



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO**  
**EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**REPRODUCCIÓN**

**RESPUESTA ESTRAL Y FERTILIDAD DE VACAS LECHERAS EN**  
**ESTABULACIÓN TRATADAS CON eCG Y PGF2 $\alpha$**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**CARLOS QUIRÓS RUIZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. JOEL HERNÁNDEZ CERÓN**  
**FMVZ-UNAM**

**COMITÉ TUTORAL:**

**PhD. MARÍA TERESA SÁNCHEZ-TORRES ESQUEDA**  
**COLEGIO DE POSGRADUADOS**  
**PhD. ALEJANDRO VILLA GODOY**  
**FMVZ-UNAM**

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

### **A Dios:**

Por permitirme lograr una meta más en mi vida, por levantarme en los momentos difíciles y no abandonarme nunca.

### **A mi esposa y compañera de vida:**

Leticia Hernández Sarmiento, por tu amor, apoyo y comprensión que me brindas día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales.

### **A mis padres:**

Gildardo Quirós Domínguez y María de Roció Ruiz Aguilar, por cada palabra, consejos y por todo el apoyo que me han brindado en cada etapa de mi vida, han hecho que sea alguien en la vida. Una gran parte de este logro personal es también de ustedes.

### **A mis hermanos:**

Jesús, Alma y Efrén, gracias por su apoyo como familia han logrado sacarme adelante en cada momento.

### **A mi tía:**

Alicia Ruiz Aguilar, gracias por brindarme un hogar y hacerme sentir como en casa durante todo este tiempo.

### **A mis amigos:**

Que en mi andar he encontrado y que no menciono nombres para evitar la equivocación de no tenerlos en cuenta en este momento, gracias por su apoyo y amistad que han significado mucho en esta etapa de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de México (UNAM) en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por el aprendizaje recibido durante mi maestría, ya que me formó como un profesional y principalmente quiero agradecer a todos mis profesores por sus conocimientos adquiridos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la manutención durante el transcurso de los estudios de maestría.

A mi tutor principal el Dr. Joel Hernández Cerón por aceptarme y abrirme las puertas para ingresar a la maestría, quien fue mi guía durante mi formación en el posgrado y por su amistad brindada durante todo este tiempo.

A mis tutores la Dra. Teresa Sánchez-Torres Esqueda y el Dr. Alejandro Villa Godoy por su dedicación y sugerencias durante toda la maestría, así como en las revisiones de la tesis.

Al MVZ. EPA. Enrique Martínez Bárcenas por su valiosa participación en el trabajo de campo y principalmente por su amistad y enseñanza.

A la MC. Susana Rojas por realizar las mediciones de las concentraciones de estradiol de este trabajo.

Al MVZ. Luis Ángel Valdés Pérez, por ayudarme a realizar el análisis estadístico de este trabajo.

A los integrantes de mi jurado el Dr. Luis Alberto Zarco, Dr. Enrique Esperón, Dr. Eugenio Villagómez, Dr. Tomas Meraz, por tomarse el tiempo para revisar mi tesis y por sus sugerencias.

Un agradecimiento especial al sr. Ramón Fernández propietario del establo, sin su apoyo no hubiese logrado realizar este trabajo.

**¡MUCHAS GRACIAS!**

**Carlos Quirós Ruiz**

## RESUMEN

En este estudio se probó si la inyección de eCG simultáneamente con la administración de PGF2 $\alpha$  incrementa la respuesta estral en vacas lecheras. Se utilizaron 261 vacas con 56.9 $\pm$ 5.1 días posparto. Las vacas recibieron una inyección de PGF2 $\alpha$  entre los días 37 y 42 posparto. Catorce días después, las vacas con cuerpo lúteo se dividieron al azar en dos tratamientos: eCG (n= 131) recibieron PGF2 $\alpha$  y 400 UI de eCG; testigo (n= 130) sólo recibieron PGF2 $\alpha$ . Se detectaron estros en las siguientes 96 h postratamiento. La inseminación se realizó 12 horas después de detectar el estro. A las 96 h, las vacas que no mostraron conducta estral se palparon por vía transrectal y aquellas con turgencia uterina y moco, se inseminaron. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal el día 45 posinseminación. La proporción de vacas en estro conductual fue similar entre los tratamientos [eCG= 51% (67/131) y testigo= 53% (69/130); P>0.05]. Se observó una tendencia en la tasa de gestación de las vacas inseminadas con estro conductual a favor del grupo testigo [eCG= 29% (19/65) y testigo= 42% (28/67); P= 0.053]. Asimismo, el tiempo de presentación del estro no difirió entre tratamientos (eCG= 78.4 $\pm$ 16.5 y testigo= 78.6 $\pm$ 18.8 h; P>0.05). Considerando la aceptación de la monta y los cambios genitales, la respuesta estral [eCG= 79% (103/131) y testigo= 82% (107/130)] y la tasa de gestación [eCG= 30% (30/99) y testigo= 32% (33/102)] fueron similares entre los tratamientos (P>0.05). Se concluye que la administración de 400 UI de eCG al momento de la inyección de PGF2 $\alpha$  no mejoró la respuesta estral ni la tasa de gestación en vacas lecheras.

Palabras clave: eCG, respuesta estral, tasa de gestación, vacas lecheras.

## CONTENIDO

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Índice de cuadros y figuras	vi
1. Introducción	1
2. Revisión de literatura	3
2.1 Ciclo estral en la vaca	3
2.2 Estro	5
2.2.1 Factores intrínsecos de la vaca que afectan la presentación del estro	6
2.2.2 Factores ambientales que afectan la presentación del estro	8
2.2.3 Factores humanos que afectan la presentación del estro	9
2.2.4 Ayudas para detectar el estro	10
2.3 Sincronización del estro	11
2.3.1 Sincronización del estro con progestágenos	12
2.3.2 Sincronización del estro con prostaglandina F2 $\alpha$	13
2.3.3 Combinación de tratamientos	15
2.4 Gonadotropina coriónica equina (eCG)	16
2.4.1 Dosis de eCG	17
2.4.2 Uso de la eCG en bovinos	18
3. Material y Métodos	24
3.1 Localización	24
3.2 Animales	24
3.3 Tratamientos	24
3.4 Crecimiento folicular y concentraciones de estradiol	25
3.5 Análisis estadístico	25
4. Resultados	27
5. Discusión	32
6. Conclusión	38
7. Referencias	39

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Diagrama que muestra los principales efectos de la eCG sobre la actividad ovárica en vacas.	19
Figura 2. Diámetro folicular (mm) a las 24, 48 y 72 horas postratamiento de vacas lecheras tratadas con 400 UI de eCG (▲) al momento de la luteólisis con PGF2α y Testigos (■).	31
Cuadro 1. Proporción de vacas detectadas en estro conductual y Odds ratio (OR) de presentación del estro de acuerdo a las variables en el modelo final de regresión logística.	27
Cuadro 2. Tasa de gestación (G/IA) y Odds ratio (OR) de gestación de las vacas detectadas en estro conductual de acuerdo a las variables en el modelo final de regresión logística.	28
Cuadro 3. Tasa de gestación (G/IA) y Odds ratio (OR) de gestación de las vacas considerando estro conductual y genital de acuerdo a las variables en el modelo final de regresión logística.	29
Cuadro 4. Porcentaje de animales que ovularon y número de ovulaciones en vacas tratadas con 400 UI de eCG al momento de la inyección de PGF2α y testigos.	30
Cuadro 5. Concentraciones séricas de estradiol (pg/mL; media ± error estándar) a las 24 y 48 horas postratamiento y al momento de la inseminación después del tratamiento con 400 UI de eCG en vacas lecheras y testigos.	30

## 1. INTRODUCCIÓN

El incremento de la producción de leche en la vaca es consecuencia del progreso genético y del mejoramiento del manejo de los hatos. El incremento de la producción de leche ha alterado algunos procesos fisiológicos que regulan la reproducción, lo cual ha ocasionado una disminución de la eficiencia reproductiva (Lucy, 2001; Washburn *et al.*, 2002). El efecto de la alta producción en la reproducción es controvertido, ya que de acuerdo con un estudio de López-Gatius *et al.* (2006), las vacas que produjeron más leche en el día 50 posparto, tuvieron mejores parámetros reproductivos que las vacas que produjeron menos leche. No obstante, se ha visto que las vacas con mayor producción de leche padecen de ovulación múltiple, tienen folículos ovulatorios de mayor diámetro, menores concentraciones de estradiol ( $E_2$ ), muestran estros menos intensos y de menor duración y tienen menores concentraciones de progesterona ( $P_4$ ) (Lopez *et al.*, 2004; 2005).

Un efecto de la alta producción de leche es la disminución de la eficiencia en la detección de estros (EDE) (Macmillan, 2010; Colazo y Mapletoft, 2014). La baja EDE ( $\leq 50\%$ ) provoca en la industria lechera de EE.UU. pérdidas de 300 millones de dólares anualmente (Senger, 1994). Se argumenta que el alto consumo de materia seca (MS) en las vacas altas productoras, provoca que aumente el flujo sanguíneo hepático y con ello el catabolismo de las hormonas esteroides (Sangritavong *et al.*, 2002), por lo que las vacas altas productoras tienen menores concentraciones de  $P_4$  y  $E_2$  que las vacas con menores niveles de producción o vacas que no están en lactación (Wiltbank *et al.*, 2006). Los bajos niveles de  $E_2$  en las vacas con alta producción explican, en parte, la disminución de la intensidad del estro y, en consecuencia, la menor probabilidad de que sean observadas en estro (Lopez *et al.*, 2004).

Para incrementar la EDE se utilizan programas de sincronización del estro basados en inyecciones sistemáticas de la prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) con 14 días de diferencia o la inyección de  $PGF2\alpha$  sólo en vacas que tienen un cuerpo lúteo (CL) (Bó, 2011); sin embargo, aún con estos programas la presentación del estro en vacas lecheras de alta producción varía entre 50 y 60% (Méndez-Mendoza *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha buscado mitigar los efectos de la baja EDE mediante el uso de programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), en los cuales no se requiere de la observación previa del estro para inseminar a las

vacas (Pursley *et al.*, 1997). Debido a que algunas vacas enroladas en programas de IATF aún no han iniciado su actividad ovárica posparto, se han incluido en los programas como la gonadotropina coriónica equina (eCG) que favorece la respuesta de este tipo de vacas (Colazo *et al.*, 2015). La eCG es una glicoproteína que en la vaca tiene un efecto similar a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) (De Rensis y López-Gatius, 2014). En vacas lecheras con historia de ovulación sin signos de estro pero con presencia de un CL, se ha logrado mejorar la fertilidad mediante el tratamiento con PGF2 $\alpha$  simultáneamente con 500 UI de eCG e inseminadas a tiempo fijo (García-Ispuerto y López-Gatius, 2013). La administración de eCG algunas horas (h) antes de la inducción de la ovulación en programas de IATF, estimula el crecimiento del folículo dominante, incrementa el número de vacas que ovulan y aumenta las concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub> del ciclo subsiguiente, lo que se ha asociado con un mejor desarrollo embrionario y un incremento de la tasa de gestación (proporción de vacas gestantes del total inseminado) (Baruselli *et al.*, 2004; Sá Filho *et al.*, 2010b). También se ha visto un efecto favorable de la administración de eCG en los programas de sincronización e inducción de la ciclicidad en vacas productoras de carne (Fernández-Abella y Villegas, 2002; Small *et al.*, 2009; Bó *et al.*, 2013).

El efecto estimulante de la eCG sobre el desarrollo folicular en vacas lecheras podría favorecer la respuesta estral en programas de sincronización de estros basados en la PGF2 $\alpha$ ; sin embargo, no existen referencias de su uso en ganado sujeto a detección de calores, por lo que en el presente estudio se probó si la inyección de 400 UI de eCG al momento de la inyección de PGF2 $\alpha$  afecta las características del folículo ovulatorio, las concentraciones de E<sub>2</sub> y la eficiencia en la detección de estros en vacas lecheras.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Ciclo estral de la vaca**

El ciclo estral representa un patrón repetitivo de actividad ovárica que permite a las hembras ir de un periodo reproductivo de no receptividad a uno de receptividad, para que ocurra el apareamiento y el subsiguiente establecimiento de la gestación (Forde *et al.*, 2011). La duración del ciclo estral en la vaca es de 19 a 20 días en ciclos de dos ondas foliculares y de 22 a 23 días en ciclos de tres ondas (Adams *et al.*, 2008). En promedio, el ciclo estral tiene una duración de 21 días.

El ciclo estral se divide en forma amplia en dos fases que se nombran dependiendo de las estructuras ováricas presentes: fase luteal y fase folicular (Senger, 2005). La fase luteal, inicia después de la ovulación cuando el CL produce concentraciones séricas de P<sub>4</sub> mayores a 1 ng/mL y finaliza con la regresión del CL, durante esta fase la estructura ovárica dominante es el CL y la hormona más importante es la P<sub>4</sub> (Stevenson, 2007). La fase folicular inicia con la regresión del CL, lo cual provoca bajas concentraciones séricas de P<sub>4</sub> y finaliza con la ovulación. En esta fase ocurre el crecimiento y maduración del folículo ovulatorio, el cual produce grandes cantidades de E<sub>2</sub> (Lamb *et al.*, 2009; Forde *et al.*, 2011).

El ciclo estral se puede dividir en cuatro etapas que se definen mediante una combinación de estados ováricos, hormonales y conductuales: estro, metaestro, diestro y proestro (Rathbone *et al.*, 2001). El estro es el periodo de receptividad sexual en la vaca, tiene una duración de 8 a 18 horas, es provocado por el aumento de las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> provenientes del folículo dominante. En ausencia de P<sub>4</sub>, las altas concentraciones de E<sub>2</sub> inducen una secreción mayor (pico) de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (a través de la Kisspeptina), ocasionando el pico preovulatorio de LH que generalmente coincide con el inicio de la receptividad sexual. La secreción preovulatoria de LH inicia cambios a nivel folicular que incluyen el reinicio de la meiosis en el ovocito primario, la ruptura de la membrana basal, la ovulación y el inicio de la luteinización. (Stevenson, 2007; Lamb *et al.*, 2009; Wiltbank y Pursley, 2014). El E<sub>2</sub> también influye sobre el aparato genital, provocando que se vuelva edematoso, turgente (tónico) y que aumente su secreción, especialmente en las

glándulas cervicales, que secretan el moco característico del estro, el cual es abundante, filamentoso y cristalino (Roelofs *et al.*, 2010). La ovulación ocurre aproximadamente entre 24 a 30 horas después del inicio del estro o alrededor de 12 horas después de que termina el estro, es decir, ocurre en el metaestro.

El metaestro tiene una duración de 3 a 4 días durante los cuales se desarrolla el CL a partir del cuerpo hemorrágico que se forma como resultado de la ruptura folicular; en esta etapa, el  $E_2$  y la inhibina disminuyen al dejar de estar presente un folículo preovulatorio, lo que permite un incremento de las concentraciones de la FSH. Esta elevación provoca el reclutamiento de un grupo (cohorte) de folículos que aceleran su desarrollo y conforman la primera oleada folicular (Forde *et al.*, 2011). Durante la formación del CL, las células de la granulosa y de la teca interna inician su luteinización y diferenciación en células lúteas grandes y pequeñas, respectivamente; las cuales son las responsables de producir grandes cantidades de  $P_4$  detectables cinco días después de la ovulación (Rathbone *et al.*, 2001; Senger, 2005).

Cuando las concentraciones de  $P_4$  superan 1 ng/mL (alrededor del día 5 del ciclo estral) inicia el diestro, etapa caracterizada por la plena funcionalidad del CL. La  $P_4$  producida durante el diestro retroalimenta negativamente en el hipotálamo para disminuir la frecuencia de secreción de GnRH, lo que ocasiona que los pulsos de LH también se secreten con menor frecuencia (1 pulso cada 4-6 horas), aunque aumenta su amplitud. Este patrón de secreción de la LH no es suficiente para promover la maduración de un folículo dominante, por lo que los folículos que crecen durante la primera oleada folicular (incluyendo el folículo dominante) terminan sufriendo regresión o atresia (Senger, 2005). Este destino también es compartido por los folículos que se desarrollan durante la segunda oleada folicular en vacas con ciclos estrales de tres oleadas foliculares.

En ausencia de preñez, la luteólisis ocurre normalmente entre 16-17 días después de la ovulación en respuesta a la secreción pulsátil de  $PGF2\alpha$  de origen endometrial, la cual llega al ovario a través de un mecanismo de contra corriente. Cuando las concentraciones de  $P_4$  son menores de 1 ng/mL termina el diestro e inicia el proestro (Rathbone *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2009;). El proestro dura entre 2 y 3 días y se caracteriza por un incremento en la

frecuencia de los pulsos de LH (1 pulso cada hora), lo cual conduce a la maduración final del folículo dominante y al incremento del E<sub>2</sub> que desencadena el comportamiento sexual de la vaca, con lo que inicia un nuevo ciclo estral (Senger, 2005).

## **2.2 Estro**

En los hatos de producción de leche la detección del estro, celo o calor sigue siendo uno de los principales problemas reproductivos, debido a que en promedio se detectan menos del 50% de las vacas elegibles para mostrar estro (Senger, 1994; Macmillan, 2010). La disminución de la tasa de detección del estro reduce la fertilidad del hato, aumenta el intervalo entre partos y disminuye la producción de leche (Nebel *et al.*, 2011). Desde 1994 se sabe que la EDE provoca pérdidas económicas importantes, en ese año se estimaron en EE.UU. de \$300 millones de dólares al año (Senger, 1994). Por lo tanto, si se logra incrementar la EDE se mejoran significativamente los parámetros reproductivos y, con ello, se incrementa la rentabilidad de los hatos. En las vacas lecheras, el estro tiene una duración de  $7.1 \pm 5.4$  h y durante este periodo realizan alrededor de  $8.5 \pm 6.6$  montas (Dransfield *et al.*, 1998) y cada monta dura 2.5 segundos (Xu *et al.*, 1998), por lo que en promedio una vaca expresa signos inequívocos de estro durante menos de medio minuto a lo largo de todo el periodo estral.

El signo primario o principal de una vaca en estro es cuando la vaca acepta la monta del toro o la monta de otra compañera, este signo se utiliza para determinar el tiempo correcto para la IA (Roelofs *et al.*, 2010; Aungier *et al.*, 2012). Sin embargo, existen otros signos secundarios para detectar a una vaca en estro: inquietud, aumento de vocalización, signo de flehmen después de oler la vulva de su compañera, inflamación y enrojecimiento de la vulva, secreción de moco cristalino, descanso de la mandíbula en la parte posterior de otra vaca, lame y frotarse con otras vacas, intento de monta a otras vacas, aumento del número de pasos y disminución en la producción de leche; estos signos secundarios pueden ocurrir antes, durante o después del estro y no están relacionados con el momento de la ovulación (O'Connor, 2007; Roelofs *et al.*, 2010).

La duración e intensidad del estro se ven afectados por factores intrínsecos de la vaca, ambientales y humanos (Forde *et al.*, 2011).

## 2.2.1 Factores intrínsecos de la vaca que afectan la presentación del estro

### 2.2.1.1 Nutricionales

Se ha observado una disminución en la actividad de monta en las vacas que perdieron más peso comparadas con las que perdieron menos peso después del parto. Un estudio realizado por Holaman *et al.* (2011) encontraron que la probabilidad de detectar a una vaca en estro con la ayuda de un podómetro se reduce en vacas con CC menor de 2 (escala del 1 al 5), en comparación con vacas con mayor CC.

### 2.2.1.2 Producción de leche

Es posible que la disminución de las concentraciones séricas de E<sub>2</sub>, causada por el aumento del flujo sanguíneo hepático y el catabolismo de las hormonas esteroides resulte en una disminución de la manifestación del comportamiento estral (Sangsrivong *et al.*, 2002). Lopez *et al.* (2004) observaron que las vacas altas productoras ( $\geq 39.5$  kg/día) tienen una menor concentración sérica de E<sub>2</sub> en el día del estro ( $6.8 \pm 0.5$  vs  $8.6 \pm 0.5$  pg/mL; P= 0.01) y una menor duración del estro ( $6.2 \pm 0.5$  h vs  $10.9 \pm 0.7$  h; P < 0.0001) en comparación con las vacas de baja producción (<39.5 kg/día). En otro estudio en el que se observaron 5883 servicios, se encontró que cada aumento de 1 kg en la producción de leche se asoció con una disminución de 1.6% en la actividad locomotora durante el estro (López-Gatius *et al.*, 2005), aunque debe aclararse que el aumento en el número de pasos es un signo secundario de estro. En contraste, en otro estudio, López-Gatius *et al.* (2006) concluyeron que la alta producción de leche se puede correlacionar con alta fertilidad, ya que las vacas que produjeron más de 50 kg en el día 50 posparto tuvieron mayor probabilidad de gestar en los primeros 90 días de leche.

### 2.2.1.3 Problemas podales

Las vacas con mala conformación de patas y pezuñas o con dolor en las extremidades, presentan menos actividad de monta y permanecen estáticas menos tiempo cuando reciben una monta en comparación con las vacas sin problemas en el aparato locomotor (O'Connor, 2007). Lucey *et al.* (1986) realizaron un estudio con cerca de 770 vacas, en el que se demostró que las vacas con laminitis y lesiones en la pezuña tuvieron un incremento de 7 días al primer servicio posparto y 11 días abiertos más, comparadas con las vacas sanas; estas diferencias fueron todavía mayores cuando las lesiones se presentaron entre 36 y 70 días posparto, tiempo durante el cual las vacas deberían estar siendo inseminadas por primera vez. Como resultado se produjo un incremento en 17 días al primer servicio posparto y 30 días abiertos adicionales con respecto a sus compañeras. Por otro lado, el dolor causado por los problemas podales provoca que las vacas pasen menos tiempo comiendo y rumiando, y más tiempo echadas. En consecuencia la ingesta de MS disminuye, lo que agudiza el balance energético negativo y las consecuencias reproductivas negativas de este estado metabólico (Dransfield *et al.*, 1998).

Mediante el uso de un sistema de puntuación para medir la intensidad del estro se ha observado que los problemas podales provocan una disminución de aproximadamente 37% en dicha intensidad. Asimismo, los problemas podales crónicos pueden disminuir las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> antes del estro y alterar los patrones pulsátiles de LH (Walker *et al.*, 2008).

### 2.2.1.4 Número de partos

En un estudio en el que se observó a las vacas lecheras durante 30 minutos cada 3 horas mediante un sistema electrónico de montas; se encontró que el estro fue más intenso en vacas primíparas que en multíparas (Roelofs *et al.*, 2005). Al contabilizar los signos de comportamiento de estro utilizando un sistema de puntuación y contando el número de pasos con la ayuda de un podómetro, se observó que las puntuaciones más altas fueron para las vacas primíparas en comparación con las vacas multíparas, ya que cada lactancia adicional

se asoció con una disminución de 21.4% en la actividad locomotora. Por el contrario, el número de montas aumenta con la paridad, lo cual aumentaría la probabilidad de ser vistas en estro mediante los métodos tradicionales (López-Gatius *et al.*, 2005). Sin embargo, la información de la influencia del número de partos llega a ser contradictoria ya que algunos autores (van Vliet y van Eerdenburg, 1996; Roelofs *et al.*, 2005 y Cavestany *et al.*, 2008) han observado mayor intensidad del estro en vacas primíparas, mientras que en otro estudio (van Eerdenburg *et al.*, 2002) no se observaron diferencias entre vacas primíparas y múltiparas. Por el contrario, Walker *et al.* (1996) encontraron que la duración del estro fue casi un 50% más corto para vacas lecheras de primer parto que en que en vacas múltiparas.

#### 2.2.1.5 Influencia entre compañeras del hato

La posibilidad de formar grupos sexualmente activos es mayor cuando el tamaño del hato es grande (Roelofs *et al.*, 2010). La presencia simultánea de varios animales en estro permite a la vaca la oportunidad de interactuar con otras vacas en estro, de modo que la expresión del estro también puede ser el resultado de la estimulación sexual de otros animales en estro (Roelofs *et al.*, 2005). También se ha observado que las vacas dominantes pueden inhibir la actividad de monta de las vacas subordinadas (Roelofs *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Factores ambientales que afectan la presentación del estro

#### 2.2.2.1 Alojamientos

Se ha observado que los corrales o alojamientos que ofrecen espacio suficiente para que las vacas puedan interactuar, crean mayores oportunidades para que socialicen con otras vacas en estro, lo cual facilita su detección (Ingram, 2009).

#### 2.2.2.2 Tipo de piso

Britt *et al.* (1986) realizaron un estudio comparando la actividad de monta en vacas que permanecen sobre piso de tierra con respecto a vacas que permanecen en piso de concreto,

encontrando una mayor duración del estro y del número de montas en aquellas que permanecían sobre el piso de tierra. Estos resultados indican que el tipo de suelo tiene un profundo efecto sobre el comportamiento sexual en la vaca.

#### 2.2.2.3 Temperatura ambiental

Cuando la temperatura sobrepasa los 30 °C, límite máximo de confort de las vacas, la actividad de monta disminuye (Ingram, 2009). El estrés por calor reduce la producción de E<sub>2</sub> en vacas lecheras (O'Connor, 2007). Cuando hace calor, las vacas tienden a mostrar solamente signos secundarios del estro, lo cual dificulta su detección (Hansen, 2005). Por otro lado, las ovulaciones sin signos de estro son más comunes durante los meses más cálidos del año (O'Connor, 2007).

#### 2.2.3 Factores humanos que afectan la presentación del estro

##### 2.2.3.1 Conocimiento y responsabilidad

En un establo lechero se debe asignar personal como tarea única la detección de celos, y estas personas deben estar capacitadas y entrenadas para tal fin. Además, el personal dedicado a la detección de estros debe tener el tiempo y la paciencia suficiente para cumplir con los periodos de observación que le sean asignados. En algunos casos es de particular importancia establecer incentivos económicos que permitan optimizar la detección de celos, lo cual minimiza las pérdidas en días abiertos de las vacas (O'Connor, 2007).

##### 2.2.3.2 Numero de observaciones

Existe una amplia variación entre la frecuencia y el número de montas por vaca; algunas vacas son muy activas y pueden llegar a mostrar 7 u 8 montas en un periodo de 15 a 20 minutos, mientras que otras pueden recibir únicamente una monta durante el mismo periodo, o demorar más de 20 a 30 minutos entre montas. Por lo tanto, con la observación de estros

por lapsos de 30 minutos dos veces al día se puede lograr una detección de estros de alrededor de 70% (Van Vliet y Van Eerdenburg, 1996), pero para lograr una tasa de detección del estro del 90% es necesario observar a las vacas durante 20 minutos entre 3 a 5 veces al día (Diskin y Sreenan, 2000).

#### 2.2.3.3 Hora del día

Diversos estudios han demostrado que las vacas lecheras tienen una tendencia a mostrar el celo durante las primeras horas de la mañana y en las últimas horas del atardecer e incluso durante la noche. Hurnic *et al.* (1975) realizaron un estudio en el cual utilizaron videocámaras para observar durante las 24 horas del día a vacas alojadas en un sistema de “free stall”, encontrando que cerca de 70% de las montas sucedieron entre las 7 pm y las 7 am. Las observaciones después del ordeño y la alimentación incrementan la tasa de detección (Van Vliet y Van Eerdenburg, 1996). Se ha observado también que al momento de trasladar en grupo a las vacas hacia el ordeño o a algún corral con piso de tierra (asoleadero) se mejora la tasa de detección de celo (Nebel *et al.*, 2000).

#### 2.2.4 Ayudas para detectar el estro

El uso de ayudas para la detección de vacas en estro ha sido ampliamente difundida en los hatos lecheros; la mayoría de estas herramientas se basa en la identificación de algún cambio de comportamiento de la vaca en estro (Lucy, 2009).

Senger (1994) propuso que el sistema ideal para la detección del celo debería incluir: supervisión continua de la vaca, identificación automática y precisa, funcionalidad durante toda la vida útil y requerir mínimo trabajo.

Se han desarrollado una gran variedad de sistemas en respuesta a los requerimientos propuestos por Senger. El podómetro, ya sea instalado en una pata o en el cuello, registra el número de pasos. El comportamiento de monta se puede detectar a través del uso de sistemas como el dispositivo electrónico de radiotelemetría HeatWatch o bien, mediante parches

(Estroject), capsulas de pintura (Kamar Products), toros vasectomizados o con pene desviado equipados con un chin ball y los métodos basados en la aplicación de pintura en la base de la cola (Diskin y Sreenan, 2000).

Sin importar el método que sea empleado, el éxito del programa de detección del estro requieren de un adecuado y oportuno manejo e interpretación de los resultados (Stevenson, 2009).

### **2.3 Sincronización del estro**

El principal factor que limita el rendimiento reproductivo en muchos hatos lecheros es la falta de detección del estro de manera oportuna y precisa. Diversos estudios indican que el intervalo entre partos óptimo es de 13 meses (Lucy *et al.*, 1986). La tasa de detección del estro y los días a primer servicio, incluido el período de espera voluntario (PEV), son los factores clave que afectan la duración del intervalo entre partos (Nebel y Jobst, 1998). El incremento de la tasa de detección del estro mejora la tasa de preñez, lo que conduce a intervalos entre partos más cortos. Lucy *et al.* (1986) sugirieron que los métodos de sincronización del estro que optimicen los resultados de la primera inseminación y reduzcan la variabilidad en los días a primer servicio pueden ser útiles en la reducción del intervalo entre partos.

La sincronización del estro implica la manipulación del ciclo estral para que el estro se presente en un periodo determinado (Odde, 1990). Las ventajas de la sincronización del estro en vacas lecheras son: reducir los días a primer servicio, mejorar la tasa de gestación, aumentar la expresión de la conducta estral, y en consecuencia disminuir los días abiertos (Washburn y Dailey, 1987).

La base fisiológica para el control del estro consiste en la manipulación de la fase lútea del ciclo. Esto se puede lograr prolongando artificialmente la fase lútea del ciclo estral mediante la utilización de progestágenos, o bien, acortando la fase lútea mediante la destrucción (lisis) del CL, para lo cual se usa PGF2 $\alpha$ . Los tratamientos de sincronización del estro más recientes combinan diferentes hormonas que controlan la duración de la fase lútea

y la dinámica folicular para conseguir una sincronización del estro más precisa y una mejor fertilidad (Odde, 1990; Lamb *et al.*, 2009; Xu, 2011).

### 2.3.1 Sincronización del estro con progestágenos

La P<sub>4</sub> altera la función ovárica en la vaca mediante la supresión del estro y la ovulación, debido a que inhibe la frecuencia de la secreción pulsátil de LH, lo cual suprime la maduración folicular e inhibe la ovulación. Sin embargo, la P<sub>4</sub> no suprime la secreción de FSH, por lo que las ondas foliculares continúan presentándose de manera regular en presencia de un CL funcional (Colazo y Mapletoft, 2014).

En un grupo de hembras en distintas fases del ciclo estral, el tratamiento con un progestágeno durante más de 14 días producirá un inicio sincronizado del estro dentro de los 2-3 días después de retirar los progestágenos. Si el tratamiento con progestágenos inicia después del día 4 del ciclo estral el tratamiento no evita la luteólisis, por lo que el estro y la ovulación se producirán una vez que se retire el progestágeno. Si el tratamiento se realiza en la etapa temprana del ciclo estral (días 0-4), se afecta la formación de CL y se acorta su vida media por lo que al retirar el progestágeno no deberá haber un CL (Xu, 2011).

Un efecto adverso de la sincronización del estro con progestágenos, si estos son demasiados largos es la disminución de la tasa de gestación. Cuanto más largo sea el tratamiento con progestágenos, mejor será la sincronía, pero menor será la tasa de gestación. A través de estudios de dinámica folicular se sabe que la reducción en la tasa de gestación se debe principalmente al desarrollo de folículos dominantes persistentes durante el tratamiento. Al ser ovulados una vez concluido el tratamiento, los ovocitos de folículos dominantes persistentes pueden ser fertilizados, pero los embriones resultantes tienen una reducida capacidad de desarrollo. Por esta razón, los programas de sincronización del estro que utilizaban solo progestágenos en tratamientos largos han dejado de utilizarse (Xu, 2011; Colazo y Mapletoft, 2014).

### 2.3.2 Sincronización del estro con PGF2 $\alpha$

La PGF2 $\alpha$  es el tratamiento más utilizado para la sincronización del estro en vacas (Olynk y Wolf, 2008; Bó, 2011). La utilización de PGF2 $\alpha$  conduce a mejores tasas de detección del estro debido a que el número de montas por hembra en estro aumenta con el número de animales en estro, lo cual intensifica las interacciones conductuales (Nebel y Jobst, 1998; Pérez-Marín *et al.*, 2015). La respuesta a la inducción del estro con PGF2 $\alpha$  es cercana al 75% de los animales tratados (Méndez-Mendoza *et al.*, 1995; Gaines, 1994; Cairoli *et al.*, 2006). Sin embargo, la respuesta depende entre otras cosas, de la etapa del ciclo estral (presencia de un CL funcional) en la que se encuentre la vaca y de la fase de desarrollo del folículo dominante en el momento del tratamiento, por lo que el intervalo desde el tratamiento hasta la manifestación del estro varía entre 2 a 7 días (Nebel y Jobst, 1998).

Si la PGF2 $\alpha$  se inyecta en el día 1 al 5 del ciclo estral no se observa respuesta debido a que el CL está en formación y aún no es sensible a la hormona; después del día 6 el CL ya es susceptible al efecto de la PGF2 $\alpha$  (Bó, 2011). Utilizando estudios de ecografía se demostró que si se inyecta PGF2 $\alpha$  cuando el folículo dominante de una onda se encuentra en la última fase de crecimiento o en la primera fase estática, el estro y la ovulación se producirá entre 3 y 4 días después, mientras que si se aplica cuando el folículo dominante se encuentra en la fase estática tardía (en proceso de atresia) el estro y la ovulación ocurrirá, entre 5 y 7 días postratamiento (Bó *et al.*, 2004).

Las causas de falla en la luteólisis cuando se administra la PGF2 $\alpha$  (10% de las vacas tratadas) no están claras, pero pueden relacionarse con: falta de respuesta del CL, tratamiento demasiado temprano en la fase lútea, vida media corta de la hormona exógena, o técnica incorrecta de inyección intramuscular, ya que si se aplica en grasa o en tejido ligamentoso no tiene igual efecto (Peters y Ball, 1995; Cairoli *et al.*, 2006).

Varios estudios indican que la tasa de gestación para vacas y vaquillas sincronizadas con PGF2 es similar al obtenido durante un estro natural (Islam, 2011).

En función de los conocimientos sobre la sensibilidad del CL a la PGF2 $\alpha$ , se han diseñado diferentes programas para agrupar o sincronizar los celos. Cabe recordar que los diferentes

esquemas que utilizan solamente a la PGF2 $\alpha$  para sincronizar los celos no controlan la dinámica folicular (Bó, 2011).

#### 2.3.2.1 Inyección de una dosis de PGF2 $\alpha$

Este protocolo se basa en la administración estratégica de PGF2 $\alpha$  a las vacas que se han sido identificadas con un CL mediante una palpación transrectal (Cavaliere *et al.*, 2006). La habilidad del técnico para identificar un CL, y por lo tanto para seleccionar una vaca elegible para el tratamiento con PGF2 $\alpha$  puede no ser confiable (Kristula *et al.*, 1992). La precisión de la palpación transrectal para detectar un CL funcional es del 70-80% (Méndez-Mendoza *et al.*, 1995; Cairoli *et al.*, 2006). La ventaja de este tipo de tratamientos es el ahorro en los costos de la hormona (Islam, 2011).

#### 2.3.2.2 Doble inyección de PGF2 o presincronización

Se han desarrollado estrategias de tratamiento sistemático con PGF2 $\alpha$  para sincronizar el estro en grupos de vacas. El uso de dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  con intervalo de 11 o 14 días de diferencia se ha utilizado ampliamente en vacas lecheras, siendo un sistema relativamente barato y práctico (Moreira *et al.*, 2001; Lucy, 2004).

Heuwieser *et al.* (1997) demostraron mediante un modelo de simulación, que el desempeño reproductivo y la rentabilidad económica obtenidos después de la administración sistemática de PGF2 $\alpha$  sin examen previo de los animales, son más altos que los obtenidos tras la administración de PGF2 $\alpha$  solamente cuando se detecta un CL por palpación transrectal o cuando se miden los niveles séricos de P<sub>4</sub>. Kristula *et al.* (1992) demostraron que las vacas que recibieron dosis sistemáticas de PGF2 $\alpha$  tenían una tasa de gestación del 30% más alta que las vacas que recibieron PGF2 $\alpha$  basado en la palpación transrectal del CL.

Se ha obtenido una tasa de detección del estro del 55% con la inyección de 2 dosis de PGF2 $\alpha$  (Chebel y Santos, 2010). Sin embargo, el intervalo a la presentación del estro después de la

segunda inyección de PGF2 $\alpha$  es variable, por lo tanto es necesario realizar la detección del estro cuando se trabaja con este tratamiento (Lucy, 2004).

Se espera que la presincronización con PGF2 $\alpha$  mejore la tasa de gestación a primer servicio debido a que mejora la salud reproductiva, aumenta el número de ciclos estrales antes de la inseminación y, si se utiliza el protocolo de IATF se estaría iniciando el programa en una etapa más favorable del ciclo estral para que ocurra una ovulación más sincronizada (Moreira *et al.*, 2001).

### 2.3.3 Combinación de tratamientos

Para mejorar la precisión de la sincronía y reducir los efectos adversos sobre la fertilidad se han desarrollado diversos programas de tratamiento que implican una combinación de dos o más fármacos.

#### 2.3.3.1 Progestágenos y PGF2 $\alpha$

El tratamiento con un progestágeno en combinación con PGF2 $\alpha$  es un programa comúnmente utilizado para la sincronización del estro. Por lo general, implica un período corto del tratamiento con progestágenos (comúnmente 6-8 días), seguido por una inyección de PGF2 $\alpha$  uno a dos días antes o en el momento de finalizar el tratamiento con progestágenos (Lucy, 2004). La mayoría de los animales tratados (85% o más) muestra estro entre 2 a 5 días después de finalizar el tratamiento. Se ha observado que el tiempo y la intensidad del estro se ven afectados por el día en que se inyecta la PGF2 $\alpha$ ; así, si se inyecta 1-2 días antes de finalizar el tratamiento con progestágenos, el estro inicia en el segundo día después del tratamiento, pero si la PGF2 $\alpha$  se inyecta al finalizar el tratamiento el estro se produce al tercer día (Xu, 2011).

### 2.3.3.2 GnRH y PGF2 $\alpha$

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con GnRH y 7 días antes de inyectar la PGF2 $\alpha$  puede mejorar la eficiencia de la sincronización de estros (Macmillan, 2010). La inyección de GnRH induce la ovulación de los folículos dominantes existentes y posteriormente la formación de un CL, evitando que la mayoría de los animales tratados en la fase lútea temprana muestren estro antes de la inyección de PGF2 $\alpha$ . El estro y la ovulación se producen entre 2 y 3 días después de la inyección de PGF2 $\alpha$  (Lucy, 2004). Sin embargo, el tratamiento con GnRH se hace en la fase lútea tardía, entre el 5 y el 10% de las vacas tratadas pueden mostrar estro en el periodo comprendido entre la inyección de GnRH y PGF2 $\alpha$ , lo que reduce la eficacia de este programa (Xu, 2011).

## 2.4 Gonadotropina coriónica equina

La gonadotropina coriónica equina (eCG), originalmente llamada gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), fue descrita por primera vez por Cole y Hart, y se detectó casi simultáneamente por Zandek en 1930 (Citados por De Rensis y López-Gatius, 2014). La eCG es una hormona glicoproteica, sintetizada por las copas endometriales de la yegua gestante, las que se originan a partir de las células epiteliales que se desprenden del cinturón coriónico y se entierran en el endometrio, en donde proliferan para formar las copas endometriales. La síntesis de esta hormona inicia alrededor del día 35 de la gestación y se mantiene aproximadamente hasta el día 120 de gestación (Allen y Moor, 1972). La función de la eCG en la yegua es estimular la función lútea e inducir cuerpos lúteos accesorios para apoyar la preñez temprana (Murphy, 2012).

La eCG pertenece a la misma familia que la FSH, LH y a la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Está constituida por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por enlaces no covalentes, la subunidad  $\alpha$  es la misma que la de la LH y FSH equinas, ya que son codificadas por el mismo gen. La subunidad  $\beta$  es la responsable de la actividad hormonal específica, su estructura primaria es idéntica a la de la subunidad  $\beta$  de la LH equina ya que están codificadas por el mismo gen. La eCG y la LH equina solo difieren en su patrón de glicosilación, lo que

explica la similitud de los efectos biológicos de la LH equina y la eCG (Pedroso y Gómez, 1999; De Rensis y López-Gatius, 2014). En la yegua la eCG actúa sobre los mismos receptores que la LH, por lo que se les ha llegado a denominar receptores de LH/eCG. La eCG es capaz de unirse tanto a los receptores de FSH y como a los de LH situadas dentro de las células de la granulosa y la teca del folículo (Murphy y Martinuk, 1991).

La eCG presenta dos características que la distinguen de otras hormonas glicoproteicas, la primera es que posee actividad FSH y LH cuando es administrada en especies distintas al equino (Murphy, 2012); y la segunda característica es su elevado peso molecular debido al alto contenido en carbohidratos, especialmente ácido siálico en la subunidad  $\beta$ , por lo que no logra atravesar el filtro renal. Esto provoca que en el equino tenga una vida media de 26 horas y en la vaca llegue a persistir más de 10 días en la circulación sanguínea (De Rensis y López-Gatius, 2014). Esta característica favorece su uso en los programas de superovulación y transferencia de embriones, siendo necesario inyectar una sola dosis de eCG, a diferencia de la FSH cuya vida media es extremadamente corta y requiere de aplicaciones múltiples.

Por otra parte, la eCG estimula la producción de estradiol en las células de la granulosa y de P<sub>4</sub> en el CL (Baruselli *et al.*, 2004). El aumento de la producción de E<sub>2</sub> folicular inducido por la eCG parece estar relacionado con un aumento de ARNm para la enzima citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17-20 liasa y de receptores para LH (Soumano *et al.*, 1996; 1998).

#### 2.4.1 Dosis de eCG utilizada en bovinos

Bellows y Short (1972) demostraron que 500 UI de eCG no provocan ovulación múltiple en vaquillas lecheras, pero dosis mayores a 1,000 UI si lo hacen (Citados por Kenyon *et al.*, 2012). La dosis utilizada para promover la ovulación oscila entre 200 y 1,000 UI en programas de sincronización del estro y la ovulación, mientras que la dosis requerida para inducir superovulación es de 2,500 UI (De Rensis y López-Gatius, 2014). La literatura es escasa en relación con la dosis más efectiva de eCG para vacas lecheras. Se han realizado estudios con dosis de 400 UI (Souza *et al.*, 2009; Bryan *et al.*, 2013; Pulley *et al.*, 2013), 500 UI (Rostami *et al.*, 2011; Garcia-Ispierto *et al.*, 2013), 600 UI (Kenyon *et al.*, 2012; Ferreira

*et al.*, 2013), 750 UI (Garcia-Ispuerto *et al.*, 2012) y 800 UI (Kenyon *et al.*, 2012). La dosis utilizada con mayor frecuencia en protocolos de inseminación en vacas lecheras es de 400 UI.

#### 2.4.2 Uso de la eCG en bovinos

La eCG se utiliza para mejorar la tasa de gestación en protocolos de sincronización en ganado de leche y carne debido a que cuando se administra horas previas a la ovulación estimula el crecimiento del folículo dominante, aumenta la proporción de vacas que ovulan e incrementa las concentraciones circulantes de P<sub>4</sub> en el ciclo estral subsiguiente, lo cual favorece el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez (Baruselli *et al.*, 2004; Bó y Baruselli, 2014).

Existe variación en la respuesta a los efectos señalados anteriormente, lo cual obedece principalmente al estado ovárico de las vacas al momento del tratamiento. Así, los efectos son más repetibles en animales en los cuales la función ovárica está comprometida, como en el período postparto, en animales bajo estrés calórico, animales en anestro o en hembras con baja CC (De Rensis y López-Gatius, 2014). En vacas lecheras la incidencia de anestro postparto es un problema menor en comparación con lo que ocurre en vacas de razas productoras de carne (Wiltbank *et al.*, 2002). Sin embargo, alrededor de 25% de las vacas lecheras que aún no han iniciado su actividad ovárica en el día 60 postparto, o algunas comienzan a ciclar pero luego desarrollan quistes foliculares, con el anestro subsiguiente (Stevenson, 2001). No obstante la gran exigencia energética de la vaca productora de leche la ciclicidad postparto se inicia en promedio a los 30 días después del parto en la mayoría de los animales. Es posible que los efectos benéficos de la eCG en vacas lecheras podrían ser mayores para los animales con baja condición corporal, en vacas en anestro o en las vacas de mayor edad (Garcia-Ispuerto *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013). En la figura 1 se resumen los efectos de la eCG cuando se administra en el ganado bovino.

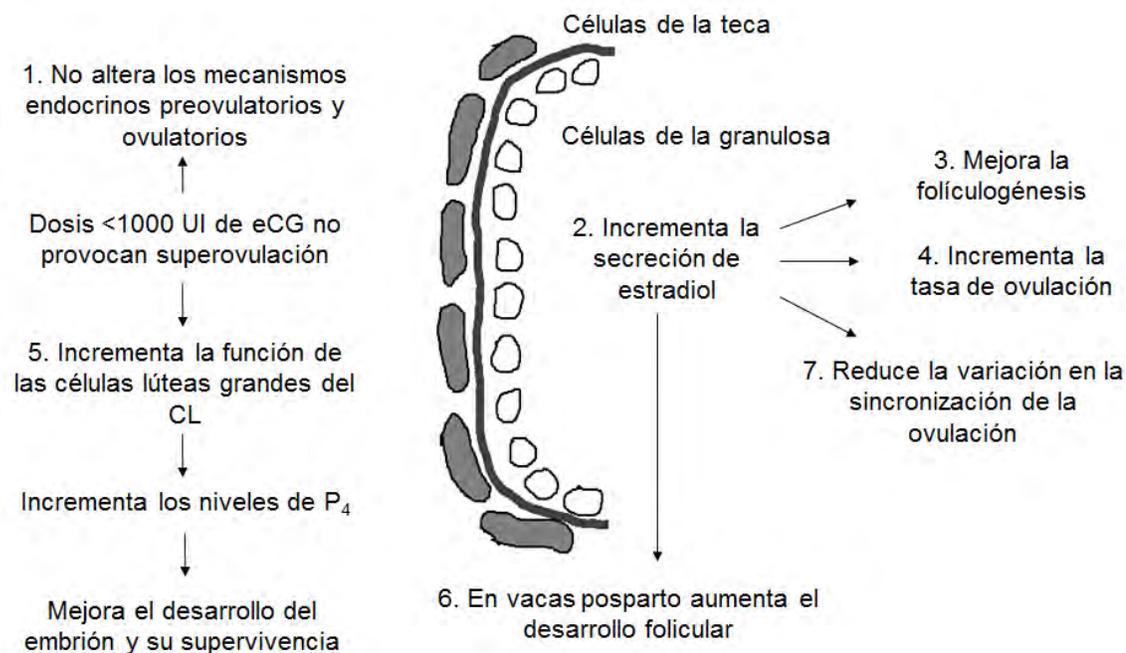


Figura 1. Diagrama que muestra los principales efectos de la eCG sobre la actividad ovárica en vacas. Estos efectos son más evidentes en los animales con una secreción de LH baja (Modificado de De Rensis y López-Gatius, 2014)

#### 2.4.2.1 Incremento del diámetro del folículo dominante

El folículo preovulatorio sintetiza cantidades crecientes de E<sub>2</sub> hasta alcanzar niveles que superan el umbral para que se dispare la secreción preovulatoria de LH (Senger, 2005). McNatty *et al.* (1979) encontraron que el aumento del diámetro del folículo está correlacionado con el incremento de las concentraciones de E<sub>2</sub> en el líquido folicular.

Probablemente el efecto más importante de la eCG es la estimulación del crecimiento del folículo dominante y en consecuencia el incremento en la proporción de las vacas que ovulan después de un tratamiento inductor o sincronizador del estro, especialmente en vacas en anestro posparto y/o con baja CC (Bó *et al.*, 2013). Sin embargo, existen informes contradictorios respecto al efecto de la eCG sobre el crecimiento del folículo dominante. En general los resultados parecen ser mejores para ganado *Bos indicus* que para *Bos taurus*. Sá Filho *et al.*, informaron que el tratamiento con eCG aumenta significativamente el diámetro del folículo dominante (11.4±0.6 vs. 9.3±0.7 mm; P= 0.03) en vacas Nelore amamantado y en anestro (2010b) y en vaquillas Nelore con o sin CL (10.6±0.2 mm vs 9.5±0.2 mm; P=

0.003) (2010a). En contraste, Veneranda *et al.* (2006), Souza *et al.* (2009) y Pulley *et al.* (2013) no observaron ningún efecto de la eCG en el diámetro del folículo ovulatorio en vacas lecheras.

#### 2.4.2.2 Incremento de la actividad estral

Perry *et al.* (2005; 2007) demostraron que las vaquillas y vacas detectadas en estro tienen un folículo dominante de mayor diámetro, mayores concentraciones de E<sub>2</sub>, tasas de gestación más elevadas que las no demuestran comportamiento estral. En estudios de campo en los cuales evaluaron los resultados de diversos programas de sincronización encontraron un incremento en la tasa de gestación en vacas lecheras que se detectaron en estro después de la estimulación con estrógenos (Pancarci *et al.*, 2002; Stevenson *et al.*, 2004), lo que sugiere que el aumento de E<sub>2</sub> durante el proestro podría mejorar la tasa de gestación, por lo que estimular el desarrollo del folículo preovulatorio con eCG, podrían aumentar las concentraciones de E<sub>2</sub>, lo cual incrementaría la actividad estral. En este contexto, un incremento en la concentración sérica de E<sub>2</sub> intensificaría la conducta estral en vacas lecheras en las cuales el estro es menos evidente (Lopez *et al.*, 2004).

No obstante los efectos señalados de la eCG, los informes de aumento de la actividad estral después de aplicar la eCG son escasos e inconsistentes. Fernández-Abella y Villegas (2002) no observaron efecto en el incremento de la actividad estral en vacas Hereford multíparas tratadas con PGF2 $\alpha$  y 400 UI de eCG; sin embargo, Vilela y Martins (2008), Dos Santos *et al.* (2013) y Pessoa *et al.* (2015) observaron que el tratamiento con eCG incrementó la tasa de detección de estro en protocolos de IATF en vaquillas y vacas.

Como ya se señaló en párrafos anteriores, la eCG se ha utilizado en programas de sincronización del estro e IATF, en los cuales tiene efectos favorables; sin embargo, no existe un estudio que informe si la administración de eCG al momento de inducir la luteólisis mejora la respuesta estral de vacas lecheras.

#### 2.4.2.3 Incremento de la tasa de ovulación

El momento de la ovulación es variable incluso cuando se utilizan protocolos para IATF lo que se debe principalmente a la variación en la respuesta ovulatoria del folículo dominante (Perry *et al.*, 2005). La administración de eCG puede reducir la variación en la sincronización de la ovulación y aumentar la incidencia de la ovulación (tasa de ovulación), mejorando la fertilidad en los protocolos de IATF (Baruselli *et al.*, 2004). Baruselli *et al.* (2004) observaron un incremento del 16% en la tasa de ovulación al utilizar eCG en vacas de carne *Bos indicus* con baja condición corporal ( $\leq 2.25$ ). Sá Filho *et al.* (2010b) demostraron que la administración de eCG después de retirar el progestágeno aumenta la tasa de ovulación en comparación con las vacas que no recibieron eCG. En vacas lecheras no se ha observado que la eCG incremente la tasa de ovulación (Souza *et al.*, 2009; Pulley *et al.*, 2013).

#### 2.4.2.4 Incremento de la actividad lútea y de la secreción de P<sub>4</sub>

El incremento de las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> después de la ovulación se ha asociado positivamente con la capacidad del embrión para producir interferón  $\tau$  y mejorar la supervivencia embrionaria (Mann *et al.*, 1999).

La administración de eCG antes de la ovulación tiene un efecto positivo sobre las concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub> en la fase lútea del ciclo estral subsiguiente (Souza *et al.*, 2009; Kenyon *et al.*, 2012). El aumento de la concentración de P<sub>4</sub> ya es detectable 2 días después del tratamiento con eCG. Este efecto de la eCG es dependiente de las mayores proporciones y funciones de las células lúteas grandes del CL y no se ha observado ningún cambio en el tamaño del CL (Souza *et al.*, 2009). Este efecto se correlaciona con la dosis administrada de eCG cuando la dosis utilizada es de 800 UI el aumento de los niveles plasmáticos de P<sub>4</sub> se produce 7 días postratamiento, pero si la dosis es de 200 UI el aumento se produce 14 días postratamiento (De Rensis y López-Gatius, 2014).

El aumento de las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> mediante la administración de eCG podría evitar la disminución de la fertilidad que se produce debido a las alteraciones fisiológicas que ocurren en animales que se encuentran en estrés calórico y nutricional (Dobson y Smith,

2000), y por las bajas concentraciones de P<sub>4</sub> consecuencia del aumento del catabolismo de las hormonas esteroideas en las vacas lecheras (Sangsritavong *et al.*, 2002; Wiltbank *et al.*, 2006).

#### 2.4.2.5 Incremento de la tasa de gestación

Con la adición de eCG a los protocolos de sincronización se han logrado obtener tasas de gestación cercanas al 50% en vacas de carne con condición corporal  $\leq 2.5$  (Bó *et al.*, 2013). Sin embargo, en vacas lecheras los resultados son variables; así, Souza *et al.* (2009) observaron que el tratamiento con 400 UI de eCG en vacas con condición corporal  $< 2.75$  mejoró la tasa de gestación obteniendo 38% (30/79) comparadas con las testigo [15% (12/79), P  $< 0.05$ ]; por el contrario, no encontraron ningún efecto de la eCG en la tasa de gestación en vacas con condición corporal  $\geq 2.75$  al momento del tratamiento [eCG= 30% (93/311) vs Testigo= 33% (100/302)].

En un estudio en vacas lecheras con partos estacionales y diagnosticadas en anestro por palpación transrectal se observó que la adición de 400 UI de eCG a un tratamiento de IATF a base de progestágenos y benzoato de estradiol produjo un aumento en la tasa de gestación, especialmente en vacas mayores a 5 años de edad (Bryan *et al.*, 2010). Sin embargo en un estudio más reciente en vacas lecheras de alta producción a las que se les administraron 400 o 600 UI de eCG como parte de un protocolo de un protocolo de IATF no se observó ningún efecto en la dinámica folicular, función lútea, ni en la tasa de gestación (Ferreira *et al.*, 2013). Otro estudio corrobora la ausencia de algún efecto favorable en vacas lecheras; en este experimento el tratamiento de 400 UI de eCG administrado 3 días antes de la inseminación en un protocolo de IATF no resultó en un aumento en el tamaño del folículo dominante ni de la tasa de crecimiento 48 horas después del tratamiento; tampoco incrementó la concentración sérica de P<sub>4</sub> en los días 0, 2, 4, 9 y 16 después de la inyección de eCG, ni se modificó la fertilidad (Pulley *et al.*, 2013).

Los estudios en los cuales se ha utilizado eCG en vacas lecheras tienen resultados muy variables. Cabe señalar que la mayor parte de dichos experimentos se han realizado en

programas de IATF. La causa de dicha variación se desconoce y es muy probable que esté relacionada con factores inherentes a las vacas lecheras, como su condición corporal al momento del tratamiento, ciclicidad, producción de leche, número de partos, o factores relacionados con el manejo de los hatos. No obstante, dicha inconsistencia en los resultados crea mayor interés en descifrar los factores e interacciones que determinan dicha variación.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1 Localización**

El presente trabajo se realizó en el Complejo Agropecuario de Tizayuca, Hidalgo; localizado en el altiplano central de México. El clima de la región es templado subhúmedo con lluvias en verano, clasificado como Cwb(e), con una precipitación anual promedio de 624 mm y temperatura media anual de 16.3°C (García, 1987).

#### **3.2 Animales**

Se utilizaron 261 vacas Holstein de diferente número de partos (1 a 8). Al inicio del experimento las vacas tenían 56.9±5.1 días posparto, condición corporal de 2.7±0.2 (evaluada de 1 al 5), producción de leche de 32±7.6 kg/día y no presentaban patologías reproductivas. Las vacas estuvieron en estabulación y recibieron una dieta totalmente mezclada, la cual cubría sus requerimientos nutricionales.

#### **3.3 Tratamientos**

Todas las vacas recibieron una inyección intramuscular de PGF2 $\alpha$  (25 mg Dinoprost<sup>a</sup>) entre los días 37-42 posparto. Catorce días después se realizó una palpación transrectal y las vacas que tuvieron un CL se asignaron al azar en uno de los dos tratamientos: las vacas asignadas al grupo eCG (n= 131) recibieron una inyección intramuscular de 400 UI de eCG<sup>b</sup> y una dosis luteolítica de PGF2 $\alpha$ ; las vacas del grupo testigo (n= 130) sólo recibieron PGF2 $\alpha$ . A todas las vacas se les colocó un parche detector de montas<sup>c</sup> en la región sacrococcígea. Además se detectaron estros mediante observación visual dos horas por la mañana (7 a 9) y dos por la tarde (5 a 7) durante las 96 horas posteriores al tratamiento. Se consideró como respuesta estral a las vacas que durante las primeras 96 horas posteriores al tratamiento aceptaron la monta de otra vaca y/o fueron marcadas como positivas con el parche detector, y que al ser revisadas por vía transrectal presentaron signos genitales confirmatorios de estro (turgencia

---

<sup>a</sup> Enzaprost, CEVA.

<sup>b</sup> Folligon, MSD.

<sup>c</sup> Fasco AP, Argentina.

uterina y moco). La IA se realizó siempre por el mismo técnico 12 horas después de detectado el estro. Las vacas que no se observaron en celo en las primeras 96 h se palparon por vía transrectal y las que mostraron signos genitales de estro fueron inseminadas. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal entre los días 40 y 45 después de la inseminación.

### **3.4 Crecimiento folicular y concentraciones de estradiol**

En 10 vacas de cada tratamiento se realizó un seguimiento del crecimiento del folículo ovulatorio mediante ecografía a las 24, 48 y 72 h después de la inyección de PGF2 $\alpha$ . En el día 12 postratamiento se confirmó la ovulación y el número de CLs presentes mediante ecografía. Debido a factores de manejo del hato, en estas vacas no se tomaron muestras de sangre, pero en otro lote se tomaron muestras sanguíneas de 11 vacas tratadas con eCG y en 9 testigos, en las cuales se determinaron las concentraciones de estradiol 17 $\beta$ . Las muestras se recolectaron a las 24 h y 48 h postratamiento, así como al momento de la inseminación. Las muestras se obtuvieron mediante punción de la vena y/o arteria coccígea, en tubos al vacío sin anticoagulante; las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por dos horas y posteriormente se centrifugaron a 1500 g durante diez minutos para la separación del suero, el cual se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Las concentraciones de estradiol se determinaron mediante un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción unido a enzimas<sup>d</sup>. La sensibilidad del ensayo fue de 9.7 pg/mL y tuvo un coeficiente de variación intraensayo de 4%.

### **3.5 Análisis estadístico**

Las variables categóricas, presentación del estro (presentó o no presentó) y tasa de gestación (gestante o vacía) se analizaron mediante modelos de regresión logística con el programa IBM SPSS Statistics 20. Se tomaron como variables independientes el tratamiento (eCG o testigo), número de partos (primíparas o multíparas), tipo de puerperio (normal o patológico), condición corporal ( $<2.75$  o  $\geq 2.75$ ) y producción de leche [alta  $\geq 20\%$  del promedio de todas

---

<sup>d</sup> Estradiol EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania

las vacas ( $\geq 38.4$  kg/día) o estándar ( $<38.4$  kg/día)], esta clasificación fue descrita por Cabello y Martínez (1984). Las variables continuas como las concentraciones de estradiol y el diámetro del folículo preovulatorio después del tratamiento se analizaron mediante un modelo multivariado (MANOVA), con previa comprobación de normalidad y homogeneidad. En todos los casos se consideró como diferencia estadísticamente significativa con un valor de  $P \leq 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los resultados de la regresión logística para la variable presentación del estro conductual, no se observó efecto del tratamiento en la proporción de vacas detectadas en estro ni interacción del tratamiento con las otras variables.

Cuadro 1. Proporción de vacas detectadas en estro conductual y Odds ratio (OR) de presentación del estro de acuerdo a las variables en el modelo final de regresión logística.

VARIABLES	Clase	n	Estro	OR	IC 95%	P
Tratamiento	eCG	131	51% (67/131)	1.1	0.67-1.81	0.70
	Testigo	130	53% (69/130)	Ref.		
Número de partos	Primípara	109	52% (57/109)	0.9	0.55-1.61	0.83
	Múltipara	152	52% (79/152)	Ref.		
Tipo de puerperio	Normal	207	51% (106/207)	1.2	0.65-2.20	0.55
	Patológico	54	55% (30/54)	Ref.		
Condición corporal	<2.75	149	51% (76/149)	1.1	0.69-1.86	0.63
	≥2.75	112	54% (60/112)	Ref.		
Producción de leche	Estándar <38.4 kg/día	203	51% (104/203)	1.2	0.66-2.37	0.49
	Alta ≥38.4 kg/día	58	55% (32/58)	Ref.		

Para la tasa de gestación (cuadro 2), tomando en cuenta solamente aquellos animales que fueron inseminados después de expresar signos conductuales de estro, se observa una tendencia a favor del grupo testigo [19/65 (29%) vs 28/67 (42%), eCG y testigo, respectivamente; P= 0.053]. La tasa de gestación no fue afectada por el número de parto, tipo de puerperio, CC, ni por la producción de leche; tampoco se observó interacción entre el tratamiento con dichas variables.

Cuadro 2. Tasa de gestación (G/IA) y Odds ratio (OR) de gestación de las vacas detectadas en estro conductual de acuerdo a las variables en el modelo final de regresión logística.

Variables	Clase	n	G/IA	OR	IC 95%	P
Tratamiento	eCG	65	29 % (19/65)	0.46	0.21-1.01	0.053
	Testigo	67	42 % (28/67)	Ref.		
Número de partos	Primípara	54	31 % (17/54)	0.66	0.29-1.48	0.314
	Multípara	78	38 % (30/78)	Ref.		
Tipo de puerperio	Normal	102	39 % (40/102)	2.3	0.88-6.02	0.091
	Patológico	30	23 % (7/30)	Ref.		
Condición corporal	<2.75	75	32 % (24/75)	0.55	0.25-1.21	0.137
	≥2.75	57	40 % (23/57)	Ref.		
Producción de leche	Estándar <38.4 kg/día	101	36 % (36/101)	1.08	0.43-2.72	0.862
	Alta ≥38.4 kg/día	31	35 % (11/31)	Ref.		

La respuesta estral, considerando tanto los cambios conductuales (aceptación de la monta) como el estro detectado mediante los cambios genitales, fue similar ( $P= 0.39$ ;  $OR= 1.31$  e  $IC\ 95\%= 0.7-2.5$ ) entre los tratamientos [79% (103/131) y 82% (107/130), grupos eCG y testigo, respectivamente] y no fue afectada por el número de parto, tipo de puerperio, CC, ni por la producción de leche; tampoco se observó interacción entre el tratamiento con dichas variables. Asimismo, la tasa de gestación tomando en cuenta a todas las vacas independientemente si mostraron estro conductual o solamente genital, también fue similar entre los tratamientos [30% (30/99) y 32% (33/102), grupo eCG y testigo, respectivamente;  $P= 0.67$ ] y no fue afectada por el número de parto, tipo de puerperio, CC, ni por la producción de leche, como se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tasa de gestación (G/IA) y Odds ratio (OR) de gestación de las vacas considerando estro conductual y genital de acuerdo a las variables en el modelo final de regresión logística.

Variables	Clase	n	G/IA	OR	IC 95%	P
Tratamiento	eCG	99	30 % (30/99)	1.15	0.61-2.13	0.67
	Testigo	102	32 % (33/102)	Ref.		
Número de partos	Primípara	81	28 % (23/81)	1.57	0.77-3.18	0.22
	Múltipara	120	33 % (40/120)	Ref.		
Tipo de puerperio	Normal	156	34 % (53/156)	0.61	0.27-1.37	0.23
	Patológico	45	22 % (10/45)	Ref.		
Condición corporal	<2.75	116	30 % (35/116)	1.24	0.66-2.35	0.50
	≥2.75	85	33 % (28/85)	Ref.		
Producción de leche	Estándar <38.4 kg/día	152	32 % (49/152)	0.66	0.30-1.44	0.29
	Alta ≥38.4 kg/día	49	29 % (14/49)	Ref.		

Del total de vacas en las cuales se les realizó ecografía de los ovarios, tres vacas (dos del grupo eCG y una testigo) no ovularon y formaron un quiste folicular. Por otra parte, dos de las vacas del grupo eCG tuvieron doble ovulación (dos CLs) mientras que todas las vacas del grupo testigo tuvieron una sola ovulación (cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de animales que ovularon y número de ovulaciones en vacas tratadas con 400 UI de eCG al momento de la inyección de PGF2 $\alpha$  y testigos.

Tratamientos	n	Porcentaje de ovulación	Número de ovulaciones
eCG	10	80% (8/10)	2/8 (25%)
Testigo	10	90% (9/10)	0/9 (0%)
		P= 0.531	P= 0.136

Las vacas tratadas con eCG tuvieron concentraciones de estradiol similares (P= 0.09) a las vacas testigo (Cuadro 5). No hubo efecto del tiempo (P= 0.10), ni interacción entre el tratamiento y el tiempo (P= 0.64).

Cuadro 5. Concentraciones séricas de estradiol (pg/mL; media  $\pm$  error estándar) a las 24 y 48 horas postratamiento y al momento de la inseminación después del tratamiento con 400 UI de eCG y testigos.

Tratamiento	24 h	48 h	IA	P
eCG	31.0 $\pm$ 22.0	41.7 $\pm$ 18.1	32.9 $\pm$ 19.8	0.09
Testigo	47.4 $\pm$ 18.6	52.3 $\pm$ 14.9	51.2 $\pm$ 20.3	

El tiempo entre la presentación del estro después de la inyección de la PGF2 $\alpha$  fue similar (P> 0.05) entre los tratamientos (78.4 $\pm$ 16.5 h vs 78.6 $\pm$ 18.8 h; eCG y testigo, respectivamente). El tratamiento con eCG no afectó el diámetro del folículo ovulatorio a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección de la PGF2 $\alpha$  (Figura 2).

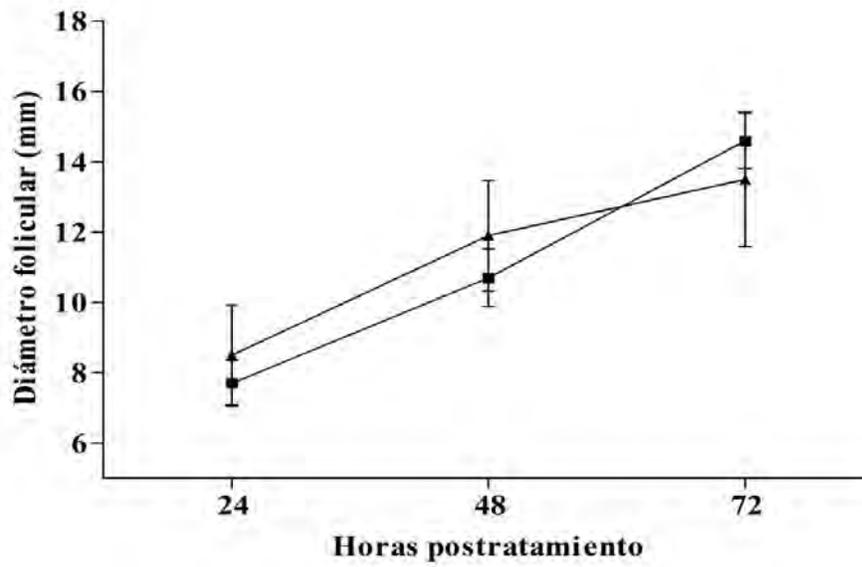


Figura 2. Diámetro folicular (mm) a las 24, 48 y 72 horas postratamiento de vacas lecheras tratadas con 400 UI de eCG (▲) al momento de la luteólisis con PGF2 $\alpha$  y testigos (■) (P= 0.68).

## 5. DISCUSIÓN

La inyección de eCG simultáneamente con la inducción de la luteólisis con PGF2 $\alpha$  no mejoró la respuesta estral. Estos resultados son diferentes a lo que se esperaba, ya que en algunos trabajos se ha informado que la eCG favorece el desarrollo folicular y la secreción de estradiol (Baruselli *et al.*, 2004; Small *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2010b); por lo cual se propuso que las vacas tratadas con eCG al momento de la inducción de la luteólisis mostrarían un estro más intenso, lo que aumentaría la proporción de vacas detectadas en estro. La respuesta estral en este trabajo contrasta lo obtenido en algunos estudios en ganado de carne con protocolos basados en progestágenos y eCG al momento de retirar el progestágeno (Vilela *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2013; Pessoa *et al.*, 2015); sin embargo, también hay estudios con protocolos similares, en los cuales no se ha mejorado la respuesta estral (Fernández-Abella y Villegas, 2002; Duffy *et al.*, 2004).

En ganado lechero no existe una publicación en la cual se haya evaluado el efecto de la eCG sobre la respuesta estral en vacas lecheras sincronizadas con PGF2 $\alpha$ . Sin embargo, en estudios recientes se ha evaluado su efecto en programas ligados a la IATF y se han encontrado efectos favorables en la proporción de vacas gestantes tanto en ganado productor de carne (Baruselli *et al.*, 2004; Bó *et al.*, 2013) como en ganado lechero (Mian y Brogliatti, 2007; Souza *et al.*, 2009; Bryan *et al.*, 2010; Bó *et al.*, 2013). No obstante, en otros estudios su efecto ha sido nulo (Ferreira *et al.*, 2013; Pulley *et al.*, 2013). El mecanismo por el cual hay variación en la respuesta observada en ganado lechero a diferentes tratamientos sincronizadores que incluyen eCG no es claro. Parte de la variación puede radicar en las diferencias del tamaño folicular al momento de recibir la eCG. Así, se ha encontrado que la eCG tiene efectos diferentes dependiendo de la etapa del desarrollo folicular; se ha observado que su administración disminuye la atresia folicular de folículos pequeños, aumenta el reclutamiento de folículos menores o iguales de 5 mm y mantiene el crecimiento de folículos medianos y grandes (De Rensis y López-Gatiús, 2014). En el presente estudio, no se determinó la etapa del desarrollo folicular al momento de la inyección de la eCG, por lo tanto la respuesta pudo afectarse debido a este factor. Sin embargo, las vacas venían de un inyección previa de PGF2 $\alpha$ , lo cual tiende a homogeneizar la población folicular al momento de la segunda inyección de PGF2 $\alpha$ , ya que en este momento las vacas que respondieron a la

primera PGF2 $\alpha$  estarían en el diestro temprano, es decir, la mayor parte de ellas tendrían un folículo dominante entre los días 6 a 9 del ciclo estral (Bó, 2004).

En el presente estudio, el crecimiento del folículo ovulatorio fue similar entre los tratamientos; así, las vacas que recibieron eCG tuvieron un folículo ovulatorio de un diámetro igual a las vacas testigo. Este resultado contrasta con lo observado en ganado *Bos indicus*, en donde la inclusión de eCG incrementa el tamaño folicular de manera significativa (Sá Filho *et al.*, 2010a; 2010b). Esta carencia de efecto en las dimensiones del folículo dominante se puede deber a que las vacas lecheras reciben dietas con mayor contenido de energía y suelen tener folículos de mayor tamaño, y al parecer no se benefician de un apoyo gonadotrópico adicional (Bó *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013). Una observación que refuerza el concepto anterior es la respuesta favorable de las vacas lecheras en anestro a los tratamientos que contienen eCG (Bryan *et al.*, 2010; Bryan *et al.*, 2008; Shephard, 2013), es decir vacas con una condición metabólica parecida a la de las vacas *Bos indicus* en posparto y con cría. Otro aspecto que pudo determinar la respuesta, es la dosis de eCG utilizada; en el presente estudio se utilizaron 400 UI de eCG, misma dosis que se ha utilizado en estudios en los cuales se han obtenido resultados positivos, aunque en los estudios de Garcia-Ispuerto y López-Gatius (2013), usaron 500 UI. Los resultados de Ferreira *et al.* (2013) utilizando dosis de 400 o 600 UI de eCG no observaron efecto en la dinámica folicular general ni en la tasa de gestación de vacas lecheras enroladas en un protocolo de IATF.

En el presente estudio, las concentraciones de estradiol fueron similares entre las vacas que recibieron eCG y las testigo. Estos resultados son contrarios a los esperados, ya que la eCG aumenta la capacidad esteroidogénica de los folículos ováricos (Bó y Baruselli, 2014). En caso de haber habido un efecto en las concentraciones de estradiol, este pudo pasar desapercibido debido al elevado metabolismo hepático de las vacas lecheras, lo cual determina la tasa de eliminación del estradiol (Sangsrivong *et al.*, 2002). En el presente estudio las vacas en promedio produjeron 32 $\pm$ 7.6 kg/día de leche en el día de la inyección de eCG. Por otra parte, es posible que la amplia variación de las concentraciones de estradiol encontrado entre vacas y el tamaño de la muestra pudiera determinar la incapacidad para observar una diferencia en los niveles de estradiol sérico.

Cabe señalar la falta de efecto de la producción de leche en la eficiencia en la detección de estros, así como la inexistencia de interacción entre el tratamiento y la producción de leche. En el presente estudio se clasificó a las vacas como altas productoras ( $\geq 38.4$  kg/día) o producción estándar ( $< 38.4$  kg/día) y ambas tuvieron la misma probabilidad de ser observadas en estro.

A pesar del uso de parches detectores de monta y a la observación visual en periodos de dos horas por la mañana y dos por la tarde, la eficiencia global en la detección de estros fue baja (52%), resultado que coincide con observaciones previas realizadas en hatos del mismo lugar (Hernández-Cerón *et al.*, 1994), lo que puede deberse en parte a las características de las instalaciones, las cuales tienen pisos de concreto y una alta densidad de animales. Los pisos de concreto tienden a disminuir la intensidad del estro (Britt *et al.*, 1986).

Del total de vacas a las cuales se les caracterizó el desarrollo folicular mediante ecografía después de la inyección de eCG, tres no ovularon y desarrollaron quistes foliculares, y dos tratadas con eCG mostraron ovulación doble. Estos resultados son congruentes con las características de las vacas lecheras altas productoras actuales, las cuales tienen una incidencia elevada de quistes foliculares (entre 20 a 30%), que llegan a presentarse aun en vacas que ya iniciaron su ciclicidad posparto (Pesántez *et al.*, 2012). Por otra parte, la ovulación doble o múltiple es también una condición común en las vacas lecheras de alta producción, lo que se debe a las bajas concentraciones de progesterona sanguínea debidas al elevado metabolismo hepático de esta hormona (Lopez *et al.*, 2005). Debido al tamaño de la muestra no es posible saber si la doble ovulación observada en dos vacas del grupo tratado con eCG se debe al tratamiento. Sin embargo, el número de partos gemelares entre los tratamientos fue bastante bajo, ya que sólo una vaca del grupo testigo lo presentó, por lo que la incidencia real de ovulaciones dobles puede haber sido menor a la encontrada en el pequeño grupo de animales que fueron seguidos por ultrasonografía.

El número de partos no afectó la proporción de vacas en estro. En los programas de presincronización se ha observado que las vacas primíparas responden menos a las inyecciones de PGF2 $\alpha$  que las vacas múltiparas, lo cual obedece a que las vacas primíparas tienen periodos anovulatorios más largos que las múltiparas (Wiltbank *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente estudio las vacas enroladas en los tratamientos fueron seleccionadas

por la presencia de un CL al momento de la inyección de PGF2 $\alpha$ , por lo que no fueron incluidas vacas en anestro. Por otra parte, tampoco el tipo de puerperio afectó la proporción de vacas detectadas en estro. Aunque no hay evidencia de un efecto del puerperio patológico en la respuesta a un programa de sincronización con PGF2 $\alpha$ , es pertinente mencionar que sí están documentados efectos de las patologías uterinas en el desarrollo folicular, las cuales afectan negativamente el inicio de la ciclicidad posparto; sin embargo no hay estudios que muestren efectos negativos en la función ovárica después del inicio de la ciclicidad (Santos y Ribeiro, 2014).

La CC no influyó en la expresión del estro; se han documentado efectos de la baja CC en el inicio de la actividad ovárica posparto, en la proporción de vacas gestantes del total inseminadas, así como de la interacción entre la CC y diferentes tratamientos sincronizadores o tratamientos para mejorar la fertilidad (Baruselli *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2009); sin embargo, no se ha mencionado un efecto de la CC sobre la probabilidad de que una vaca sea observada en estro después de un tratamiento con PGF2 $\alpha$ , lo cual es congruente con los resultados del presente estudio.

Es pertinente señalar que en el presente trabajo la detección de estros de forma visual se hizo solamente durante las primeras 96 h después de la aplicación del tratamiento, lo cual pudo haber determinado que la proporción de vacas detectadas en estro fuera baja, ya que las vacas pueden presentar estro entre 48 y 120 h después de la inyección de la PGF2 $\alpha$  (Bó *et al.*, 2004). Sin embargo, todas las vacas que no habían mostrado estro conductual en las primeras 96 h se palparon por vía transrectal para identificar signos genitales de estro (moco estral y turgencia uterina). Esta palpación permitió encontrar más vacas que estaban en estro y no habían sido identificadas por observación visual, de tal manera que la respuesta estral total fue de 79% en las vacas tratadas con eCG y 82% en las testigo. Este hallazgo refuerza los resultados mencionados acerca de la pobre detección de estros por medio de la observación. Asimismo, la tasa de gestación incluyendo a las vacas detectadas de forma visual y genital fue similar en ambos grupos [eCG= 30/99 (30%) y testigo= 33/102 (32%)]. No se puede afirmar en el presente estudio que de haber prolongado el periodo de observación de estros se hubiera detectado a las vacas identificadas mediante palpación transrectal. Sin embargo, lo que sí se puede resaltar es la importancia clínica de la palpación de las vacas que no hayan

mostrado signos externos de estro después del tiempo esperado, ya que habrá vacas que estén en estro pero que por diversos factores no sean detectadas visualmente. Pero se debe tener en cuenta que algunas vacas detectadas en estro con base en la palpación transrectal pueden ser falsos positivos ya que de acuerdo a nuestros resultados la tasa de concepción de las vacas inseminadas con base en los hallazgos genitales fue menor que las de estro detectado, lo que significa que la detección de estros basado en la palpación transrectal puede tener baja precisión, lo cual afecta negativamente la tasa de gestación.

Cuando se toman en cuenta solamente a las vacas que fueron inseminadas después de haber sido detectadas en estro conductual la tasa de gestación tendió a ser mayor en el grupo testigo, sin embargo el número de observaciones es reducida. Por el contrario, si tomamos en cuenta solo a las vacas que se inseminaron con estro genital [32% (11/34) vs 14% (5/35), grupo eCG y testigo, respectivamente] se observa una diferencia numérica a favor del grupo eCG, sin embargo no se puede considerar que exista un efecto de interacción entre el tratamiento y el tipo de estro por el limitado número de muestras.

Al recalcular la tasa de gestación considerando las vacas inseminadas a estro detectado y las inseminadas porque mostraron signos genitales de estro, no hubo diferencia en la tasa de gestación. La tasa de gestación global encontrada en este estudio es similar a la obtenida en varios estudios realizados en hatos del mismo lugar (Rodríguez-Castañeda et al., 2009; Morales-Roura et al., 2001; Fabiela et al., 2012). El número de vacas incluidas en el experimento es limitado para evaluar efectos de interacciones del tratamiento con otras variables.

## **6. CONCLUSION**

Se concluye que la administración de 400 UI de eCG al momento de la inyección de PGF2 $\alpha$  no mejoró la respuesta estral ni la tasa de gestación en vacas lecheras.

## 7. REFERENCIAS

- Adams G, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69, 72-80.
- Allen WR, Moor RM. 1972. The origin of the equine endometrial cups. *J. Reprod. Fertil.* 29:313–316.
- Aungier SP, Roche MJF, Sheehy M, Crowe MA. 2012. Effects of management and health on the use of activity monitoring for estrus detection in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:2452–2466.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 479–486.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p.137-42.
- Bó GA, Baruselli PS. 2014. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal*, 8:s1, pp 144–150.
- Bó GA, Cutaia I, Baruselli PS. 2004. Programas de inseminación artificial y transferencia de embriones a tiempo fijo. *Biotecnologia da reprodução em bovinos, 1o Simpósio internacional de reprodução animal aplicada.* pp 56-81.
- Bó GA. 2011. Programas de IATF en ganado bovino lechero. *SPERMOVA*, 1(1): 34-43.
- Britt JH, Scott RG, Armstrong JD, Whitacre MD. 1986. Determinants of estrous behavior in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.*; 69(8):2195-202.
- Bryan MA, Bó GA, Heuer C, Emslie FR. 2010. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronised AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, 22:126-131.
- Bryan MA, Bó GA, Mapletoft RJ, Emslie FR. 2013. The use of equine chorionic gonadotropin in the treatment of anestrus dairy cows in gonadotropin-releasing hormone/progesterone protocols of 6 or 7 days. *J Dairy Sci*, 96:122-131.
- Bryan MA, Emslie FR, Heuer C. 2008. Comparative efficacy of an 8-day Cue Mate/estradiol benzoate program with or without inclusion of equine chorionic gonadotropin in anestrus dairy cows. *Reprod Fertil Dev.*; 20:85.
- Cabello FE y Martínez CS. 1984. Manual de operaciones de un hato lechero. Sanfer.

- Cairolì F, Mollo A, Veronesi MC, Renaville B, Faustini M, Battocchio M. 2006. Comparison between cloprostenol-induced and spontaneous oestrus fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim.*; 41(2):175-9.
- Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shephard RW, Macmillan KL. 2006. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*.7; 65(1):45-64.
- Cavestany D, Fernández M, Pérez M, Tort G, Sánchez A, Siena R. 2008. Oestrus behavior in heifers and lactating dairy cows under a pasture-based production system. *Vet Quart*; 30 (suppl. 1):10-34.
- Chebel RC, Santos JEP. 2010. Effect of inseminating cows in estrus following a presynchronization protocol on reproductive and lactation performances. *J. Dairy Sci.* 93:4632-4643.
- Colazo MG, López HI, Behrouzi A. 2015. Como lograr altos índices de preñez en los hatos lecheros. Primer Simposio Internacional de Avances en Reproducción Bovina. Guadalajara, México.
- Colazo MG, Mapletoft RJ. 2014. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J.*; 55(8):772-80.
- De Rensis F, López-Gatius F. 2014. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. *Reproduction in Domestic Animals*. Volume 49, Issue 2, pages 177-182.
- Diskin MG, Sreenan JM. 2000. Expression and detection of oestrus in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 40:481-491.
- Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:743-752.
- Dos Santos BJ, Morais GA, Ernandes KL, Saporski SM, Romualdo WR, Walter ID and Formighieri BM. 2013. Temporary calf removal and equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after progesterone-based protocol improves the reproductive performance of beef cattle. *International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports*. Vol. 2013; Article ID 781569.
- Dransfield MB, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD. 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 81:1874-1882.
- Duffy P, Crowe MA, Austin EJ, Mihm M, Boland MP, Roche JF. 2004. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early postpartum beef cows nursing calves. *Theriogenology*; 61:725-34.

- Fabiela CLE, Hernández BJ y Fausto RE. 2012. Parámetros productivos y reproductivos en 15 unidades productoras de leche en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo. XXXVI Congreso Nacional de Buiatría; Mérida, Yucatán. pp 384.
- Fernández-Abella D, Villegas N. 2002. Efecto de la administración de eCG o benzoato de estradiol asociado a PGF2 $\alpha$  sobre la fertilidad de vacas Hereford de baja condición corporal destetadas precozmente. *Agrociencia*. 2: 33–36.
- Ferreira RM, Ayres H, Sales JNS, Souza AH, Rodrigues CA, Baruselli PS. 2013. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Anim Reprod Sci*. 140(1-2):26-33.
- Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. 2011. Oestrus cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.
- Gaines JD. 1994. The use of gonadotropin releasing hormone and prostaglandin for programmed breeding of dairy cattle. *Proceedings of Society for Theriogenology*, pp. 108-120.
- García E. 1987. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. México, DF. Instituto de geografía, UNAM.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F. 2013. A three day PGF2 $\alpha$  plus eCG based fixed-time AI protocol improves fertility over spontaneous estrus in dairy cows with silent ovulation. *J Reprod Dev*; 59:393–7.
- García-Ispuerto I, López-Helguera I, Martino A, López-Gatius F. 2012. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotrophin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. *Reprod Domest Anim.*; 47(5):752-8.
- Hansen PJ. 2005. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. In: *Proceedings of the 7th Western Dairy Management Conference*, Reno, NV pp 63-70.
- Hernández-Cerón J, Porras-Almeraya A, Benítez S. 1994. Eficiencia de la detección de estros y niveles de progesterona al momento de la inseminación de vacas Holstein. *Av. en Inv. Agropecuaria*; 3:12-17.
- Heuwieser W, Oltenacu PA, Lednor AJ, Foote RH. 1997. Evaluation of different protocols for prostaglandin synchronization to improve reproductive performance in dairy herds with low estrus detection efficiency. *J Dairy Sci.*; 80(11):2766-74.
- Holman A, Thompson J, Routly JE, Cameron J, Grove-White D, Smith RF, Dobson H. 2011. Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle. *Vet. Rec.* 169:47-53.
- Hurnik JF, King GJ, Robertson HA. 1975. Estrous and related behavior in postpartum Holstein cows. *Applied Animal Ethology*, Volume 2, Issue 1, 55-68.

- Ingram E. 2009. Presentación y detección de celos. Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, MN, Boise, ID.
- Islam, R., 2011. Synchronization of estrus in cattle: a review. *Veterinary World*. 4, 136-141.
- Kenyon AG, Lopes G Jr, Mendonça LG, Lima JR, Bruno RG, Denicol AC, Chebel RC. 2012. Ovarian responses and embryo survival in recipient lactating Holstein cows treated with equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*; 77(2):400-11.
- Kristula M, Bartholomew R, Galligan D, Uhlinger C. 1992. Effects of a prostaglandin F2 alpha synchronization program in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci.*; 75(10):2713-8.
- Lamb GC, Smith MF, Perry GA, Atkins JA, Risley ME, Busch DC, Patterson DJ. 2009. Reproductive endocrinology and hormonal control of the estrous cycle. North Florida Research and Education Center, University of Florida.
- Lopez HL, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC. 2005. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*; 88(8):2783-93.
- Lopez HL, Satter LD, Wiltbank MC. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81:209-223.
- López-Gatius F, Garcia-Ispierto I, Santolaria P, Yániz J, Nogareda C, López-Béjar M. 2006. Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*; 65(8):1678-89.
- López-Gatius F, Santolaria EP, Mundet I, Yániz J. 2005. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology* 63:1419-1429.
- Lucey S, Rowlands GJ, Russell AM. 1986. The association between lameness and fertility in dairy cows. *Vet Rec*; 118:628.
- Lucy MC, Stevenson JS, Call EP. 1986. Controlling first service and calving interval by prostaglandin F2a, gonadotropin-releasing hormone, and timed insemination. *J. Dairy Sci.* 69:2186-2194.
- Lucy MC. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84:1277-1293.
- Lucy MC. 2004. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Anim Reprod Sci* 82-83: 495-512.
- Lucy MC. 2009. Celo: biología básica y mejoramiento de la detección. *Taurus, Bs. As.*, 11(43):15-27.
- Macmillan KL. 2010. Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *Journal of Reproduction and development*, 56: S42-S47.

- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. 1999. The regulation of interferon- $\tau$  production and uterine hormone receptors during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 54:317-328.
- McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. 1979. The microenvironment of the human antral follicle: Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:851-860.
- Méndez-Mendoza M, Porrás-Almeraya A, Hernández-Cerón J, Galicia LL, Ávila GJ. 1995. Inducción del estro en vacas Holstein con un análogo de la prostaglandina F<sub>2</sub>alfa; influencia de la precisión en la palpación rectal del cuerpo lúteo, falla en la luteólisis y tamaño folicular. *Av en Inv Agropecuaria*, 4.
- Mian L, Brogliatti GM. 2007. Efecto de la aplicación de eCG en protocolos de IATF en vacas en lactancia. *Proc. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC; Córdoba, Argentina*, pp 241.
- Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández-Cerón J, Rodríguez G. 2001. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology*; 55(9):1831-41.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*; 84(7):1646-59.
- Murphy BD, Martinuk SD. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*, 12:27-44.
- Murphy BD. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod*, v.9, n.3, p.223-230.
- Nebel RL, Dransfield MG, Jobst SM, Bame JH. 2000. Automated electronic systems for the detection of oestrus and timing of AI in cattle. *Anim Reprod Sci.*; 60-61:713-23.
- Nebel RL, Jobst SM. 1998. Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review. *J Dairy Sci.*; 81(4):1169-74.
- Nebel RL, Jones CM, Roth Z. 2011. Reproduction, Events and Management. Mating Management: Detection of Estrus. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, Pag. 461-466
- O'Connor ML. 2007. Estrus detection. In: R.S. Youngquist, W.R. Threlfall (Eds.) *Current therapy in large animal theriogenology 2*. Saunders; pp 270–278.
- Odde KG. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci* 68, 817-830.
- Olynk NJ, Wolf CA. 2008. Economic Analysis of Reproductive Management Strategies on US Commercial Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 91:4082–4091.

- Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes LF, Moreira F, Thatcher WW. 2002. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J Dairy Sci*; 82:122-31.
- Pedroso R y Gómez A. 1999. Caracterización de la gonadotropina sérica equina. Su uso en la reproducción animal. Seminario inter-regional "Optimización del proceso de obtención de la hormona PMSG cruda para la reproducción animal". pp 103-112.
- Pérez-Marín CC, Sánchez JM, Vizuite G, Quintela LA, Molina L. 2015. Oestrus synchronisation in postpartum dairy cows using repetitive prostaglandin doses: Comparison between D-cloprostenol and dinoprost. *Acta Vet Hung.*; 63(1):79-88.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5268-5273.
- Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, and Geary TW. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85:684-689.
- Pesántez JL, Ortiz O, Hernández-Cerón J. 2012. Factores asociados con la incidencia de quistes foliculares en vacas lecheras altas productoras. XXXVI Congreso Nacional de Buiatría; Mérida, Yucatán. pp 384.
- Pessoa GA, Martini AP, Carlotto GW, Rodrigues MCC, Claro Júnior I, Baruselli PS, Brauner CC, Rubin MIB, Corrêa MN, Leivas FG, Sá Filho MF. 2015. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*.
- Peters AR, Ball PJH. 1995. *Reproduction in Cattle*. 2nd ed. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Pulley SL, Wallace LD, Mellieon HI Jr, Stevenson JS. 2013. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*; 79(1):127-134.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 80, 301–306.
- Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR, Bunt CR. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev.*; 50:277–320.
- Rodríguez-Castañeda O, Díaz BR, Ortiz GO, Gutiérrez CG, Montaldo HH, García OC, Hernández-Cerón J. 2009. Porcentaje de concepción al primer servicio en vacas Holstein tratadas con hormona bovina del crecimiento en la inseminación. *Vet. Méx [online]*. 2009, vol.40, n.1, pp. 1-7. ISSN 0301-5092.

- Roelofs JB, López-Gatiús F, Hunter RHF, van Eerdenburg FJ, Hanzen C. 2010. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology* 74, 327–344.
- Roelofs JB, van Eerdenburg FJ, Soede NM, Kemp B. 2005. Various behavioral signs of estrus and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 63:1366–1377.
- Rostami B, Niasari-Naslaji A, Vojgani M, Nikjou D, Amanlou H, Gerami A. 2011. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci.*; 128(1-4):100-6.
- Sà Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bó GA, Baruselli PS. 2010b. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 73:651-658.
- Sá Filho MF, Torres-Junior JR, Penteado L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, Castro EPLA, Sales JN, Baruselli PS. 2010a. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, 118:182-187.
- Sangsrivavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:2831–2842.
- Santos JEP, Ribeiro ES. 2014. Impact of animal health on reproduction of dairy cows. *Anim. Reprod.*, v.11, n.3, p.254-269.
- Senger PL. 1994. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J Dairy Sci*; 77:2745–53.
- Senger PL. 2005. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd rev. ed. Current Conceptions, Inc., Pullman, WA.
- Shepherd RW. 2013. Efficacy of inclusion of equine chorionic gonadotrophin into a treatment protocol for anoestrous dairy cows. *N Z Vet J.*; 61(6):330-6.
- Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*; 71:698–706.
- Soumano K, Lussier JG, Price CA. 1998. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. *J Endocrinol*; 156:373–8.

- Soumano K, Silversides DW, Doize F, Price CA. 1996. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod*; 55:1419–26.
- Souza AH, Viechnieski S, Lima F, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72:10-21.
- Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC. 2004. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci*; 87:3298–305.
- Stevenson JS. 2001. Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *J. Dairy Sci.* 84 (E. Suppl.):E128-E143.
- Stevenson JS. 2007. Clinical reproductive physiology. In: Youngquist RS, Threlfall WR editors. *Large Animal Theriogenology 2*. St. Louis, Missouri:Saunders, 2007:258-270.
- Stevenson JS. 2009. Factores asociados al mejoramiento de las tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia. *Taurus*, 11(42):4-19.
- Van Eerdenburg FJ, Karthaus D, Taverne MA, Merics I, Szenci O. 2002. The relationship between estrous behavioural score and time of ovulation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:1150–1156.
- Van Vliet JH, Van Eerdenburg FJ. 1996. Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 50:57–69.
- Veneranda G, Filippi L, Racca D, Romero G, Balla E, Cutaia L, Bó GA. 2006. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and different fixed-time AI protocols. *Reprod Fertil Dev*; 18:118.
- Vilela ER, Martins Jr AP. 2008. Effect of ECP and/or eCG inclusion on synchronization protocol based on progesterone and GnRH as ovulatory stimuli in Nellore and crossbred Nellore x Angus heifers [Abstract]. *Acta Sci Vet*; (Suppl. 2):s640.
- Walker SL, Smith RF, Jones DN, Routly JE, Morris MJ, Dobson H. 2008. The effect of a chronic stressor, lameness, on detailed sexual behaviour and hormonal profiles in milk and plasma of dairy cattle. *Reprod Domest Anim.*; 45(1):109-17.
- Walker WL, Nebel RL, McGilliard ML. 1996. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 79:1555–1561.
- Washburn SP, Dailey RA. 1987. Dairy herd reproductive management programs with or without synchronization of estrus. *J Dairy Sci.*; 70(9):1920-6.

- Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. 2002. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci.*; 85(1):244-51.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*; 57(1):21-52.
- Wiltbank MC, Gümen A, Lopez H, Sartori R. 2007. Manejo y tratamiento de vacas de leche no cíclicas o con quistes foliculares. VII Simposio Internacional de Reproducción animal-IRAC; pp 112-129.
- Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*; 65(1):17-29.
- Wiltbank MC, Pursley JR. 2014. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 81:170–185.
- Xu ZZ, McKnight DJ, Vishwanath R, Pitt CJ, Burton LJ. 1998. Oestrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. *J Dairy Sci.*; 81:2890.
- Xu ZZ. 2011. Reproduction, Events and Management. Control of Estrous Cycles: Synchronization of Estrus. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, pp 448-453.