% ^a (60/152)	38.3% ^a (36/94)	36.8% ^a (21/57)
	Control	33.2% ^b (59/178)	33.6% ^a (51/152)	27.0% ^a (27/100)	29.9% ^a (23/77)

^{a, b} Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística ($P < 0.05$).

En el análisis de regresión logística no se encontró efecto del promedio de producción láctea, días en leche, paridad, puerperio y tipo de estro. Los cuadros 3 y 4 muestran el porcentaje de concepción y el riesgo relativo de las variables incluidas en el modelo final. Se encontró una interacción entre el efecto del tratamiento y el número de servicio sobre la fertilidad. Basado en el

riesgo relativo la probabilidad de gestación en el día 30 aumenta en un 80% cuando el tratamiento con hCG se aplica en el primer servicio ($P<0.0018$), y este efecto no se observa en los servicios 2, 3, ≥ 4 . Los resultados del diagnóstico de gestación en el día 60 indican que la probabilidad de gestación aumenta en un 70% cuando el tratamiento con hCG se aplica en el primer servicio ($P<0.0016$).

Basado en el riesgo relativo, la probabilidad de que una vaca esté gestante en el día 30 aumenta 80 y 40% ($P<0.0001$ y $P<0.014$) cuando esta gana o mantiene condición corporal, en comparación cuando pierde condición corporal en los 30 días siguientes a la IA (Cuadro 3). La probabilidad de que una vaca esté gestante en el día 60 aumenta 80 y 30% ($P<0.0001$ y $P<0.014$) cuando la vaca gana o mantiene condición corporal en el mismo periodo (Cuadro 4).

Cuadro 3. Riesgo relativo de gestación en vacas tratadas con hCG de acuerdo al cambio en condición corporal y número de servicio que influyen en el porcentaje de concepción al día 30.

Variables Independientes	Clasificación	n	% Concepción	Riesgo Relativo	IC 95% ¹	Significancia
Cambio en Condición Corporal	Gana	294	63.6	1.8	1.5-2.3	<0.0001
	Mantiene	112	60.7	1.4	1.1-1.9	0.014
	Pierde	583	28.1	Ref.*		
Interacción hCG*Número de Servicio	1	179	55.9	2.0	1.3-3.1	0.0018
	2	152	43.4	1.1	0.9-1.4	0.40
	3	94	42.6	0.8	0.6-1.1	0.18
	4	57	40.4	Ref.*		

*Valor de referencia

¹ Intervalo de Confianza al 95%

Cuadro 4. Riesgo relativo de gestación en vacas tratadas con hCG de acuerdo al cambio en condición corporal y número de servicio que influyen en el porcentaje de concepción al día 60.

Variables Independientes	Clasificación	n	Porcentaje Concepción	Riesgo Relativo	IC 95%	Significancia
Cambio en Condición Corporal	Gana	294	56.5	1.8	1.2-2.3	<0.0001
	Mantiene	112	49.1	1.3	0.7-1.7	0.014
	Pierde	583	23.5	Ref.		
Interacción hCG*Número de Servicio	1	179	45.3	1.7	1.1-2.7	0.016
	2	152	39.5	1.1	0.9-1.3	0.45
	3	94	38.3	0.9	0.7-1.3	0.78
	4	57	36.8	Ref.		

*Valor de referencia

¹ Intervalo de Confianza al 95%

Al reagrupar las vacas por tratamiento, número de servicio y condición corporal (Cuadro 5), se observó diferencia significativa en los porcentajes de concepción sólo en las vacas tratadas con hCG de primer servicio que pierden condición corporal en comparación con el grupo testigo [hCG (43.3%) vs. testigo (24.1%) (P<0.003)].

Cuadro 5. Porcentaje de concepción a 30 días en vacas tratadas con hCG que ganan, mantienen o pierden condición corporal, del momento de la IA al diagnóstico de gestación.

Tratamiento	Número de Servicio	Gana	Mantiene	Pierde
hCG	1	71.7% ^a (33/46)	69.4% ^a (25/36)	43.3% ^a (42/97)
Testigo	1	73.2% ^a (30/41)	64.0% ^a (16/25)	24.1% ^b (27/112)
hCG	≥2	64.1% ^a (75/117)	50.0% ^a (10/20)	26.5% ^b (44/166)
Testigo	≥2	54.4% ^a (49/90)	54.8% ^a (17/ 31)	24.5% ^b 51/208

^{a, b} Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística (P<0.05).

En el grupo hCG se encontró que 83.4% (191/229) de las vacas tuvieron dos cuerpos lúteos, mientras que en el grupo testigo sólo 9.4% (18/190). Las concentraciones promedio de progesterona fueron mayores en los días 11 [hCG (7.0 ± 2.7 ng/ml) vs. testigo (5.1 ± 2.2 ng/ml)] y 15 [hCG (9.36 ± 2.9 ng/ml) vs. testigo (5.9 ± 2.3 ng/ml)] (P<0.05) en las vacas tratadas con hCG (Figura1). En las vacas que retornaron al estro, la duración promedio del ciclo difiere entre grupos [hCG (22.8 ± 1.3 días) vs. testigo (21.5 ± 1.4 días)] (P<0.0001).

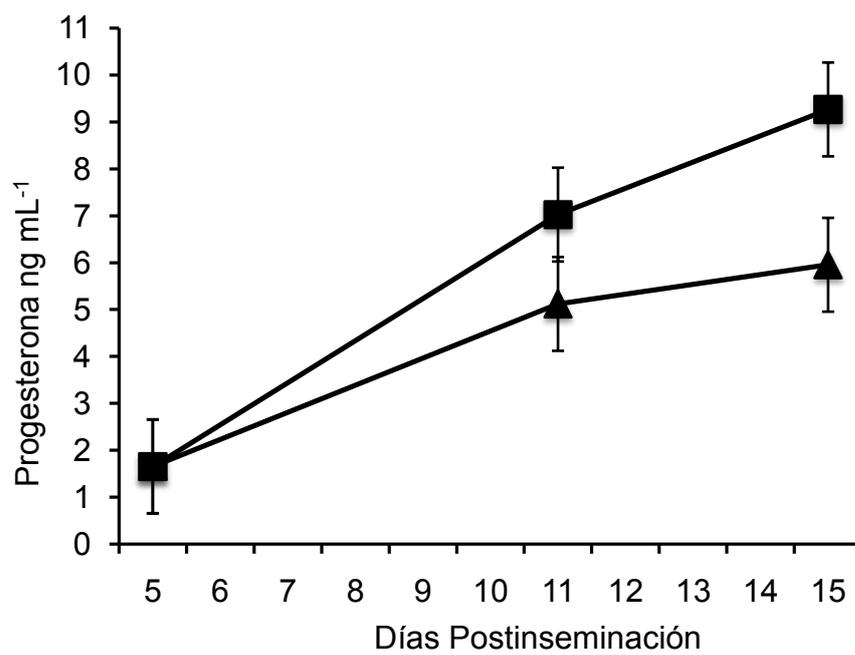


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de progesterona en los días 5, 11 y 15 del ciclo en los grupos hCG (—■—) y testigo (—▲—) .

5. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que el tratamiento con hCG en el día 5 posinseminación incrementa el porcentaje de concepción en las vacas de primer servicio, y este efecto es más evidente en las vacas que perdieron condición corporal en los 30 días siguientes a la inseminación.

El incremento en la fertilidad pudo ser mediado por el aumento de los niveles séricos de progesterona (Rajamahendran y Sianangama, 1992; Santos *et al.*, 2001). El éxito del establecimiento de la gestación depende del mantenimiento de niveles adecuados de progesterona principalmente durante los primeros 18 días del desarrollo embrionario (Morris y Diskin, 2008). En contraste, en las vacas lecheras el fracaso de la concepción se ha relacionado con bajas concentraciones de progesterona (Larson *et al.*, 1997; Starbuck *et al.*, 1999; Darwash y Lamming, 1998). En el presente trabajo las vacas que recibieron la inyección de hCG tuvieron concentraciones séricas de progesterona mayores que las vacas del grupo testigo, lo que pudo influir en el establecimiento de la gestación. En las vacas tratadas con hCG o GnRH en el día 5 del ciclo, el aumento de los niveles séricos de progesterona se debe a la inducción de la ovulación y/o luteinización del folículo dominante de la primera oleada folicular y la subsiguiente formación de un segundo cuerpo lúteo (Price y Webb, 1989; Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001; Peters, 2005). Aunque el cuerpo lúteo espontáneo (original) responde al estímulo luteotrópico de la hCG, los resultados de diversos estudios con vacas tratadas con hCG muestran que el incremento de los niveles de progesterona se debe a la formación de un cuerpo lúteo accesorio (Schmitt *et al.*, 1996a; Díaz *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2001); en el presente trabajo, la proporción de las vacas que desarrollaron un cuerpo lúteo accesorio fue mayor en el grupo tratado con hCG que en el testigo (83.4% vs 9.4%).

El incremento en las concentraciones séricas de progesterona pudo favorecer la fertilidad dado que ésta hormona regula la producción de diferentes secreciones endometriales necesarias para el desarrollo del embrión (Geisert *et al.*, 1992). En los bovinos se ha asociado un retraso en el desarrollo

embrionario con la disminución de las concentraciones séricas de progesterona (Binelli *et al.*, 2001; Mann y Lamming, 2001). En contraste, la administración de dicha hormona ha favorecido el desarrollo del embrión (Mann *et al.*, 2006). El retraso en el desarrollo embrionario es una causa de falla en el establecimiento de la gestación debido a que los embriones retrasados producen menores cantidades de interferón- τ , lo cual provoca el fracaso del reconocimiento materno de la gestación (Mann *et al.*, 2006). Mann y Lamming (2001) mostraron que el retraso de un día (entre los días 4 a 5) en el aumento posovulatorio de las concentraciones de progesterona, generó embriones de menor tamaño que produjeron menores cantidades de interferón- τ en el día 16; por otra parte, la inserción de un dispositivo intravaginal de liberación prolongada de progesterona en los días 5 a 9 posinseminación promovió un incremento de cuatro veces el tamaño del trofoblasto y un aumento de seis veces en las concentraciones de interferon- τ .

En las vacas lecheras las anomalías en la función del cuerpo lúteo provocan bajos niveles séricos de progesterona y están relacionados con el bajo porcentaje de concepción (Larson *et al.* 1997; Starbuck *et al.*, 1999; Darwash y Lamming, 1998). Sin embargo, los niveles sanguíneos de esta hormona son bajos no solo porque el cuerpo lúteo secreta menos progesterona sino también porque esta hormona se metaboliza más rápido, debido a un aumento en la función hepática ocasionada por un incremento en el consumo de materia seca (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003; Sartori *et al.*, 2004).

Es probable que el incremento en las concentraciones séricas de progesterona haya favorecido el porcentaje de concepción; sin embargo, también es posible que la eliminación del folículo dominante en el día 5 haya modificado la dinámica folicular, lo cual pudo influir en el mejoramiento de la fertilidad. En diferentes estudios (Díaz *et al.*, 1998; Nishigai *et al.*, 2001) se ha observado que la aplicación de hCG en el día 5 del ciclo promueve la formación de tres oleadas foliculares, lo que provoca un aumento promedio de la duración del ciclo de 1 a 2 días. Este efecto se debe a que la aplicación de hCG elimina el

folículo dominante de la primera oleada folicular, permitiendo la emergencia temprana de una segunda oleada. Se ha observado que el folículo dominante de la segunda oleada ejerce menor tiempo de dominancia (Díaz *et al.*, 1998), lo que promueve la emergencia de una tercera oleada y el alargamiento de la fase lútea y del ciclo de 1 a 2 días. Ahmad *et al.* (1997) encontraron que las vacas que presentaron 3 oleadas foliculares posinseminación tuvieron mejor fertilidad en comparación con las vacas que presentaron 2 oleadas. Es posible que el alargamiento de la fase lútea le permita a los embriones retrasados en su desarrollo alcanzar el estado óptimo para establecer el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación (Díaz *et al.*, 1998). En el presente trabajo, las vacas que no gestaron del grupo tratado con hCG tuvieron un aumento en el número de días de retorno al estro en comparación con el grupo testigo (22.8 vs 21.5).

La inducción de tres oleadas foliculares con hCG evita que durante los días en que se lleva a cabo el reconocimiento materno de la gestación haya un folículo preovulatorio que secreta cantidades elevadas de estradiol. Mateos *et al.* (2002) encontraron que el porcentaje de concepción fue mayor en las vacas que tuvieron folículos < de 15 mm (49.7%) en los días 12-14 posinseminación que en las vacas con folículos \geq 15 mm (37.1%). Asimismo, las vacas gestantes tuvieron menor diámetro folicular (12.8 ± 0.41 mm) que las vacas no gestantes (14.1 ± 0.38 mm). Se conoce que la eliminación del folículo dominante mediante la inyección de GnRH o hCG en los días 12 a 14 del ciclo favorece la concepción (Peters *et al.*, 2000). El mecanismo por el cual la dinámica folicular posterior al servicio influye en la fertilidad puede estar relacionado con el proceso de regresión del cuerpo lúteo. Pritchard *et al.* (1994) encontraron que concentraciones altas de estradiol durante los días 14-17 posinseminación tienen un efecto negativo en el porcentaje de concepción. Hay evidencia que la cantidad de progesterona secretada por el cuerpo lúteo y la concentración de estradiol determinan la sensibilidad del mecanismo de secreción de la $PGF2\alpha$, de tal forma que este es más sensible a menores niveles de progesterona y a concentraciones altas de estradiol; así, la presencia de folículos grandes,

estarían haciendo más sensible el disparador de la secreción de $\text{PGF2}\alpha$ (Okuda *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se observó que los cambios en la condición corporal influyen en la fertilidad. En forma global las vacas que ganaron condición corporal del día de la IA al momento del primer diagnóstico de gestación (30 días después) incrementaron la probabilidad de gestación en 80% mientras que las vacas que mantuvieron la condición corporal aumentaron la probabilidad de gestación en 40%, con respecto a las vacas que perdieron condición corporal. Además, el tratamiento con hCG aumentó el porcentaje de concepción sólo en las vacas de primer servicio que perdieron condición corporal. En las vacas de dos o más servicios el porcentaje de concepción fue similar entre las vacas que recibieron hCG y las testigo, y la respuesta al tratamiento no fue afectada por los cambios de condición corporal.

El balance energético negativo (BEN) afecta los procesos reproductivos. El balance energético puede estimarse indirectamente al observar los cambios en la condición corporal (Butler, 2000). El descenso de la condición corporal se ha relacionado con un incremento en el intervalo de días abiertos (Patton *et al.*, 2007), disminución en el porcentaje de concepción a primer servicio (Buckley *et al.*, 2003; Patton *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009), y aumento en los días en que se presenta la primera ovulación postparto (Beam y Butler, 1997; Butler, 2000). Por otro lado, las vacas que presentan mayor tasa de recuperación del BEN, y un estatus equilibrado de balance energético al momento del primer servicio tienen concentraciones de progesterona más altas en el día 10 posinseminación y mayor probabilidad de quedar gestantes (Reist *et al.*, 2003).

La relación entre condición corporal y fertilidad se puede explicar mediante los efectos que tiene la insulina y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I) en el proceso reproductivo. Existe una correlación positiva entre las concentraciones de insulina e IGF-I y la condición corporal (León *et al.*, 2004).

Dichas hormonas tienen efectos favorables en la maduración del ovocito y en el desarrollo embrionario temprano (Izadyar *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2002ab). En estudios *in vitro*, la adición de insulina o IGF-I al medio favorece la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Moreira *et al.*, 2002b). Por otra parte, la insulina y el IGF-I favorecen la esteroidogénesis, la diferenciación folicular y la maduración del folículo dominante (Gong *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 1994; Beam y Butler, 1998; Scaramuzzi *et al.*, 1999).

Un efecto más evidente de la pérdida de la condición corporal es el retraso del inicio de la actividad ovárica posparto (Beam y Butler, 1999). Las vacas que muestran un BEN de menor magnitud y una recuperación más rápida de la condición corporal posparto inician su actividad ovárica más temprano (Beam y Butler, 1999; Reist *et al.*, 2003), mientras que las vacas que tienen un BEN más profundo y pierden más condición corporal, tienen periodos más largos de anestro (Patton *et al.*, 2007). En el presente trabajo, las vacas incluidas en el experimento tuvieron más de 60 días posparto, por lo que el efecto de los cambios de la condición corporal en el inicio de la ciclicidad ya había sido sobrepasado en la mayor parte de ellas; sin embargo, el hecho de haber perdido condición corporal entre el momento de la inseminación y el día 30 posinseminación, indica que estaban en un estado metabólico similar al experimentado durante el BEN posparto, por lo que los efectos negativos en la reproducción pueden ser similares. En el ganado lechero es frecuente que las vacas presenten estados de BEN después de haber superado el primer nadir posparto (Reist *et al.*, 2003), por tanto esta condición metabólica puede seguir afectando la frecuencia en la secreción de la LH, el desarrollo folicular y la función del cuerpo lúteo (Villa-Godoy *et al.*, 1990; Beam y Butler, 1997; van den Hurk y Zhao, 2005;).

Un dato interesante es la fertilidad observada en las vacas del grupo testigo de primer servicio que ganaron y mantuvieron condición corporal, las cuales tuvieron porcentajes de concepción superiores a 60%, mientras que las vacas que perdieron condición corporal apenas llegaron a 24%. Este hallazgo

contrasta con la aseveración de que la disminución del porcentaje de concepción en el ganado lechero en los sistemas intensivos de producción obedece, en parte, a la selección de vacas menos fértiles, debido a que se ha utilizado como principal criterio de selección la producción de leche sin considerar características de fertilidad. Si bien existen datos que respaldan dicha aseveración (Royal *et al.*, 2002), también existe evidencia en la que no se relaciona la alta producción de leche con la baja fertilidad. A este respecto López-Gatius *et al.* (2006) observaron que las vacas más fértiles fueron las que produjeron más leche en los primeros 50 días posparto. Asimismo, los resultados del presente trabajo indican que la condición corporal de las vacas lecheras determina en mayor grado el porcentaje de concepción que la producción de leche, ya que la producción medida el día del servicio fue similar entre las vacas que ganaron (45.8 kg), mantuvieron (44.3 kg) y perdieron (42.2 kg) condición corporal. Estos datos confirman lo señalado por Lucy (2001), que la alta producción de leche no indica necesariamente un BEN y baja fertilidad, ya que la alta producción es compensada con un mayor consumo de materia seca en las vacas mejor adaptadas.

Al reagrupar los datos y analizarlos por número de servicio y condición corporal se encontró que el porcentaje de concepción sólo fue significativamente mayor en las vacas tratadas con hCG en el primer servicio que pierden condición corporal, resultados similares fueron observados por Santos *et al.* (2001). ¿Por qué el tratamiento con hCG mejoró la fertilidad sólo en las vacas de primer servicio que perdieron condición corporal y no en las de dos o más servicios aun cuando también perdieron condición corporal?, esta es una pregunta difícil de contestar con los datos del presente trabajo; sin embargo, la respuesta puede estar relacionada con las diferencias metabólicas entre las vacas de primer servicio y las vacas de más servicios (diferencia en días en leche), y con las vacas que ganaron o perdieron condición corporal.

La participación relativa de las concentraciones subnormales de progesterona sérica como causa de infertilidad puede ser mayor en las vacas de primer

servicio que en las vacas de más servicios, debido a que las de primer servicio están más cerca del BEN posparto. Villa-Godoy *et al.* (1988) encontraron que el BEN afectó la función del cuerpo lúteo en el segundo y tercer ciclos estrales posparto. Las concentraciones disminuidas de IGF-I durante el BEN afectan la síntesis de progesterona (Spicer *et al.*, 1990; Rivera y Fortune, 2001). Así, la adición de IGF-I a cultivos de células lúteas bovinas, incrementa la secreción de dicha hormona (Schams *et al.*, 1988; Niswender *et al.*, 2000). También el BEN afecta negativamente el desarrollo folicular y las características del folículo ovulatorio, lo que se refleja en la función lútea subsiguiente (Beam y Butler, 1997; van den Hurk y Zhao, 2005). Adicionalmente, las vacas de primer servicio estuvieron en la etapa de la lactación en la que producen más leche y su consumo de materia seca es mayor, por lo que el metabolismo hepático de la progesterona pudo ser más rápido (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003). En diversos estudios se ha observado que el consumo de materia seca se asocia con la velocidad de eliminación de las hormonas esteroides de la sangre (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003).

Por otra parte, el porcentaje de concepción de las vacas de primer servicio que ganaron o mantuvieron condición corporal del grupo testigo fue mayor de 60%; porcentaje similar al obtenido en las vacas lecheras de hace 30 años, cuando todavía no se observaba una disminución tan dramática de la fertilidad. Además, la producción de leche medida el día del servicio fue similar en este grupo de vacas que ganaron (45.8 kg), mantuvieron (44.3 kg) y perdieron (42.2 kg) condición corporal, lo que permite proponer que el estado metabólico de las vacas en los siguientes días al servicio, es más importante que la producción de leche.

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento con hCG en el día 5 posinseminación induce la formación de un cuerpo lúteo accesorio y un incremento de las concentraciones circulantes de progesterona.
- La inyección de hCG en el día 5 posinseminación mejora el porcentaje de concepción en vacas de primer servicio que perdieron condición corporal en los siguientes 30 días posinseminación.
- La ganancia o mantenimiento de condición corporal en los siguientes 30 días posinseminación aumenta las probabilidades de gestación en ambos grupos.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008; 69:72–80.

Ahman N, Townsend EC, Dailey RA, Inskeep EK. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cow and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; 49:13-28.

Aréchiga FCF, Vázquez-Flores S, Ortiz O, Hernández-Cerón J, Porras A, Mcdowell LR, Hansen PJ. Effect of injection of β -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*. 1998; 50:65-76.

Aréchiga FCF. Efecto de los antioxidantes y su uso potencial en incrementar la eficiencia reproductiva del Ganado bovino. Memorias del VIII Curso Internacional de Reproducción Bovina; 1999 mayo 24-27; México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, División de educación continua. 1999 pp 155-179.

Aréchiga FCF, Hernández-Cerón J. 2007. Efectos adversos del estrés calórico en la reproducción del ganado bovino. En: *Reproducción Bovina*. Editores: Hernández Cerón J y Zavala Rayas J. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Pág. 181-194.

Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 2002; 123:371–378.

Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1978; 54:483-493.

Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL, Thatcher WW. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 1992; 47:871-883.

Barker AR, Schrick FN, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows. *J. Dairy. Sci.* 1998; 81:1285-1290.

Beam SW, Butler WR. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 1997; 56:133-142.

Beam SW, Butler WR. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy. Sci.* 1998; 81:121–131.

Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1999; 54:411-424.

Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology.* 2001; 56:1451-1463.

Block SS, Rhoads RP, Bauman DE, Ehrhardt RA, McGuire MA, Crooker BA, Griinari JM, Mackle TR, Weber WJ, Van Amburgh ME, Boisclair YR. Demonstration of a role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 2003; 86:3508–3515.

Bo M, Boime I. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin 13 gene cluster in vivo. *J. Bio. Chemis.* 1992; 267: 3179-3314.

Breuel KF, Spitzer JC, Henricks DM. Systemic progesterone concentration following human chorionic gonadotropin administration at various times during the estrus cycle in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 1989; 67:1564-1572.

Breuel KF, Spitzer JC, Thompson CE, Breuel JF. First-service pregnancy rate in beef heifers as influenced by human chorionic gonadotropin administration before and/or after breeding. *Theriogenology.* 1990; 34:139-143.

Buckley F, O'Sullivan K, Mee JF, Evans RD, Dillon P. Relationships Among Milk Yield, Body Condition, Cow Weight, and Reproduction in Spring-Calved Holstein-Friesians. *J. Dairy. Sci.* 2003; 86:2308–2319.

Butler WR, Smith RD. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 1989; 72:767–783

Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle *J. Anim. Sci.* 1996; 74:858–865.

Butler WR. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 1998; 81:2533–2539.

Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:449-457.

Butler WR. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Anim. Sci.* 2001; 26:133–145.

Butler WR. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 2003; 83:211–218.

Chagas e Silva J, Lopes da Costa L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology*. 2005; 64:49–60.

Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Juchem SO, Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 84:239-255.

Darwash AO, Lamming GE. The importance of milk progesterone concentrations during early pregnancy in the cow. *J. Anim. Breed.* 1998; 2:41–43.

Darwash AO, Lamming GE, Royal MD. A protocol for initiating oestrus and ovulation early postpartum in dairy cows. *Anim. Sci.* 2001; 72:539–546.

Díaz T, Schmitt EJP, Thatcher MJ, Thatcher WW. Human Chorionic Gonadotropin-Induced alterations in ovarian follicular dynamics during estrus cycle of heifers. *J. Anim. Sci.* 1998; 76:1929-1936.

Diskin MG, Morris DG. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod. Dom. Anim.* 2008; 43:260–267

Duras M, Mlynarczuk J, Kotwica J. Non-genomic effects of steroids on oxytocin stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F₂ and E₂ secretion from bovine endometrial cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 2005; 76:105–116.

Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 1997; 46: 138-145.

Elrod CC, Butler WR. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 1993; 71: 694–701.

Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes the human glycoprotein hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 1984; 40: 43-78.

Fischer-Tenhagen C, Thiele G, Heuwieser W, Tenhagen B-A. Efficacy of a Treatment with hCG 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. *Reprod. Dom. Anim.* 2008 doi: j.1439-0531.2008.01249.x Published Online.

Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 2000; 141:995–1000.

Fraser HM, Wulff C. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1:88.

Funston RN, Lipsey RJ, Geary TW, Roberts AJ. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 2005; 83:1403-1405.

Galvao KN, Santos JEP, Coscioni AC, Juchem SO, Chebel RC, Sisco WM, Villaseñor M. Embryo Survival from Gossypol-Fed Heifers after Transfer to Lactating Cows Treated with Human Chorionic Gonadotropin. *J. Dairy. Sci.* 2006; 89:2056–2064.

García E. Modificación al sistema de clasificación climática de Köepen. México, D.F. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. 1987.

Garverik HA. Ovarian Follicular Cysts in Dairy Cows. *J. Dairy. Sci.* 1997; 80:995–1004.

Geisert RD, Morgan GL, Short EC, Zavy MT. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 1992; 4:301-305.

Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J. Endocrinol.* 1994; 143:157-164.

Green MP, Mann GE, Hunter MG. Luteal characteristics and progesterone production on day 5 of the bovine oestrous cycle. *Reprod. Domest. Anim.* 2007; 42:643-647.

Gröhn YT, Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:605-614.

Gustafsson H, Larsson K, Kindahl H, Madej A. Sequential endocrine changes and behaviour during estrus and metoestrus in repeat breeder and virgin estrus and metoestrus heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 1986; 10:261–273.

Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 1997a; 56:608–616.

Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J. Anim. Sci.* 1997b; 75:1876-1884.

Hanlon DW, Jarratt GM, Davidson PJ, Millar AJ, Douglas VL. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology.* 2005; 63:1938-1945.

Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger III CE, Chase CC Jr. Adverse impact of the heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*. 2001; 55: 91-103.

Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol. Reprod.* 2002; 67:1305–1312.

Hernández CJ, Porras AA, Benítez S. Eficiencia de la detección de estros y niveles de progesterona al momento de la inseminación de vacas Holstein. *Av en Inv Agropecuaria* 1994; 3:12-17.

Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG. Factores asociados con la infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos de producción. *Ciencia Veterinaria*. 2007; 10:71-91.

Hockett ME, Hopkins FM, Lewis MJ, Saxton AM, Dowlen HH, Oliver SP, Schrick FN. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 58:241-251.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York, USA: Wiley, 1989.

Howard JM, Manzo R, Dalton JC, Frago F, Ahmadzadeh A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 95: 224–233.

Hunter RHF. Fertility in cattle: basic reasons why late insemination must be avoided. *Anim. Breed. Abstr.* 1985; 53:83-87.

Isobe N. Follicular cysts in dairy cows. *Anim. Sci. J.* 2006; 78:1-6.

Izadyar F, Van Tol HT, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation 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.

Kadokawa H, Blache D, Yamada Y, Martin GB. Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 2000; 12: 405–411.

Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Product. Sci.* 2002; 77: 59-91.

Kamada D, Matsui M, Shibamura T, Yanamoto D, Schams D, Miyamoto A. Suppression of corpus luteum development at early stage of formation by

antibody against vascular endothelial growth factor in the cow. *Biol. Reprod. Suppl. Special Issue 2004*;(451).

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

Kharche SD, Srivastava SK. Dose dependent effect of GnRH analogue on pregnancy rate of repeat breeder crossbred cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99:196–201.

Krinninger CE III, Stephens SH, Hansen PJ. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 63: 335-.

Lamming GE, Darwash AO. Effect of interluteal interval on subsequent luteal phase length and fertility in post partum dairy cows. *Biol. Reprod.* 1995; 53: 63 abstr.

Lamming GE, Darwash AO. The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 1998; 52:175-190.

Lara V, Hernández CJ, Cruz O, Ortiz O, Gutiérrez CG. Inicio de la actividad ovárica posparto y características de la función lútea de vacas Holstein. *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Buiatría 2002*. Acapulco, Gro. México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.

Larson SF, Butler WR, Currie WB. Progesterone supplementation increases pregnancy rates in lactating dairy cattle. *J. Reprod. Fertil. Abst. Series* 1995;15:63 abstr.

Larson SF, Butler WR, Currie WB. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 1997; 80:1288–1295.

León HV, Hernández-Cerón J, Keislert DH, Gutierrez CG. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J. Anim. Sci.* 2004; 82:445-451.

Leroy JLMR, Opsomer G, De Vlieghe S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PEJ, de Kruif A, Van Soom A. Comparison of embryo quality in high yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 2005; 64:2022–2036.

Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, de Kruif A. The *In Vitro* Development of Bovine Oocytes after Maturation in Glucose and β -

Hydroxybutyrate Concentrations Associated with Negative Energy Balance in Dairy Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 2006; 41:119–123.

Li PS, Wagner WC. In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol. Reprod.* 1983; 29:25-37.

Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MFW, Delavaud C, Chilliard Y, van der Lende T. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 2003; 86:799–807.

López-Gatius F, Santolaria P, Yániz J, Fenech M, López-Béjar M. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 2002; 58,1623–1632

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

Lozano DR. 2004. Efecto del estrés calórico sobre el desarrollo folicular, fertilidad, el desarrollo y calidad del embrión y la función lútea en vacas Holstein. Tesis de doctorado. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW, Erickson PS, Cleale RM, Firkins JL. Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and energy balance on time of post-partum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.* 1992; 54:323-331.

Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy. Sci.* 2001; 84:1277-1293.

Lucy MC. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007; 64:237-254.

Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 1998 54(Suppl).

Mann GE y Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle *Reprod. Dom. Anim.* 1999; 34: 269–274

Mann GE, Bleach EC, Starbuck GR, Fray MD. Relationship between preovulatory follicle growth and postovulatory luteal function in the cow. *J. Anim. Sci. Suppl.* 2001;79(135).

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

Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in cow. *Veterinary Journal*. 2006; 171:500-503.

Mateos RA, Hernández-Cerón J, Morales-Roura JS, Rodríguez GT. Tamaño folicular, progesterona y estradiol, en los días 12-14 posinseminación y porcentaje de concepción de vacas Holstein. *Archivos de Zootecnia*. 2002; 51:327-334.

McDougall S, Williamson NB, Macmillan KL. GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 39:205–214.

McDougall S, Rhodes FM, Verkerk GA. Pregnancy loss in dairy cattle in the Waikato region of New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 2005; 53:279-287.

Melendez P, Donovan A, Hernandez J, Bartolome J, Risco CA, Staples C, Thatcher WW. Milk, plasma, and blood urea nitrogen concentrations, dietary protein, and fertility in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003; 223:628–634.

Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*. 2002a; 57:1371-1387.

Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*. 2002b; 57:895-907.

Morris D, Diskin MG. Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2008; 2:1112-1119.

Muyan M, Boime I. Secretion of Chorionic Gonadotropin from Human Trophoblasts. *Placenta*. 1997; 18:237-241.

National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle, 7th rev. ed., Washington, DC: National Academic Science, 2001.

Nishigai M, Takamura A, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. The effect of Human Chorionic Gonadotropin on the development and function of bovine corpus luteum. *J. Reprod. Dev.* 2001; 47:283-294.

Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology*. 2002; 58:1597-1606.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 2000; 80:1-29.

Nockels Ch F. Antioxidants improve cattle immunity following. *Anim. Feed. Tech.* 1996; 62:59-68.

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

Ortega LA, Hernández Cerón J, Gutiérrez CG. La administración oral de glicerol al momento del servicio y durante los siguientes seis días, incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein. *Memorias de la XLII Reunión nacional de investigación pecuaria, 2006. Veracruz, México.*

Ortiz O. 1997. Análisis de sobrevivencia y serología prospectiva en el estudio de abortos. *Memorias del Séptimo Curso Internacional de Reproducción Bovina. 1997 mayo 19–22; México (DF): Academia de Investigación en Biología de la Reproducción AC. 29-42.*

Ortiz O, Hernández Cerón J. 2007. Análisis de los parámetros reproductivos en hatos lecheros: cálculo e interpretación. En: *Reproducción Bovina*. Editores: Hernández Cerón J y Zavala Rayas J. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Pág. 207-220.

Padmanabhan V, Keech C, Convey EM. Cortisol inhibits and adrenocorticotropin has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology*. 1983; 112:1782-1787.

Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG, Murphy JJ. Relationships Among Milk Production, Energy Balance, Plasma Analytes, and Reproduction in Holstein-Friesian Cows. *J. Dairy. Sci.* 2007; 90:649–658.

Peters AR, Martinez TA, Cook AJC. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11–14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 2000; 54:1317–1326.

Peters AR. Veterinary clinical application of GnRH questions of efficacy. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 88:155–167.

Pierce J, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual. Rev. Biochem.* 1981; 50:465-495.

PolICASTRO P, Ovitt C, HOSHINA M, FUKUOKA H, BOOTHBY M, BOIME I. The 13-subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:11492-11499.

Price CA, Webb R. Ovarian responses to hCG treatment during the oestrus cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 86:303-308.

Pritchard JY, Schrick FN, Inskip EK. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology.* 1994; 42: 247-259.

Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology.* 1988; 30: 195-209.

Rajamahendran R, Sianangama PC. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95:577-584.

Reist M, Koller IA, Busato A, Ktipfer U, Blum JW. First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows. *Theriogenology.* 2000; 64:665-701.

Reist M, Erdin DK, von Euw D, Tschümperlin KM, Leuenberger H, Hammon HM, Morel C, Philipona C, Zbinden Y, Künzi N, Blum JW. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology.* 2003; 59:1707-1723

Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Non-genomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocri. Rev.* 1998; 19:3–17.

Rivera GM, Fortune JE. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol. Reprod.* 2001; 65:112-118.

Robinson RS, Hammond AJ, Hunter MG, Mann GE. The induction of a delayed post-ovulatory progesterone rise in dairy cows: a novel model. *Dom. Anim. Endocri.* 2005; 28:285–295.

Roche JR, Lee JM, Macdonald KA, Berry DP. Relationships Among Body Condition Score, Body Weight, and Milk Production Variables in Pasture-Based Dairy Cows. *J. Dairy. Sci.* 2007; 90:3802–3815

Roth Z, Meweidan 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.

Royal MD, Flint APF, Wooliams JA. Genetic and phenotypic relationships among endocrine and traditional fertility traits and production traits in Holstein-Friesian dairy cow. *J. Dairy. Sci.* 2002; 85:958-967.

Ruiz LA, Aréchiga FCF, Morales RS, Ortiz O, Gutiérrez CG, Hernández-Cerón J. Incidencia de patologías uterinas y fertilidad de vacas Holstein tratadas con selenio y vitamina E antes y después del parto. *Veterinaria México.* 2009; 40:133-140.

Salas G. 1998. Reinicio de la actividad ovárica posparto en vacas Holstein bajo sistemas de producción en pequeña escala. (tesis de maestría). Morelia Mich. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Amentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85:2831–2842.

Santos JEP, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. Effect of human chorionic gonadotropin on function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2001; 79:2881-2894.

Santos JEP, Villaseñor M, Robinson PH, DePeters EJ, Holmberg CA. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: Plasma gossypol, health, and reproductive performance. *J. Dairy. Sci.* 2003; 86:892–905.

Santos JEP, Cerri RLA, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2004;80:31-45.

Santos JEP, Rutigliano HM, Sá Filho HF. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 110: 207–221.

Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJ, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 2004; 87:905–920.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 3:663-671.

Scaramuzzi RJ, Murray JF, Downing JA, Campbell BK. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1999; 17:269-277.

Schams D, Koll R, Li H. Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J. Endocrinol.* 1988; 116:97-100.

Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 2004; 39:241–251.

Schmitt EJ, Barros CM, Fields PA, Fields MJ, Diaz T, Kluge JM, Thatcher WW. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 1996a; 74:1915-1922.

Schmitt EJP, Barros CM, Fiels PA, Fiels MJ, Díaz T, Kluege JM, Thatcher WW. 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.* 1996b; 74:1074-1083.

Schrack FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *J. Dairy Sci.* 2001; 84:1407-1412.

Selvaraju S, Agarwal SK, Karche SD, Srivastava SK, Majumdar AC, Shanker U. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Anim. Reprod. Sci.* 2002; 73:141-149.

Shabankareh KH, Zandi M, Ganjali M. First Service Pregnancy Rates Following Post-AI Use of hCG in Ovsynch and Heatsynch Programmes in Lactating Dairy Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 2009 doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01339.x.

Shams-Esfandabadi N, Shirazi A, Mirshokral P, Bonyadian M. Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *Pak. J. Biol. Sci.* 2007; 10:2709-2713.

Shelton K, Gayerie De Abru MF, Hunter MG, Parkinson TJ, Lamming GE. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 90:1–10.

Sianangama PC, Rajamahendran R. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology.* 1992; 38:85-96.

Sianangama PC, Rajamahendran R. Effect of hCG administration on day 7 of the estrus cycle on follicular dynamics and cycle length in cow. *Theriogenology.* 1996; 45:583-592.

Simpson RB, Chase CC, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, growth

factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 102:483-492.

Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TG. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J. Anim. Sci.* 2000; 78:2670–2680.

Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 77:21-32.

Sirois J, Fortune J. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle monitored by real time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 1988; 39:308-317.

Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of tumor necrosis factor- β on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003; 50:380-388.

Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD. Insulin-Like Growth Factor-I in Dairy Cows: Relationships Among Energy Balance, Body Condition, Ovarian Activity, and Estrous Behavior. *J. Dairy Sci.* 1990; 73:929-937.

Starbuck GR, Darwash AO, Lamming GE. The importance of progesterone during early pregnancy in the dairy cow. *Cattle Pract.* 1999; 7:397–400.

Starbuck GR, Gutierrez CG, Mann GE. Relationship between pre-and post-ovulatory steroidogenic function in vivo in cattle. *J. Reprod. Fertil. Abs. Ser.* 2000; 25(55).

Stevenson JS, Portaluppi MA, Tenhouse DE, Lloyd A, Eborn DR, Kacuba S, DeJarnette JM. Interventions After Artificial Insemination: Conception Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *J. Dairy Sci.* 2007; 90:331–340

Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG.. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology.* 2005; 64:1212–1224.

Thatcher WW, Wilcox CJ. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 1973; 56:608-610.

Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt EP. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 1994. 72(Suppl 3):16-30.

Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*. 2006; 65:30-44.

Tixi C, Villa-Godoy A, García C, Montaldo H, Posadas E, Hernández-Cerón J. 2009a. Factores que afectan el porcentaje de vacas gestantes en el día 90 posparto. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría 2009a. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.

Tixi C, Villa-Godoy A, García C, Hernández-Cerón J. 2009b. Intervalo entre servicios y porcentaje de concepción en vacas lecheras en estabulación. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría 2009b. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.

Trimberger GW. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. *Nebraska Agric. Exp. Stn. Bull.* 1948; 153:3.

Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx JG, Dufour JJ. Buserelin alters the development of the corpora lutea in cyclic and early postpartum cows. *J. Anim. Sci.* 1995; 73:805–811.

Van Cleeff J, Drost M, Thatcher WW. Effect of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous response of dairy heifers. *Theriogenology*. 1991; 35:795-807.

van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005; 63:1717–1751.

Vasconcelos JL, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*. 2003; 60:795-807.

Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1988; 71:1063–1072.

Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Enright WJ, Ealy AD, Zinn SA, Fogwell RL. Energy balance and body condition influence Luteal function in Holstein heifers. *Dom. Anim. Endoc.* 1990; 7:135-148.

Waller KP, Colditz IG, Östensson K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 2003; 74: 31-.

Walton JS, Gary WH, Robinson NA, Kenneth EL. Effects of Progesterone and Human Chorionic Gonadotrophin Administration Five Days Postinsemination on Plasma and Milk Concentrations of Progesterone and Pregnancy Rates of Normal and Repeat Breeder Dairy Cows. *Can. J. Vet. Res.* 1990; 54: 305-308

Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod. Suppl.* 2003; 61:219–237.

Wayne DW. 2002. Distribución ji-cuadrada y análisis de frecuencias, En: *Bioestadística, bioestadística en ciencias de la salud, muestreo, probabilidad.* México : Editorial Limusa Wiley.

Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 535-547.

Wolfenson D, Lavon Y, Meidan R, Roth Z, Leitner G. Impact of animal health on endocrinology and reproduction in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2009; 87: E-Suppl. 2 abstr.

Yung MC, VandeHaar MJ, Fogwell RL, Sharma BK. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J. Anim. Sci.* 1996; 74:2239-2244.

Zavy MT. 1994. Embryonic mortality in cattle. In: Zavy MT, Geisert RD, editors. *Embryonic mortality.*