

# **Efecto de la GnRH postinseminación sobre la concentración plasmática de progesterona y las tasas de concepción en vacas Holstein repetidoras**

Jorge Enrique Cruz Velázquez

## **T e s i s**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

### **MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS**



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro  
Unidad Laguna  
Subdirección de Postgrado

Torreón, Coah., México

Septiembre de 2005

**Efecto de la GnRH postinseminación sobre la  
concentración plasmática de progesterona y las tasas  
de concepción en vacas Holstein repetidoras**

Jorge Enrique Cruz Velázquez

**T e s i s**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS**



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro  
Unidad Laguna  
Subdirección de Postgrado

Torreón, Coah., México

Septiembre de 2005

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna por su hospitalidad y apoyo para realizar la investigación.

Al CONACYT por los recursos facilitados para la investigación.

A mi asesora principal, Dra. Ilda Graciela Fernández García, por su gran apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Alonso Elizondo Vázquez, por su dedicación sobre la presente investigación.

Al Dr. Carlos Leyva Orasma por su asesoría y optimismo sobre la presente investigación.

Dr. Raúl Ulloa Arvizu, por su dedicación y paciencia en la asesoría estadística sobre la investigación.

Al Dr. José Eduardo Favela Reyes, por su apoyo sobre la presente investigación y enseñanzas incondicionales.

A mis maestros, por los conocimientos que me brindaron.

A la MC. Susana Roja Maya y a la MVZ Clara Murcia del laboratorio de Endocrinología de la FMVZ, UNAM, por su apoyo en la interpretación de los resultados del análisis de la progesterona.

A mis compañeros del postgrado, por el ánimo que me dieron y los gratos momentos compartidos.

Al Sr. Indalecio Tricio Gómez, por facilitar las vacas utilizadas en la investigación.

A los técnicos del establo Cantabria; Tomás, Juan y Manuel por su apoyo durante el trabajo experimental.

## **DEDICATORIAS**

A Ti, Dios, que conmigo estás en todo momento y me has guiado a realizar mis sueños y mis metas.

A mi esposa, M. V. Z. Mia Margarita Rascón Hernández, que me has apoyado en todo momento para la realización de mis objetivos.

A mi hijo, Jorge Alberto Cruz Rascón, por tu gran capacidad para hacerme retomar energía y no caer en la rutina.

A mis padres, René Cruz y María Elena Velázquez por la confianza y apoyo que siempre tengo de ustedes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**Efecto de la GnRH postinseminación sobre la concentración plasmática de progesterona y las tasas de concepción en vacas Holstein repetidoras**

**T e s i s**

Por:

**Jorge Enrique Cruz Velázquez**

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS**

Comité Particular de Asesoría

Asesora principal:

\_\_\_\_\_  
Dra. Ilda Graciela Fernández García

Asesor:

\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Alejandro Elizondo Vázquez

Asesor:

\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Leyva Orasma

Asesor:

\_\_\_\_\_  
Dr. Raúl Ulloa Arvizu

\_\_\_\_\_  
M.C. Gerardo Arellano Rodríguez  
Jefe del Departamento de Postgrado

\_\_\_\_\_  
Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila, septiembre de 2005

**Efecto de la GnRH postinseminación sobre la concentración plasmática de progesterona y las tasas de concepción en vacas Holstein repetidoras**

**Tesis**

Por:

Jorge Enrique Cruz Velázquez

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS**

**Asesor**

Dra. Ilda Graciela Fernández García

**RESUMEN**

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de la administración de la GnRH en el día cinco y en el día once postinseminación sobre las concentraciones de progesterona plasmática y las tasas de concepción en vacas Holstein repetidoras durante el verano. De las vacas detectadas en estro, se seleccionaron las vacas repetidoras y fueron inseminadas artificialmente. Las vacas fueron posteriormente asignadas a uno de los siguientes tratamientos: testigo, sin GnRH (n = 34); GnRH-5, 100 µg de GnRH al día 5 (n = 33); GnRH-11, 100 µg de GnRH al día 11 (n = 34) postinseminación. Las vacas fueron alojadas en corrales sin enfriamiento artificial y los datos ambientales fueron colectados diariamente para calcular el THI. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de las vacas en los días 8, 11, 14, 17, 20 y 23 postinseminación, para la determinación de la progesterona (P4) plasmática mediante RIA. El estado de

preñez de las vacas fue evaluado por palpación rectal al día  $43 \pm 3$  postinseminación. Las concentraciones de P4 plasmática, fueron evaluadas mediante un ANDEVA y prueba de Tukey; y las tasas de concepción mediante un análisis de regresión logística. Los datos del medio ambiente indicaron que las vacas experimentaron estrés calórico durante el experimento (THI medio =  $73.79 \pm 0.51$ ). Las concentraciones de P4 plasmática de todas las vacas fueron mayores para el tratamiento GnRH-5 en el día 11 postinseminación ( $P < 0.05$ ). Las tasas de concepción (11.8, 12.1 y 14.7 % para los tratamientos testigo, GnRH-5 y GnRH-11, respectivamente), no fueron diferentes estadísticamente. Cuando se incluyó el THI en el análisis de regresión logística, tampoco se detectaron diferencias. El intervalo entre estros de las vacas cíclicas que no quedaron preñadas fue similar entre los tratamientos. De los resultados de este estudio se concluye que la administración de GnRH en el día 5 o en el día 11 no mejoró las tasas de concepción en vacas Holstein repetidoras.

Palabras clave: vacas Holstein, repetidoras, GnRH, progesterona, tasas de concepción, estrés calórico.

**Effect of GnRH postinsemination on plasma progesterone concentration  
and conception rate in repeat breeding Holstein cows**

**Thesis**

By

Jorge Enrique Cruz Velázquez

Presented as a partial requirement to obtain the degree of

**MASTER IN AGRARIAN SCIENCE**

**Advisor**

Dra. Ilda Graciela Fernández García

**SUMMARY**

The objective of this study was to evaluate the response of GnRH administration on day five or day eleven postinsemination on plasma progesterone concentration and conception rate in repeat breeding Holstein cows during summer. Amongst the cows detected in estrus, only were selected the repeat breeding cows which were artificially inseminated. Cows were then assigned to one of the following treatments: control, no GnRH (n = 34); GnRH-5, GnRH 100 µg on day 5 (n = 33); GnRH-11, GnRH 100 µg on day 11 (n = 34) postinsemination. Cows were housed in open corrals without artificial cooling and environmental data were collected daily to calculate THI. Blood samples were obtained from cows on days 8, 11, 14, 17, 20 and 23 postinsemination for determination of plasma progesterone (P4) by RIA. Pregnancy of cows was evaluated by rectal palpation on day 43 ± 3 postinsemination. Plasma P4

concentrations were evaluated by ANOVA and Tukey test; and conception rates by logistic regression. Environmental data indicated that cows experienced heat stress during the time of experiment (mean THI =  $73.79 \pm 0.51$ ). Plasma P4 concentrations of all the cows were higher for GnRH-5 treatment on day 11 postinsemination ( $P < 0.05$ ). Conception rates (11.8, 12.1 y 14.7 % for control, GnRH-5 and GnRH-11, respectively), were not different statistically. When THI was included in the logistic regression analysis, no differences were detected. Estrus intervals of cyclic cows that did not become pregnant were similar between treatments. From the results of this study, it was concluded that administration of GnRH on day 5 or 11 did not improve conception rates in repeat breeding Holstein cows.

Keywords: Holstein cows, repeat breeding, GnRH, progesterone, conception rate, heat stress.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
I INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Neuroendocrinología del ciclo estral.....	4
2.1.1 Hormona liberadora de gonadotropinas.....	4
2.1.2 Hormonas hipofisiarias.....	5
2.1.3 Hormonas ováricas.....	7
2.1.3.1 Dinámica folicular durante el ciclo estral en la vaca.....	7
2.1.3.2 Funciones de las inhibinas.....	9
2.1.3.3 Función del cuerpo lúteo en la vaca.....	12
2.1.3.4 Mecanismo luteolítico.....	16
2.2 Función del interferón tau durante el reconocimiento materno de la preñez.....	16
2.3 Factores que afectan el comportamiento reproductivo en vacas lecheras.....	18
2.3.1 Estrés calórico.....	18
2.3.1.1 Efectos detrimentales del estrés calórico sobre la fertilidad.....	19

2.3.1.2 Comportamiento hormonal durante el estrés calórico.....	21
2.3.1.3 Efectos del estrés calórico sobre el embrión .....	24
2.3.1.4 Efectos del estrés calórico sobre las concentraciones de progesterona .....	25
2.3.2 Síndrome de la vaca repetidora .....	27
2.3.3 Efectos de la producción de leche sobre la fertilidad .....	28
2.4 Alternativas para contrarrestar los factores que afectan la fertilidad durante el verano .....	29
2.4.1 Enfriamiento corporal .....	29
2.4.2 Tratamiento hormonal para aumentar las tasas de preñez .....	30
2.4.2.1 Uso de progestágenos.....	30
2.4.2.2 Sincronización de estro y la ovulación.....	31
2.4.2.3 Aplicación de hormonas durante la fase luteal .....	33
2.4.2.4 Transferencia de embriones .....	34
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Localización del área de estudio .....	36
3.2 Diseño de la investigación .....	36
3.2.1 Unidades experimentales.....	36
3.2.2 Diseño experimental .....	37
3.2.3 Variables estudiadas.....	37
3.2.3.1 Progesterona .....	37
3.2.3.2 Tasas de concepción.....	38

3.2.3.3 Variables de control .....	38
3.3 Análisis estadístico .....	39
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
4.1 Progesterona .....	41
4.2 Tasas de concepción.....	50
4.3 Intervalo entre estros.....	53
4.4 Variables control.....	54
V CONCLUSIONES.....	57
VI LITERATURA CITADA .....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) para el perfil general de los niveles de P4, de las vacas de las que se obtuvo una muestra de sangre durante el experimento .....	42
2. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 independientemente del estado de gestación de los tres tratamientos.....	44
3. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 para las vacas no gestantes de los tres tratamientos .....	45
4. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 para las vacas gestantes de los tres tratamientos .....	46
5. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 para las vacas gestantes y vacías .....	47
6. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 en vacas gestantes y vacías del tratamiento testigo.....	48
7. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 en vacas gestantes y vacías del tratamiento GnRH-5 .....	49

8. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm$ ee) de la concentración de P4 en vacas gestantes y vacías del tratamiento GnRH-11 .....	49
9. Tasas de concepción (TC) de los tres tratamientos.....	51
10. Intervalo entre estros (días) de los tres tratamientos .....	54

## LISTA DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de las variables control registradas el día de la IA para los tres tratamientos .....	56
Anexo	
1. Prueba corregida para efectos dentro de sujetos en el análisis de perfiles de los niveles de P4 .....	58
2. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) para el perfil general de los niveles de P4, de las vacas muestreadas durante el experimento (n=51) .....	58
3. Prueba de contrastes para mediciones repetidas de los niveles de P4 .....	59
4. Análisis de varianza para los contrastes polinomiales de los perfiles en los tratamientos testigo y GnRH-5 .....	59
5. Análisis de varianza corregido para los perfiles dentro de cada tratamiento .....	60
6. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo y el tratamiento de todas las vacas muestreadas, independientemente del estado de gestación .....	60

7. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo y el tratamiento de las vacas vacías.....	61
8. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo y el tratamiento de las vacas gestantes .....	61
9. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo de todas las vacas vacías contra todas las vacas gestantes .....	62
10. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo en vacas gestantes y vacías del tratamiento testigo .....	62
11. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo en vacas gestantes y vacías del tratamiento GnRH-5 .....	63
12. Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo en vacas gestantes y vacías del tratamiento GnRH-11.....	63

13. Estadístico de Wald para evaluar las variables del modelo de  
regresión logística propuesto para las tasas de concepción..... 64

## I INTRODUCCIÓN

A través del tiempo, el hombre no solamente se ha adaptado al medio ambiente natural, sino que también lo ha alterado, por ejemplo, cuando comenzó a cultivar; a domesticar y a cruzar los animales para obtener leche, carne y fibra; a seleccionar ciertos granos como trigo y cebada para su alimentación; y a combatir el desarrollo de plantas no comestibles. Sin embargo, de igual forma que el hombre ha domesticado sus animales también han surgido una serie de problemas los cuales lo han llevado a combatir enfermedades, obtener alimento o tener forraje disponible y proteger a los animales contra climas adversos.

El ganado europeo fue introducido por primera vez al continente americano por Cristóbal Colón en su segundo viaje en 1493, de tal manera que el ganado ha estado sujeto a diferentes condiciones ambientales, climáticas, culturales y técnicas de manejo, las cuales afectan el desempeño de los animales (Johnson y Vanjonack, 1976).

Al nivel mundial, algunos parámetros reproductivos han sido afectados, como las tasas de concepción al primer servicio en vacas lecheras lactantes, las cuales han sufrido una disminución, de tal manera que en los 40's y 50's fueron mayores a 50%; en los 70's menores a 50%; y en los 90's 40% o menos, se piensa que esa reducción puede ser debida a causas multifactoriales (Sartori *et al.*, 2002; Lopez-Gatius, 2003).

Uno de los factores que altera tanto la eficiencia productiva como la reproductiva de las vacas lecheras es el estrés calórico (EC; Jordan, 2003) y se

le ha asociado a la baja fertilidad de alrededor del 60 % del ganado en el mundo (Roth *et al.*, 2001). Algunos investigadores Howell *et al.* (1994), han estudiado la exposición de las vacas lecheras a temperaturas ambientales elevadas durante el verano que resulta en períodos de baja fertilidad.

El impacto del EC sobre la eficiencia reproductiva está bien documentado y se ha demostrado que altera la duración del estro (Hansen y Aréchiga, 1999), el desarrollo folicular (Wolfenson *et al.*, 1995), el pico preovulatorio de LH y desarrollo del subsiguiente CL (Ullah *et al.*, 1996), la producción de progesterona (P4) luteal (Alnimer *et al.*, 2002) y el desarrollo embrionario (Willard *et al.*, 2003).

La mortalidad embrionaria es un factor que limita significativamente el establecimiento y mantenimiento de la preñez en las vacas, ya que la viabilidad embrionaria disminuye de 59% en el día 7, a 27% el día 14 postinseminación durante la época de calor (Ryan *et al.*, 1993; Funston *et al.*, 2005). Las concentraciones circulantes de P4 en tiempos específicos, así mismo los cambios en otras hormonas como una consecuencia de los patrones de P4, están relacionadas con el mantenimiento de la preñez (Inskeep, 2004). Las vacas repetidoras, son aquellas que aparentemente están saludables y fértiles, pero que no pueden alcanzar la gestación después de varias inseminaciones con toros de fertilidad probada, lo cual tiene que ver con fallas en la fertilización y muerte embrionaria temprana (Aréchiga *et al.*, 2002).

En la comarca lagunera se presenta una disminución en las tasas de concepción durante la época de calor, por lo que el número de vacas repetidoras se incrementa durante esa época (Fernández, 2003).

La inyección de la GnRH o sus agonistas a la mitad del ciclo estral tiene efectos luteotrópicos, debido a que la secreción de P4 por el CL puede ser incrementada en un corto tiempo y hasta más de 12 días después de la administración de la GnRH, mediante la inducción de la liberación de LH y FSH de la glándula pituitaria (Rettmer *et al.*, 1992), por lo que se ha utilizado con el fin de ayudar a la supervivencia del embrión. La liberación de gonadotropinas también puede causar atresia, luteinización u ovulación seguida de luteinización de los folículos, dependiendo del estado folicular, lo cual aparte de la estimulación de la secreción de P4 causa una disminución en la producción de estradiol, que a su vez podría inhibir la formación de receptores de oxitocina y consecuentemente la inhibición de la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  (Peters *et al.*, 2000).

Sobre la base de lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de la administración de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el día cinco y en el día once postinseminación sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona y las tasas de concepción en vacas Holstein repetidoras durante el verano.

## **II REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Neuroendocrinología del ciclo estral**

La transmisión de las señales entre el cerebro y la glándula pituitaria anterior está mediada por mensajeros químicos (neurohormonas) que son transportados por los vasos portahipofisarios desde el hipotálamo a la glándula pituitaria anterior donde estimulan o inhiben la liberación de las hormonas. Las hormonas liberadas de las células de la pituitaria anterior son transportadas en la circulación sanguínea al órgano blanco correspondiente. A su vez, el cerebro está modulado por la retroalimentación negativa de las hormonas secretadas por los órganos blanco de la pituitaria (Conn y Freeman, 2000).

#### **2.1.1 Hormona liberadora de gonadotropinas**

Las neuronas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se originan fuera del sistema nervioso central, en la placa nasal y son las responsables de la función reproductiva como miembros del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas durante la vida postnatal (Wray, 2001).

El ciclo estral resulta de una organización compleja de eventos neuroquímicos y endocrinos que actúan en el sistema nervioso central (SNC), la glándula pituitaria anterior y los ovarios (Halvorson y DeCherney, 1996; Smith y Jennes, 2001).

El sistema neuroendocrino envuelve grupos de células que secretan péptidos y monoaminas en la porción anterior y media del hipotálamo ventral. En general existen dos áreas que contienen cantidades significantes de

neuronas GnRH, la región del septo-preóptico-supraquiasmático y el área mediobasal del *tuber cinerum*, especialmente el núcleo premamilar e infundibular. En la rata y el mono, las terminales que contienen GnRH están en contacto sináptico con neuronas GnRH. También, con fibras catecolaminérgicas, serotoninérgicas, tanto como axones que contienen neuropéptido Y, sustancia P, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, vasopresina, galanina (Conn y Freeman, 2000), así como glutamato, péptido delta inductor del sueño, colecistokinina y neurotensina, terminan sobre neuronas GnRH en regiones que proyectan a la eminencia media (Gore, 2004). Sus productos son transportados a través de fibras nerviosas a las terminales en la eminencia media. De ahí son liberadas al sistema portahipofisario y transportadas a la pituitaria para regular la secreción de las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis (Halasz, 1985; Padmanabhan *et al.*, 2002).

La acción de la GnRH, sobre los gonadotropos es iniciada por interacción con sus receptores sobre la membrana plasmática. La GnRH regula la secreción de hormonas de la pituitaria por mecanismos que envuelven la generación de fosfato inositol con movilización de  $Ca^{++}$  y formación de diacilglicerol con activación de proteína kinasa C (Conn y Freeman, 2000).

### **2.1.2 Hormonas hipofisarias**

La liberación basal de la hormona luteinizante (LH) es pulsátil y sus acciones en las hembras son promover la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo (CL). Las células gonadotróficas constituyen del 5 al 10% de la

población de células de la glándula pituitaria anterior y sintetizan la LH y la hormona folículo estimulante (FSH), cada una de las cuales consiste de dos péptidos diferentes llamados subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Mol y Rijnberk, 1989; Padmanabhan *et al.*, 2002).

Las gonadotropinas sintetizadas son almacenadas en gránulos secretorios en el citoplasma y son secretados por exocitosis mediante la estimulación de la GnRH (Roche, 1996).

Los diferentes patrones de secreción pulsátil de GnRH dentro del sistema porta-hipofisiario, junto con cambios en la respuesta de las células gonadotróficas a GnRH, causan cambios en la secreción de la LH y de la FSH manifestados durante el ciclo estral (Dobson y Smith, 2000; Smith y Jennes, 2001). Durante la oleada de LH se ha observado que los pulsos son extremadamente grandes y la frecuencia alta (más de un pulso cada 15-20 min) según se ha reportado en vacas, ovejas, ratas y en la mujer (Karsch, 1987). La FSH también es regulada por los esteroides y proteínas secretadas por las gónadas, específicamente por la activina, la inhibina y la folistatina. Está bien establecido que la inhibina y la folistatina suprimen potencialmente la FSH y que la activina estimula potencialmente la producción y secreción de FSH (Padmanabhan *et al.*, 2002).

Puede observarse una elevación en las concentraciones de FSH que comienza entre 16 y 24 horas después del pico de LH. Es probable que este incremento sea el pico que estimula la emergencia de la oleada folicular (Kulick *et al.*, 1999). Durante el desarrollo folicular, la FSH se asocia con la proliferación de las células de la granulosa, la formación del antro folicular, el mantenimiento

de la viabilidad de las células de la granulosa y la síntesis de receptores de gonadotropinas en las células de la granulosa. Por su parte, la LH estimula la síntesis de andrógenos en la teca (Smith, 1986; Padmanabhan *et al.*, 2002). Las células de la teca, de la granulosa y del *cúmulus*, conjuntamente sirven para el mantenimiento del oocito y para proveerle un medio ambiente que lo capacite para desarrollarse (Hagemann, 1999).

### **2.1.3 Hormonas ováricas**

La LH y la FSH, ejercen acciones sobre las células de la teca y de la granulosa, respectivamente. Después de la estimulación de la LH, la teca interna sintetiza andrógenos, los cuales subsecuentemente se difunden a través de la membrana y por acción de la aromatasa, una enzima regulada por la FSH, son convertidos a  $17\beta$ -estradiol en las células de la granulosa (Smith, 1986).

El estradiol y la P4 regulan la síntesis y liberación de gonadotropinas a través de los efectos de retroalimentación negativa y positiva sobre el sistema nervioso central y la glándula pituitaria anterior (Looper *et al.*, 2003).

#### **2.1.3.1 Dinámica folicular durante el ciclo estral en la vaca**

El proceso de foliculogénesis en el ovario comienza con la formación de folículos primordiales, cada uno con un ovocito rodeado por una capa simple de células granulosas indiferenciadas. El crecimiento subsecuente del folículo está caracterizado morfológicamente por el tamaño del ovocito, el número de capas de células granulosas cuboidales, la presencia y extensión de la teca y el antro, y los signos de atresia, lo cual culmina en la ovulación o luteinización, pero

mayormente en atresia (Findlay, 1993). Los folículos vienen a ser dependientes de gonadotropinas cuando miden de 3-4 mm de diámetro para el caso de las vacas (Hunter *et al.*, 2004).

El desarrollo folicular ocurre en oleadas que comprenden las fases de reclutamiento, selección, dominancia y atresia. El reclutamiento folicular ocurre cada 7-10 días (Inskeep, 2004). Pocos días después de que emerge la primera oleada, se da la desviación folicular (inicio de la diferencia en la tasa de crecimiento) donde un folículo de la oleada continúa creciendo (folículo dominante) mientras que los otros regresan. Dicha desviación está relacionada con la adquisición selectiva de receptores LH con mayor eficacia de respuesta por el folículo dominante. Durante la desviación, las concentraciones de LH circulantes permanecen elevadas (Kulick *et al.*, 1999). En un estudio realizado por Hagemann (1999), demostró que los días 7 y 15, representan la fase de dominancia de la primera y segunda oleadas foliculares, donde había sido observado un folículo dominante grande al menos por tres días.

Se cree que el folículo dominante es seleccionado debido a que puede competir más efectivamente por gonadotropinas, que los otros folículos subordinados. Éste crece hasta un diámetro de 14-20 mm y sostiene su tamaño por un período de cinco a siete días, usualmente, el ganado tiene dos o tres oleadas foliculares por ciclo estral (Fortune *et al.*, 2004).

La ovulación ocurre como un resultado de una interacción dinámica entre el pico de LH y factores locales incluyendo esteroides, prostaglandinas y péptidos. El pico de LH dispara cambios estructurales y bioquímicos que

conducen a la ruptura del folículo de Graaf, resultando en la expulsión del oocito y el subsecuente desarrollo del CL (Acosta y Miyamoto, 2004).

Durante la fase luteal de un ciclo normal, el folículo dominante no puede ovular debido a que el CL es dominante por virtud de sus secreciones de P4, la cual limita la frecuencia de los pulsos de LH, conduciendo a la atresia de los folículos dominantes. Sin embargo, cuando son expuestos a un pico de FSH y LH, esos folículos responden de manera similar a un folículo ovulatorio durante el estro, demostrado por la presencia de folículos luteinizados y CL accesorios observados después de tratamientos con LH o GnRH durante el ciclo estral en vacas, vaquillas y ovejas. Los patrones de desarrollo folicular y sus secreciones de estrógenos durante los días 14 a 17 o más, después de la inseminación artificial (IA) pueden comprometer la supervivencia del embrión directamente o a través de la interferencia con los mecanismos del reconocimiento materno de la preñez o el mantenimiento luteal (Inskeep, 2004). Las concentraciones de estradiol en suero de las vaquillas preñadas tratadas con un agonista de la GnRH fueron menores que en vaquillas que no recibieron dicho tratamiento (Rettmer *et al.*, 1992).

### **2.1.3.2 Funciones de las inhibinas**

La síntesis y secreción de la FSH y la LH en la pituitaria son reguladas por factores hipotalámicos, gonadales y de la pituitaria. La producción hipotalámica de la GnRH parece ser esencial para mantener las gonadotropinas y al fin de cuentas la fertilidad en los mamíferos. La activina y la inhibina originalmente identificadas como péptidos gonadales pero también expresadas

en la pituitaria, estimulan e inhiben, respectivamente, la síntesis y secreción de gonadotropinas (Fafioffe *et al.*, 2004).

El reinicio del crecimiento de los folículos primordiales y la adquisición de la dependencia de FSH de los folículos preantrales son independientes de la acción de las gonadotropinas y probablemente incluye una regulación paracrina (comunicación hormonal que existe entre células adyacentes) y autocrina. En el subsecuente reclutamiento de estos folículos hay una interacción entre las gonadotropinas y reguladores locales como algunos péptidos los cuales tienen acciones en todos los estados funcionales de la foliculogénesis, incluyendo la ovulación (Findlay, 1993; Roche, 1996).

Las activinas, inhibinas y folistatinas, forman un grupo de factores interrelacionados, cruciales para un número de funciones reproductivas y no reproductivas (Phillips, 2005). La producción de activina, inhibina y folistatina es estimulada por las gonadotropinas de la pituitaria (Halvorson y DeCherney, 1996).

### **Activina**

La activina es un producto de las células de la granulosa y está compuesta de dos homodímeros o heterodímeros de la misma subunidad  $\beta$ , resultando la activina A ( $\beta A-\beta A$ ), activina AB ( $\beta A-\beta B$ ), o activina B ( $\beta B-\beta B$ ). Los receptores de activina pueden ser divididos en dos clases: tipo I (actRI) y tipo II (actRII). La actRI se une a la activina de alta afinidad; sin embargo, la unión solo ocurre en presencia de la señal del péptido actRII. Por otro lado, la actividad de la actRII depende de la formación de un complejo con act RI (Halvorson y DeCherney, 1996).

La activina regula la diferenciación de las células de la granulosa de manera autocrina (comunicación que se da mediante la liberación de una hormona o neurotransmisor que tiene un efecto de retroalimentación directa sobre la célula que lo secreta) y paracrina, y sus acciones están relacionadas con el estado de diferenciación de las células de la granulosa y de la madurez folicular. En presencia de FSH, aumenta la actividad de la aromatasa y la producción de estradiol. También estimula la producción de inhibina basal e inducida por FSH y es bloqueada por la folistatina (Findlay, 1993).

### ***Inhibina***

La inhibina consiste de una subunidad  $\alpha$  (masa molecular relativa  $M_r = 18$  kilodaltons) unido por un puente disulfuro a una de dos subunidades  $\beta$  altamente homólogas ( $M_r$  aproximada = 14 kd) para formar la inhibina A ( $\alpha$ - $\beta$ A) o la inhibina B ( $\alpha$ - $\beta$ B). Ésta hormona es sintetizada por las células de la granulosa del folículo y su producción puede ser regulada en el ámbito endocrino (comunicación entre células que liberan sus hormonas a la corriente sanguínea y tienen efecto en células blanco a distancia; FSH, LH), paracrino (factor de crecimiento epidermal, androstenediona) y autocrino (factor de crecimiento similar a la insulina-1, activina, folistatina; Halvorson y DeCherney, 1996; Phillips, 2005).

La inhibina ejerce un efecto estimulador sobre la producción de andrógenos inducida por la LH. Dicho efecto puede ser atenuado por la activina. En general, la inhibina ejerce un efecto paracrino en el folículo ovárico (particularmente sobre las células de la teca); sin embargo, es probable que la inhibina actúe como una hormona endocrina periférica que regula la secreción

de FSH y de éste modo tiene influencia sobre la foliculogénesis a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Findlay, 1993). Según Phillips (2005) la inhibina bloquea la producción de FSH en una proporción de gonadotropos, disminuye el número de receptores GnRH en algunos gonadotropos productores de FSH e induce receptores GnRH para LH en otros.

### ***Folistatina***

La folistatina es un polipéptido glicosilado organizado en tres dominios homogéneos en más del 50% (Halvorson y DeCherney, 1996; Phillips, 2005). El principal sitio de producción de la folistatina son las células de la granulosa en el ovario y su producción está regulada por la FSH pero no por la LH, según estudios *in vivo* e *in vitro*, además por la activina. Sus efectos son contrarios a los de la activina e incluyen, disminución de la actividad de la aromatasas y de la producción de inhibina, por otro lado, incrementa la producción de P4 inducida por la FSH (Findlay, 1993). La folistatina puede actuar en la modulación de la inhibina y la activina, debido a la habilidad de unirse a la subunidad  $\beta$  de éstas. Se ha comprobado que la adición de folistatina bloquea la estimulación de la activina sobre la producción y secreción de FSH, además, generalmente, se considera que la folistatina inhibe la función de la activina e inhibina previniendo la interacción con sus receptores (Halvorson y DeCherney, 1996).

### **2.1.3.3 Función del cuerpo lúteo en la vaca**

Para el mantenimiento de la preñez se requiere un CL funcional. El CL es una glándula endocrina que se desarrolla a partir de la pared del folículo que

ovuló (Howell *et al.*, 1994), y gradualmente incrementa su secreción de P4 en los días posteriores (Acosta y Miyamoto, 2004).

La función principal del CL es sintetizar y secretar P4, que es esencial para el mantenimiento de la preñez, ya que el grado de desarrollo del embrión está estrechamente relacionado con el medioambiente de P4 materna (Mann y Lamming, 2001; Inskeep, 2004). También tiene un importante papel regulatorio en el ciclo estral, que es determinada por la duración de la secreción de P4, misma que a su vez está controlada por las secreciones de la glándula pituitaria anterior, del útero, de los ovarios, del embrión y de la placenta, por medio de mecanismos luteotrópicos y luteolíticos (Milvae *et al.*, 1996).

Según Karsh (1987) la P4 puede alterar la amplitud y frecuencia del pulso de LH incrementando el intervalo entre los episodios de liberación de GnRH y puede actuar sobre la pituitaria para modificar su respuesta a GnRH. Dado que no existen evidencias en vacas que indiquen un efecto estimulatorio directo de la P4 sobre el embrión, la relación entre la P4 y el desarrollo del embrión probablemente se da a través de los efectos de la P4 sobre el medio ambiente uterino (Mann y Lamming, 2001), ya que se ha reportado un efecto de acción inhibitoria de la P4 sobre la expresión de genes de receptores de oxitocina durante la fase luteal temprana y media del ciclo estral (Robinson *et al.*, 1999). La hormona luteinizante ha sido considerada la luteotropina primaria en ovejas y vacas (Smith, 1986) que también puede ejercer un efecto luteotrópico, incrementando la síntesis de P4 por el CL, que puede ser un mecanismo luteoprotectivo para prevenir la regresión luteal (Rettmer *et al.*, 1992).

El CL contiene una población heterogénea de células que difieren en tamaño, apariencia de las organelas y capacidad esteroidogénica. Las células luteales esteroidogénicamente activas incluyen células grandes y pequeñas en vacas y otras especies. El origen de esas células ha sido motivo de controversia, ya que se ha reportado que en el CL de los ovinos y bovinos las células pequeñas son derivadas de las células de la teca y las células grandes derivadas de las células de la granulosa. No obstante, también se ha sugerido que las células luteales grandes también son derivadas de las células luteales pequeñas, cuya transición es regulada por la LH. Las células luteales grandes de bovinos secretan 20 veces más P4 que las células luteales pequeñas. Sin embargo, las células luteales pequeñas son seis veces más sensibles a la LH que las células luteales grandes. Las células luteales grandes en los ovinos, pueden determinar si el CL se mantiene o si se da la luteólisis dado que los receptores para  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$  están localizados predominantemente en éste tipo de células. Se cree que la secreción de P4 por las células luteales ocurre por difusión. Con todo, estudios en ovejas han mostrado una correlación positiva entre la exocitosis de gránulos secretorios luteales y la secreción de P4 durante el ciclo estral (Smith, 1986).

El CL de bovinos y ovinos contiene oxitocina, y las concentraciones de ésta pueden ser incrementadas por la  $\text{PGF}_2\alpha$ , a su vez, la oxitocina puede incrementar la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  del útero. Así, ambas hormonas pueden estar envueltas en una retroalimentación positiva lo cual asegura la regresión luteal (Smith, 1986).

El incremento inicial en la sensibilidad endometrial a oxitocina aparentemente ocurre entre el día 13 y 16 postestro debido a un aumento en las concentraciones de receptores de oxitocina en el endometrio. El producto puede evitar la luteólisis durante la gestación en vacas reduciendo la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La reducción de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  durante la preñez temprana se debe parcialmente a la reducción de la sensibilidad a oxitocina por medio de una reducción en la población de receptores a oxitocina y la inhibición de la habilidad de la oxitocina para estimular la actividad de la fosfolipasa (Tysseling *et al.*, 1998).

Durante la mayor parte del ciclo estral, el estradiol y la P4 restringen la secreción de GnRH a través de una retroalimentación negativa. Sin embargo, durante el proestro, estas dos hormonas esteroides ejercen una retroalimentación positiva sobre las neuronas de GnRH y los gonadotropos de la pituitaria. Sobresale entre estos cambios la secreción masiva de LH (Mol y Rijnberk, 1989; Dobson y Smith, 2000; Smith y Jennes, 2001).

Existen reportes de que algunas neuronas GnRH en el cerebro de la rata pueden contener receptores de estrógenos y de P4, estudios en otras especies consistentemente indican que las neuronas GnRH no contienen esos receptores. Además, generalmente se considera que las acciones de las hormonas esteroides gonadales se dan mediante neuronas que contienen éstos receptores y las transmiten a las neuronas GnRH (Scott *et al.*, 2000).

#### **2.1.3.4 Mecanismo luteolítico**

La oxitocina secretada del CL y probablemente también de la neurohipófisis, se unen a los receptores de oxitocina en el endometrio, iniciando la secreción pulsátil de  $\text{PGF}_2\alpha$  (Robinson *et al.*, 1999). Una de las principales acciones de la  $\text{PGF}_2\alpha$  es disminuir el fluido sanguíneo y consecuentemente la luteólisis (Acosta y Miyamoto, 2004).

#### **2.2 Función del interferón tau durante el reconocimiento materno de la preñez**

En las vacas, el aumento inicial de receptores de oxitocina anterior a la luteólisis ocurre entre los días 15-17. Durante la preñez temprana, la regulación del aumento de receptores de oxitocina y consecuentemente la luteólisis es inhibida por la secreción de interferón tau (IFN- $\tau$ ) del trofotodermo en los días 12-25. Una falla en este sistema lleva a un estado tardío de muerte embrionaria debido a la producción insuficiente de P4 para sostener el desarrollo del embrión. (Mann y Lamming, 2001).

El IFN- $\tau$  regula la expresión de genes endometriales, de tal manera que atenúa la secreción de prostaglandinas del endometrio. Las vacas con bajas concentraciones de P4 plasmática producen fuertes señales luteolíticas y pueden estar predispuestas a altas tasas de pérdidas embrionarias. Se cree que la secreción suficiente de P4 es crítica para el mantenimiento de un medio ambiente antiluteolítico (Thatcher *et al.*, 1997).

Robinson *et al.* (1999) estudiaron el efecto de la preñez sobre la expresión de receptores de P4, estrógenos y oxitocina durante la preñez

temprana en la vaca y encontraron que el embrión no tuvo efecto sobre la expresión de receptores de estrógenos o receptores de P4, pero sí de suprimir la expresión de receptores de oxitocina y la liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

En las vacas, el reconocimiento materno de la preñez envuelve una interacción directa del trofoblasto con el epitelio luminal del útero. Durante la peri-implantación ocurren cambios en el útero, algunos de los cuales son hormona-dependientes (hormonas esteroides ováricas) y que hacen posibles los procesos subsecuentes (Weitlauf, 1994). El éxito de éste reconocimiento depende de la presencia de un embrión suficientemente bien desarrollado que produzca suficiente cantidad de  $\text{IFN-}\tau$ , lo cual, a su vez, depende de un patrón apropiado de la secreción de P4 materna (Mann y Lamming, 2001). Inskip (2004), da una lista de factores que afectan el establecimiento de la preñez la cual incluye 1) influencias preovulatorias sobre el folículo y el oocito, 2) función uterina y luteal postovulatoria y 3) concentraciones de hormonas asociadas con la función trofoblástica y endometrial durante el reconocimiento materno de la preñez.

Durante la preñez temprana, los embriones deben inhibir el desarrollo del mecanismo luteolítico para mantener la secreción de P4 necesaria para continuar su desarrollo (Mann y Lamming, 2001). De éste modo, los embriones deben secretar una proteína,  $\text{IFN-}\tau$ , la cual actúa de manera local en el útero para inhibir la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  luteolítica a través de la inhibición del desarrollo de receptores de oxitocina en el epitelio luminal. Los efectos antiluteolíticos del  $\text{IFN-}\tau$  son responsables del reconocimiento materno de la preñez, el cual es el término usado para describir como una madre responde

(fisiológicamente) a la presencia de un embrión en su tracto reproductivo (Robinson *et al.*, 1999; Demmers *et al.*, 2001). Este efecto antiluteolítico del IFN- $\tau$  resulta en el mantenimiento de un CL funcional y la secreción de P4 que es esencial para mantener un medioambiente uterino que soporte los eventos críticos para un desarrollo exitoso del embrión hasta el término (Spencer *et al.*, 2004).

## **2.3 Factores que afectan el comportamiento reproductivo en vacas lecheras**

### **2.3.1 Estrés calórico**

Dobson y Smith (2000) definen estrés como la incapacidad de un animal para hacer frente a su medio ambiente, un fenómeno que se revela por la falla para alcanzar el potencial genético que se manifestará en la tasa de crecimiento, en la producción de leche, en la resistencia a enfermedades y en la fertilidad. Se ha comprobado que los estímulos estresantes reducen la fertilidad en primates y las especies domésticas (Macfarlane *et al.*, 2000).

El EC puede ser definido como la suma de las fuerzas externas hacia un animal homeotérmico que actúa para desalojar la temperatura corporal a partir de un estado de descanso (Hansen y Aréchiga, 1999).

Los factores estresantes reducen la fertilidad al interferir con los mecanismos que regulan los tiempos precisos de los eventos durante la fase folicular. En general el estrés ya sea agudo o crónico disminuye la secreción de gonadotropinas, que puede ser consecuencia de la reducción de la actividad hipotalámica o por disminución de la sensibilidad de la pituitaria (Conn y

Freeman, 2000; Daley *et al.*, 2000). Además, el EC reduce el contenido de receptores de LH, la actividad de la aromatasa y las concentraciones de estradiol en el folículo (Ozawa *et al.*, 2005).

La temperatura ambiental efectiva afecta el nivel de EC al cual están expuestos los animales y está influenciada por cinco factores medioambientales, la temperatura del aire, la humedad, el movimiento del aire, la radiación solar, y la precipitación pluvial (Ravagnolo *et al.*, 2000).

Las neuronas sensibles a la temperatura están localizadas a través del cuerpo de los animales y canalizan su información al hipotálamo. El hipotálamo recibe la información, la integra y produce cambios fisiológicos, anatómicos y de comportamiento, los cuales sirven para mantener un balance de calor aceptable (Du Preez, 2000).

La zona termoneutral para las vacas Holstein altas productoras se encuentra entre los -5 y 21°C (Howell *et al.*, 1994). Cuando la temperatura ambiental rebase los 26°C se activan en el animal procesos fisiológicos compensatorios, tendientes a mantener el balance energético, térmico, del agua, hormonal y mineral (Mellado, 1995).

#### **2.3.1.1 Efectos detrimentales del estrés calórico sobre la fertilidad**

El incremento en la temperatura corporal causado por el EC tiene consecuencias adversas directas sobre la función celular (Hansen y Aréchiga, 1999), a tal grado que la hipertermia de diferentes órganos resulta en diferentes alteraciones funcionales (Wolfenson *et al.*, 1997). Una de estas alteraciones se da cuando las vacas lecheras son expuestas a temperaturas ambientales

elevadas (arriba de 25°C) durante el verano lo cual resulta en períodos de baja fertilidad (Ryan *et al.*, 1992; Ealy *et al.*, 1993; Howell *et al.*, 1994; Mellado, 1995) y que puede observarse con una declinación precipitada al inicio de la estación con estrés que posteriormente se recupera gradualmente (por ejemplo, de octubre a diciembre) con el final de la temporada de EC (Thatcher *et al.*, 1997). En consecuencia, el período de días abiertos es más extenso para vacas inseminadas durante la temporada con EC en comparación con otras épocas del año (Howell *et al.*, 1994). Según Ravagnolo *et al.* (2000) actualmente las vacas Holstein son más susceptibles a tener menor fertilidad que hace unas décadas.

Durante los períodos de EC, las vacas lecheras presentan consumo de alimento reducido, aumentan el consumo de agua, la tasa metabólica, la pérdida de agua por evaporación, la tasa de respiración y la temperatura corporal (Armstrong, 1994).

Según Putney *et al.* (1988) el EC disminuye la secreción de IFN- $\tau$  del embrión en un 70% y aumenta la liberación de PGF2 $\alpha$  endometrial, lo cual conduce a las tasas de crecimiento reducidas y la incapacidad del embrión para producir señales bioquímicas en cantidades adecuadas para prevenir la regresión del CL. Éstos cambios causados por el EC, contribuyen a que durante el año, se presenten parámetros reproductivos muy variables, encontrándose una tasa de concepción de vacas lactantes que desciende desde un 50% en invierno hasta menos del 20% en verano dependiendo de la severidad del estrés (Gilad *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 2000), incluso, bajo condiciones húmedas y calientes del verano, las tasas de preñez pueden caer a menos del 10%

(Badinga *et al.*, 1992; Ambrose *et al.*, 1999). El incremento de la temperatura rectal de 38.5 a 40°C durante 72 horas postinseminación, disminuye la tasa de preñez desde 48 a 0% (Ryan *et al.*, 1992).

La tasa de preñez, producto de la tasa de detección del celo y de concepción (Thatcher *et al.*, 1997) ha disminuido significativamente a través de los años cuando se hace el análisis para todas las vacas inseminadas durante el año y para las vacas inseminadas durante la temporada de calor y ha permanecido prácticamente constante en vacas inseminadas durante el período frío (Lopez-Gatius, 2003).

Sin embargo, es evidente que existe un efecto retardado del EC del verano sobre la fertilidad del otoño, que es menor (30% o menos) que en el invierno (Wolfenson *et al.*, 2000). Esto es apoyado por el hecho de que pequeños folículos antrales toman alrededor de 40 a 50 días para desarrollarse a folículos preovulatorios, por lo que la exposición al EC durante el estado temprano del desarrollo folicular en el verano, puede dañar la función preovulatoria folicular y la fertilidad de la vaca en el otoño (Roth *et al.*, 2000).

### **2.3.1.2 Comportamiento hormonal durante el estrés calórico**

Los factores estresantes afectan la función reproductiva mediante acciones en el hipotálamo como dañando la liberación de LH de la pituitaria inducida por GnRH (Dobson y Smith, 1995).

En situaciones como el estrés crónico, la frecuencia del pulso en la GnRH/LH será lenta e iniciará el crecimiento folicular pero será incapaz de continuar al siguiente estado que depende de pulsos más frecuentes. Así, el

animal no puede mantener el ciclo estral y se presenta el consecuente anestro. También puede presentarse que la frecuencia del pulso de GnRH/LH sea suficiente para desarrollar un folículo y llevarlo al estado tardío de su desarrollo, pero no lo suficientemente rápido para proveer la GnRH estimulante de la pituitaria y la adecuada producción de estradiol, de tal manera que se genera un pico inadecuado de LH y, como este es incapaz de causar la ovulación y luteinización, el folículo persiste y produce el síndrome de quiste ovárico. En situaciones de estrés moderadas la frecuencia del pulso de GnRH/LH puede ser suficiente para apoyar el crecimiento folicular, pero estará sobre un límite, y puede ser susceptible a interrupción o variación por otra vía. En este caso, la integridad de las células de la granulosa y del mismo oocito pueden estar afectados y aunque el estro y la fertilización puedan ocurrir, ésta concepción será incapaz para desarrollar una preñez (Dobson y Smith, 2000).

Los efectos estacionales sobre la dinámica folicular tienen el potencial de afectar todas las células foliculares, incluyendo las células de la teca, granulosa, el cúmulo y oocitos (Zeron *et al.*, 2001), alterando así durante el EC la eficiencia de la selección, dominancia y la calidad general de los folículos ováricos (Badinga *et al.*, 1992).

Una de las causas de la disminución de la fertilidad durante el EC se debe parcialmente a la disminución en el desarrollo de los folículos ováricos (Wilson *et al.*, 1998a), ya que los folículos dominantes son afectados durante períodos de EC, que se encuentran con tamaño disminuido y son incapaces de evitar el crecimiento de los folículos subordinados (Guzeloglu *et al.*, 2001),

quizá debido a la disminución en la secreción de inhibina inducida por el EC (Wolfenson *et al.*, 1995).

Otro aspecto a considerar es que el daño de la función del folículo preovulatorio durante el estrés térmico puede afectar otros eventos reproductivos, como la secreción de gonadotropinas, el desarrollo subsiguiente del CL y el embrión (Guzeloglu *et al.*, 2001).

Un medioambiente caluroso puede estar directamente relacionado a la incidencia de folículos persistentes, ya que se conoce que varios factores de estrés reducen la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH (Lopez-Gatius, 2003).

Por otro lado, la función inadecuada del CL se ha considerado como causa de infertilidad en los bovinos y en otras especies como la oveja y los primates. Se sugiere que la insuficiencia lútea puede deberse a la presencia de un CL de vida media corta (7 a 12 días), o bien el CL tiene una vida media normal, pero existe una producción disminuida de P4. La inadecuada función lútea se ha asociado a un desarrollo incorrecto del folículo preovulatorio, a un estímulo luteotrópico disminuido o a la liberación prematura de PGF<sub>2</sub>α (Aréchiga *et al.*, 2002).

Los cambios endocrinos y celulares durante el desarrollo folicular pueden afectar el subsiguiente CL, de tal manera que la ovulación no garantiza el desarrollo y la función luteal normal (Smith, 1986).

Los mecanismos luteolíticos también se ven comprometidos cuando las vacas están bajo condiciones de EC, dando como resultado un retraso en la luteólisis y la de los folículos dominantes (Wilson *et al.*, 1998b), aunque otros

autores mencionan que el EC no prolonga la función luteal o duración del ciclo estral, pero sí afecta el crecimiento folicular y la concentración de P4 en el plasma, que puede contribuir a la baja fertilidad cuando las vacas son inseminadas durante el verano (Howell *et al.*, 1994; Trout *et al.*, 1998).

Sin embargo, Aké *et al.* (1995) estudiaron el nivel de P4 plasmática sobre el porcentaje de preñez en hembras bovinas receptoras de embriones y encontraron que la concentración de P4 de la receptora al momento de la transferencia, no influyó sobre el porcentaje de preñez.

### **2.3.1.3 Efectos del estrés calórico sobre el embrión**

Otros estudios muestran las diferencias en la habilidad de los oocitos para desarrollarse como blastocitos en las diferentes estaciones, y que tienen una competencia reducida durante el verano (Zeron *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002).

El período más crítico para la supervivencia del embrión, en caso de estrés térmico, se presenta durante los primeros tres a siete días de vida (Mellado, 1995; Thatcher *et al.*, 1997) sin embargo, la mortalidad entre el día 7 y 14 de gestación también es elevada. Durante la época fría no existen diferencias en el porcentaje de embriones viables colectados entre los días 6-7 o 13-14. De igual modo, no hay diferencia entre los embriones colectados en los días 6-7 durante la época de frío o de calor; sin embargo, la tasa de mortalidad embrionaria incrementó entre los días 6 y 14 de gestación durante la época de calor (Ryan *et al.*, 1992; 1993).

Los efectos adversos del EC materno disminuyen a medida que la preñez avanza debido, probablemente, a la adquisición de resistencia térmica por el embrión, conforme progresa de cigoto a blastocito (Hansen y Aréchiga, 1999). Sin embargo, las pérdidas tardías también se presentan, y parecen estar asociadas no con la muerte del embrión sino con una reducción en el crecimiento del mismo que lleva a la producción insuficiente de proteína antiluteolítica o IFN- $\tau$  (Thatcher *et al.*, 1997).

#### **2.3.1.4 Efectos del estrés calórico sobre la progesterona**

Se ha sugerido que un medio ambiente caliente puede ejercer sus efectos depresivos sobre la fertilidad actuando sobre el medio ambiente uterino, el sistema endocrino o el embrión (Badinga *et al.*, 1992), ya sea antes de la ovulación, el día de la inseminación o durante el desarrollo del embrión (Al-Katanani *et al.*, 1999). De este modo, el calor intenso disminuye la producción de las hormonas ováricas y de la glándula pituitaria (Johnson y Vanjonack, 1976; Badinga *et al.*, 1992).

La concentración de P4 está positivamente relacionada con la tasa de concepción y la tasa de gestación (Burke *et al.*, 1996). Las concentraciones de P4 han sido implicadas en muertes embrionarias durante tres períodos, el primero es el período postovulatorio temprano, antes del día 6 después de la inseminación, el segundo es del día 4 al 9 después de la inseminación, cuando la secreción excesiva de PGF $_2\alpha$  puede ser embriotóxica y luteolítica y el tercero durante el reconocimiento materno de la preñez, del día 14 al 17, donde las

bajas tasas de preñez han estado asociadas con bajas concentraciones de P4 y altas concentraciones de  $17\beta$ -estradiol (Inskeep, 2004).

Mann y Lamming (2001) estudiaron la relación entre el medio ambiente endocrino materno, el desarrollo temprano del embrión y la inhibición del mecanismo luteolítico en vacas, en el cual encontraron que la concentración de P4 durante la fase luteal fue menor en vacas vacías que en las preñadas. A las vacas preñadas se les detectó IFN- $\tau$  y de acuerdo a sus niveles de producción, fueron subdivididas en dos grupos, IFN positivo e IFN negativo. Los embriones de las vacas en el grupo IFN negativo todavía estaban en estado esférico o tubular, mientras que los embriones del grupo IFN positivo había desarrollado al estado tubular o filamentoso. Además, las vacas del grupo IFN negativo sufrieron un incremento retardado en las concentraciones de P4 después de la ovulación, así como una menor concentración de la misma al final de la fase luteal.

Así, el escaso incremento de las concentraciones de P4 después de la ovulación puede ser el resultado de una pobre luteinización o del inadecuado soporte de la secreción de P4 por la LH (Mann y Lamming, 2001).

Wolfenson *et al.* (2002) estudiaron las concentraciones de progesterona de vacas lecheras en ambas estaciones. Las concentraciones de progesterona en el plasma fueron significativamente mayores en invierno que en verano, durante la fase luteal media la diferencia entre las dos estaciones fue de 1.5 ng/ml.

### 2.3.2 Síndrome de la vaca repetidora

Una de las principales causas de infertilidad en el ganado bovino lechero lo representan aquellas vacas aparentemente saludables y fértiles pero que fallan en alcanzar la gestación después de varias inseminaciones con toros de fertilidad probada. Tradicionalmente, a éstas hembras se les ha denominado como vacas repetidoras (Aréchiga *et al.*, 2002).

Una vaca repetidora se define como un animal que ha tenido por lo menos tres IA sin quedar gestante y que está libre de lesiones o anormalidades genitales detectables al examen rectal y ha parido anteriormente al menos en una ocasión (Guise y Gwazdauskas, 1987; Aréchiga *et al.*, 2002). Sin embargo, también puede ser definida de manera general, como las hembras que retornan al estro después de la tercera IA. Esta falla del ganado para alcanzar la gestación después de inseminaciones repetidas es una causa de frustración y pérdidas económicas para productores de leche (Stevenson *et al.*, 1990).

A pesar de que este síndrome fue descrito desde los años cuarenta y que ha habido grandes avances en la medicina veterinaria, el problema sigue siendo una de las principales causas de infertilidad en el ganado bovino lechero (Aréchiga *et al.*, 2002). Dado que una de las características de las vacas repetidoras es la de presentar ciclos estrales regulares, implica que la mortalidad embrionaria ocurre antes del reconocimiento materno de la preñez (Aréchiga *et al.*, 2002).

Graden *et al.* (1967) encontraron una amplia variedad de microorganismos en el útero y cérvix del 56% de las vacas repetidoras.

También hallaron algunas anomalías en la falla en la fertilización como la alteración en la ovulación, la obstrucción del oviducto, los óvulos anormales, las adhesiones ováricas y la endometritis, con un 8.7, 6.7, 3.3, 2 y 3.3 %, respectivamente.

### **2.3.3 Efectos de la producción de leche sobre la fertilidad**

En los años recientes, el objetivo principal de desarrollo en la tecnología reproductiva de los mamíferos ha sido preservar la fertilidad. Sin embargo, a pesar del progreso en la sincronización del estro y en la IA, el desarrollo reproductivo de las vacas lecheras no ha mejorado substancialmente, por el contrario, en las cinco décadas pasadas se ha notado un incremento drástico en la incidencia de desórdenes reproductivos e infertilidad de vacas lecheras conforme la producción de leche incrementa (Lopez-Gatius, 2003), por lo mismo se ha aumentado la demanda para establecer nuevas herramientas en el manejo de la reproducción bovina (Lucy *et al.*, 2004).

En un estudio retrospectivo realizado por Lopez-Gatius (2003), encontró una asociación por cada 1,000 Kg de incremento en el promedio de producción de leche con la disminución de 3.2 a 6% en la tasa de preñez y de 4.4 a 7.6% en el número de vacas cíclicas en todas las vacas inseminadas durante el año y las que se inseminaron durante la estación de calor, respectivamente.

El calor al que están sujetas las vacas proviene fundamentalmente de fuentes exógenas (medio ambiente) y endógenas (metabolismo interno del animal). En las vacas que están produciendo leche, la tasa metabólica del animal se incrementa, ocasionando a su vez una elevación en la producción de

calor (Mellado, 1995; Thatcher *et al.*, 1997). A pesar de que durante un EC severo las vacas reducen el consumo de alimento hasta en 25% con el fin de reducir la generación corporal de calor (Mellado, 1995), la temperatura corporal de una vaca lactando es mayor que la de una vaca fuera de la lactación (Guzeloglu *et al.*, 2001).

Genéticamente, por otro lado, la heredabilidad estimada para la temperatura rectal bajo condiciones de EC se encuentra en un rango de .25 a .65. Sin embargo, la selección de animales para temperatura rectal baja puede conducir a la selección indirecta de vacas con baja producción de leche debido a la asociación negativa entre el nivel de producción de leche y la resistencia al EC (Thatcher *et al.*, 1997). Por el contrario, el mejoramiento genético del animal para incrementar la producción está haciendo a estos animales menos capaces de regular la temperatura corporal, es decir, menos adaptados a climas calurosos (Hansen y Aréchiga, 1999).

## **2.4 Alternativas para contrarrestar los factores que afectan la fertilidad durante el verano**

### **2.4.1 Enfriamiento corporal**

Las técnicas más comunes para aminorar el EC han estado encaminadas a alterar el medioambiente de la vaca por medio de la provisión de sombras, ventiladores, rociadores o sistemas de enfriamiento evaporativo. Se ha observado incremento en la producción de leche (Jordan, 2003); sin embargo, la variación estacional sobre la función reproductiva aún persiste (Thatcher *et al.*, 1997; Hansen y Aréchiga, 1999), de tal manera que los

distintos procedimientos de enfriamiento usados en los establos no han sido capaces de mejorar la fertilidad substancialmente, y la tasa de concepción de vacas lactantes en el verano, de igual manera en establos equipados con sistemas de enfriamiento, todavía es pronunciadamente más baja que en invierno (Wolfenson *et al.*, 2000).

La mortalidad embrionaria se incrementa de un 41% de los días 6 y 7 a 73% en los días 13 y 14 de gestación durante la estación cálida. Sin embargo, este incremento no se da del día 6 al 14 de gestación en la estación fría (Ryan *et al.*, 1992). En un experimento realizado por Al-Katanani *et al.* (2002), aplicaron un tratamiento de enfriamiento a las vacas por 42 días, donde los resultados obtenidos no fueron benéficos al oocito.

La provisión de sombras en el parto inmediato no mostró diferencias estadísticas en los días al primer aumento de P4 (mayor a 1 ng), días al primer estro, días abiertos y el número de servicios por concepción (Jordan, 2003).

Esto implica que se necesita investigación adicional para determinar que efectos fisiológicos se ven afectados negativamente a largo plazo, es decir, de las etapas de foliculogénesis, del ambiente uterino, de las hormonas metabólicas que alteran la función reproductiva y otros factores (Thatcher *et al.*, 1997).

## **2.4.2 Tratamiento hormonal para aumentar las tasas de preñez**

### **2.4.2.1 Uso de progestágenos**

En los 60's se obtuvieron los primeros métodos de sincronización. Dichos métodos bloquean la ovulación mediante la administración de progestágenos

exógenos. El descubrimiento de la  $\text{PGF}_2\alpha$  condujo al desarrollo de nuevos métodos de sincronización en los 70's. Los progestágenos y la  $\text{PGF}_2\alpha$  fueron combinados para mejorar las tasas de concepción; sin embargo, continuaron siendo bajas. El agente causal de la baja fertilidad se atribuye al fenómeno de folículo dominante persistente provocado por la suplementación de progestágenos, que puede causar cambios ultra estructurales en el oocito de vacas tratadas (Lucy *et al.*, 2004). También puede ser debida a una inadecuada relación entre el estro, el pulso preovulatorio de LH y la ovulación (Sánchez-Torres, 1997).

#### **2.4.2.2 Sincronización de estro y la ovulación**

El desarrollo de un sistema de sincronización adecuado del estro estaba fundamentado en el entendimiento de la biología básica de la dinámica del folículo en el ovario y en la retrogradación del CL (Thatcher *et al.*, 1997), de tal manera que las hormonas utilizadas actualmente para controlar el ciclo estral, farmacológicamente son idénticas a (o análogos de) las hormonas reproductivas que se encuentran en el hipotálamo (GnRH), ovarios (estradiol y P4) y útero ( $\text{PGF}_2\alpha$ ) del ganado (Lucy *et al.*, 2004). Los tratamientos hormonales que inducen el estro y la ovulación en vacas lecheras pueden tener un efecto benéfico sobre el desarrollo reproductivo de los hatos (Alnimer *et al.*, 2002).

Peters y Pursley (2002) evaluaron la respuesta de vacas que recibieron un protocolo de sincronización (Ovsynch) únicamente, contra vacas que recibieron el mismo protocolo pero además una presincronización con  $\text{PGF}_2\alpha$  y

GnRH, 10 y 7 días, respectivamente, antes del inicio de Ovsynch, sin encontrar diferencias entre ambos tratamientos.

Las tasas de preñez tampoco fueron diferentes en vacas inseminadas por detección de estros, en vacas tratadas con Ovsynch o en las tratadas con gonadotropina coriónica humana (hCG) en los días que se les administró GnRH (0 y 9) en el protocolo Ovsynch (De Rensis *et al.*, 2002).

Los efectos del tratamiento con GnRH al momento de la IA sobre la tasa de fertilización y la mortalidad embrionaria no se conocen, pero pueden estar relacionados con el tiempo de la ovulación y en a la secreción de P4 por el CL (Stevenson *et al.*, 1990).

Por otro lado, la IA a tiempo fijo, inducida hormonalmente, puede reducir las pérdidas en la eficiencia reproductiva causada por una pobre detección de estro, pero no son suficientes para restablecer la preñez del hato a un nivel similar al expresado durante el clima frío debido a las severas consecuencias del EC sobre la embriogénesis (Thatcher *et al.*, 1997; Hansen y Aréchiga, 1999).

En un experimento realizado por Ulla *et al.* (1996) encontraron que el tratamiento con GnRH de 10 a 12 horas antes de la IA aumenta la secreción de P4 luteal y la supervivencia de los embriones durante el EC. También Stevenson *et al.* (1990) encontraron que la tasa de preñez fue mejorada cuando se aplicó GnRH inmediatamente después de una IA simple en vacas repetidoras. Sin embargo, la tasa de gestación (producto de las tasas de detección de estro y de concepción) encontrada en una evaluación de inseminación a tiempo fijo realizada por Burke *et al.* (1996), fue de 29%

mientras que para el grupo control fue de 30.5%, y la tasa de concepción (número de vacas inseminadas sobre el número de vacas preñadas por 100) fue de 26.5% para las vacas inseminadas a tiempo fijo y 41.5% para el grupo control.

Algunas desventajas en la sincronización de las oleadas foliculares con GnRH incluyen la necesidad de un folículo dominante presente, de tal manera que no se sincronizarán aquellas vacas que no tengan un folículo dominante o que lo tengan fisiológicamente inmaduro (Lucy *et al.*, 2004).

#### **2.4.2.3 Aplicación de hormonas durante la fase luteal**

Muchas vacas que no pueden mantener la preñez tienden a tener bajas concentraciones de P4 durante la fase luteal temprana y media y se ha sugerido que en tales animales, el CL puede no tener una función óptima, sugiriendo una inadecuada función, que causa pérdidas económicas sustanciales por disminución en la fertilidad (Rajamahendran y Sianangama, 1992).

La GnRH es comúnmente utilizada para la sincronización de la oleada folicular. La liberación de LH inducida por la GnRH causa ovulación o luteinización del folículo dominante (Lucy *et al.*, 2004).

Willard *et al.* (2003) evaluaron la administración de GnRH en los días 5 o 11 después de la inseminación en ganado lechero bajo EC, y encontraron aparición de mayor tejido de CL, incremento en las concentraciones de P4 y una tendencia hacia una mayor tasa de preñez.

Otra hormona utilizada durante el ciclo estral es la hCG, cuya administración aumenta la duración del ciclo estral mediante el mantenimiento del CL en vaquillas ciclando (Wiltbank *et al.*, 1961).

Pritchard *et al.* (1994) no encontraron relación entre las concentraciones de P4 y las tasas de preñez; sin embargo, encontraron una disminución lineal en las tasas de preñez asociada con altas concentraciones de estradiol. La ovulación o luteinización de los folículos dominantes y la formación de cuerpos lúteos accesorios incrementa y reducen las concentraciones de P4 y estrógenos, respectivamente.

El tratamiento con GnRH entre los días 11 y 14 coincide con el pico de la segunda oleada folicular y con altas concentraciones de estradiol en animales con tres oleadas foliculares; sin embargo, en animales con dos oleadas foliculares las concentraciones de estradiol probablemente estén bajas en ese momento. De este modo, sería interesante determinar si existen diferencias en la respuesta a GnRH entre animales de dos y tres oleadas foliculares (Peters *et al.*, 2000).

#### **2.4.2.4 Transferencia de embriones**

Otro de los métodos para mitigar los impactos negativos del EC sobre la tasa de concepción es la transferencia de embriones ya que el EC puede reducir la maduración del oocito, la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Aunque la transferencia de embriones de buena calidad parece proveer una metodología para aumentar la fertilidad durante el verano, los problemas no dejan de estar presentes. Durante períodos de EC, el número de

embriones producidos después de la superovulación puede ser reducido como resultado de una pobre respuesta a la terapia hormonal, a bajas tasas de fertilización o calidad embrionaria reducida. Otros efectos que han evitado la adopción comercial de la transferencia de embriones son 1) el uso de vaquillas lecheras como donadoras puede retrasar la edad a primer parto, y por lo tanto la productividad; 2) la relación negativa entre la calidad del embrión y la temperatura ambiental significa que está disponible la menor calidad de embriones cuando se necesita la mayor calidad; 3) la recuperación de embriones es altamente técnica y requiere labores experimentadas que representa costos adicionales; y 4) sólo los embriones producidos *in vivo* han incrementado el porcentaje de preñez de los animales comparado con la IA (Jordan, 2003).

## **III MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Localización del área de estudio**

El estudio se llevó a cabo en el establo Cantabria, ubicado en la carretera La Popular-Chimal, municipio de Gómez Palacio, Durango, latitud 26° N, longitud 103° O, con una altitud de 1,140 msnm, y clima cálido seco, donde la precipitación media anual es de 310 mm. y la temperatura media anual es 23.4 °C (CONAGUA, 2005).

### **3.2 Diseño de la investigación**

#### **3.2.1 Unidades experimentales**

El trabajo de campo se realizó de mayo a agosto de 2004. Todos los animales estuvieron estabulados en corrales en forma de abanico con capacidad para 100 vacas, los cuales cuentan con una sombra convencional de 500 m<sup>2</sup> a 4.5 m de altura.

Se utilizaron 101 vacas Holstein repetidoras con tres a siete inseminaciones artificiales (IA) con toros de fertilidad probada, libres de lesiones o anomalías genitales detectables a la exploración rectal, sin descargas vaginales anormales y que habían parido al menos en una ocasión.

La alimentación que recibieron fue igual para todas las vacas a base de una dieta mixta total (TMR por sus siglas en inglés) y la producción de leche en promedio fue de 30.5 L/vaca/día con dos ordeñas al día.

### **3.2.2 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño de mediciones completamente al azar. Las vacas fueron asignadas en forma aleatoria a cada uno de los tres tratamientos. Los animales pertenecientes al tratamiento testigo no recibieron aplicación de GnRH después de la IA (n = 34); los tratamientos GnRH-5 (n = 33) y GnRH-11 (n = 34) recibieron una dosis de GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina im.; Gonasyl, Syva) en el día 5 y en el día 11 post-IA, respectivamente.

### **3.2.3 Variables estudiadas**

#### **3.2.3.1 Progesterona**

Para la colección de sangre para el análisis de P4, se seleccionaron al azar al 50% de las vacas incluidas en el experimento. La colección de sangre se obtuvo de la vena coccígea los días 8, 11, 14, 17, 20 y 23, postinseminación, para lo cual se utilizaron agujas Vacutainer desechables y tubos de ensayo estériles de 5.0 ml con 40.0 µl de anticoagulante EDTA. Las muestras de sangre fueron transportadas a una temperatura media de 4°C para luego ser centrifugadas el mismo día de la colección a una velocidad de 3000 rpm durante 20 minutos, para obtener plasma. Posteriormente fueron congeladas a una temperatura de -20°C hasta la determinación de las concentraciones de P4 en plasma, realizado en el laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Las concentraciones de P4 en plasma fueron determinadas por radioinmunoanálisis (RIA) usando un kit comercial DPC (Diagnostics Products

Corporation, USA), de fase sólida con una sensibilidad analítica de 0.02 ng/ml y un coeficiente de variación de 4.5%.

### **3.2.3.2 Tasas de concepción**

Las vacas que no retornaron al estro fueron revisadas mediante palpación rectal al día  $43 \pm 3$  para el diagnóstico de preñez. La presencia de líquido en el cuerno uterino, una vesícula amniótica palpable y el desplazamiento de membrana fetal fueron considerados indicadores positivos de preñez. Aquellas vacas que retornaban al estro después de un ciclo normal fueron inseminadas como práctica de manejo del establo, arrojando por lógica un resultado para el experimento de no gestantes.

La tasa de concepción fue definida como el número de vacas que quedaron preñadas divididas entre el número de vacas que fueron inseminadas al estro.

### **3.2.3.3 Variables de control**

Al momento de la IA se registró la temperatura rectal utilizando un termómetro digital (Deltatrak, USA), la condición corporal (CC), para lo cual se utilizó la escala para ganado lechero (1 delgada, 5 obesa; Ferguson *et al.*, 1994) y solo formaron parte del experimento las que estaban entre 2.5 y 4.0.

Además fueron adquiridos de los registros individuales de las vacas, el número de IA, el número de lactancias y los días en leche.

Los datos del medio ambiente fueron tomados usando un termo/higrómetro digital (TAYLOR, modelo 1409), para obtener las

temperaturas ambientales y humedades máximas y mínimas, las cuales fueron registradas diariamente. Esos datos fueron utilizados para calcular el índice temperatura humedad (THI; Temperature – Humidity Index, por sus siglas en inglés) usando la siguiente fórmula:  $THI = ^\circ F - (0.55 - 0.55 (RH / 100)) (^\circ F - 58)$ . Para la clasificación de los valores de THI, se utilizó el Índice de Seguridad Meteorológico para el ganado (LWSI, por sus siglas en inglés) del Instituto para la Conservación del Ganado (Du Preez, 2000).

### 3.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis multivariado para mediciones repetidas llamado análisis de perfiles. El perfil se conformó por 6 puntos de medición repetidos en el tiempo, que corresponden a los días 8, 11, 14, 17, 20 y 23, postinseminación. También se realizaron contrastes polinomiales dentro de cada tratamiento. Además se realizó un análisis de varianza univariado en cada día de muestreo y se utilizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa Honesta de Tukey cuando el análisis de varianza fue significativo.

En análisis previos, se encontró que ninguna de las covariables fue significativa ( $P > 0.05$ ) por lo que el modelo final empleado fue el siguiente:

$$\underline{y} = \underline{\mu} + \tau_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$\underline{y}$  Es el vector de los niveles de P4 en los 6 días de medición.

$\underline{\mu}$  Es el vector de medias para cada uno de los días.

$\tau_i$  Es el efecto del i-ésimo tratamiento ( $i=1, 2, 3$ );

$\varepsilon_{ijk}$  Es la fluctuación aleatoria en cada observación.

Por otro lado, se compararon los niveles de P4 en cada punto de muestreo dentro de cada tratamiento entre vacas gestantes y vacías para lo cual se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS, 2004, versión.

Para evaluar las tasas de concepción se utilizó un análisis de regresión logística; en el modelo logístico linealizado (Agresti, 1996; Johnson, 2000) se incluyó el efecto del tratamiento, la temperatura rectal, el número de lactancias y el THI. Para evaluar la significación de los coeficientes se utilizó el estadístico de Wald. El modelo utilizado fue el siguiente:

$$\log it(\pi) = \alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 z_3 + \beta_4 z_4 + \beta_5 z_5 + \beta_6 z_6$$

Donde:

$\pi$  Es la probabilidad de que una vaca quede gestante;

$x_1$  es la variable dicotómica para indicar pertenencia al tratamiento GnRH-5 ( $x=1$ ) o no ( $x=0$ );

$x_2$  es la variable dicotómica para indicar pertenencia al tratamiento GnRH-11 ( $x=1$ ) o no ( $x=0$ );

$z_3$  es la temperatura rectal al momento de la inseminación;

$z_4$  es el número de días en leche al momento de la inseminación;

$z_5$  es el número de lactancia actual de la vaca;

$z_6$  es el valor del índice humedad-temperatura al momento de la inseminación; y

$\beta_i$  son los coeficientes que indican el cambio en las probabilidades.

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

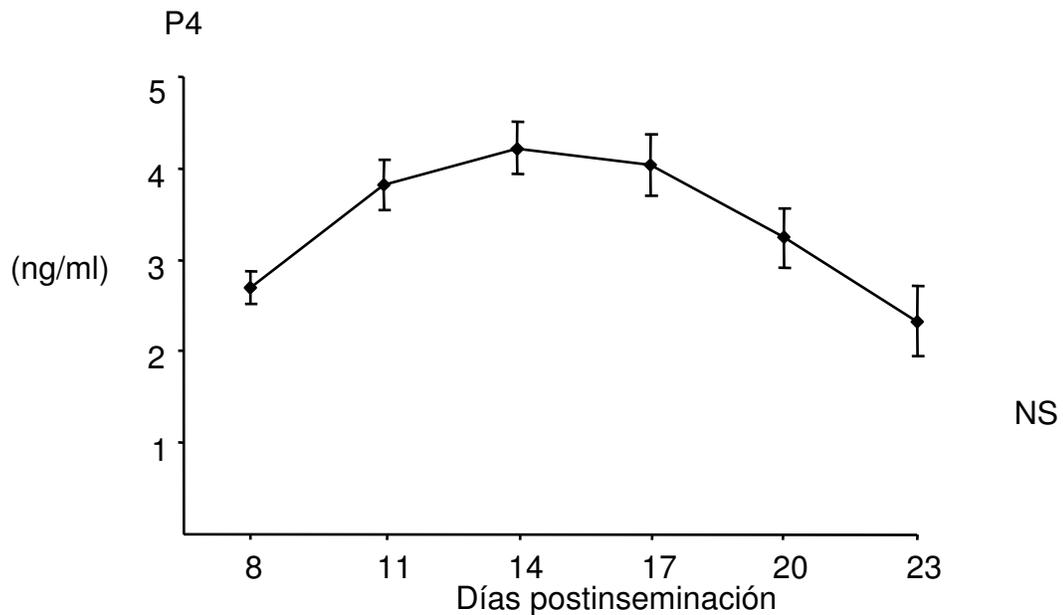
### 4.1 Progesterona

En el análisis de varianza corregido debido a que no cumple con el supuesto de esfericidad (Johnson, 2000) se encontró que los niveles de P4 varían a través del tiempo ( $P < 0.001$ ) y que los perfiles de cada uno de los tratamientos son similares ( $P > 0.05$ ; Anexo 1).

En la Figura 1 y Anexo 2 se presentan las concentraciones de P4 plasmática en promedio de los animales de los que se obtuvo sangre, sin tomar en cuenta el tratamiento y el estado de preñez. En el día 14 se obtienen los valores más altos de P4; pero al realizar los contrastes entre los puntos de muestreo, se observa que entre el día 11 y 14 y entre el 14 y 17 no hay diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Además, se observa que hay una interacción entre los tratamientos sólo entre los días 8 y 11 del muestreo (Anexo 3).

Según Robinson *et al.* (2001) las concentraciones de P4 comienzan a incrementar a partir del día 3 después del estro, alcanzando las máximas concentraciones alrededor de los días 12-18 y comienzan a descender mas o menos al día 19.

Cabe decir, que los animales en este estudio, no estuvieron sometidos a ningún sistema de enfriamiento ambiental; sin embargo, según Roth *et al.* (2000), las concentraciones de P4 plasmática durante el ciclo estral, no son diferentes entre vacas bajo EC y vacas bajo un sistema de enfriamiento artificial durante el verano.



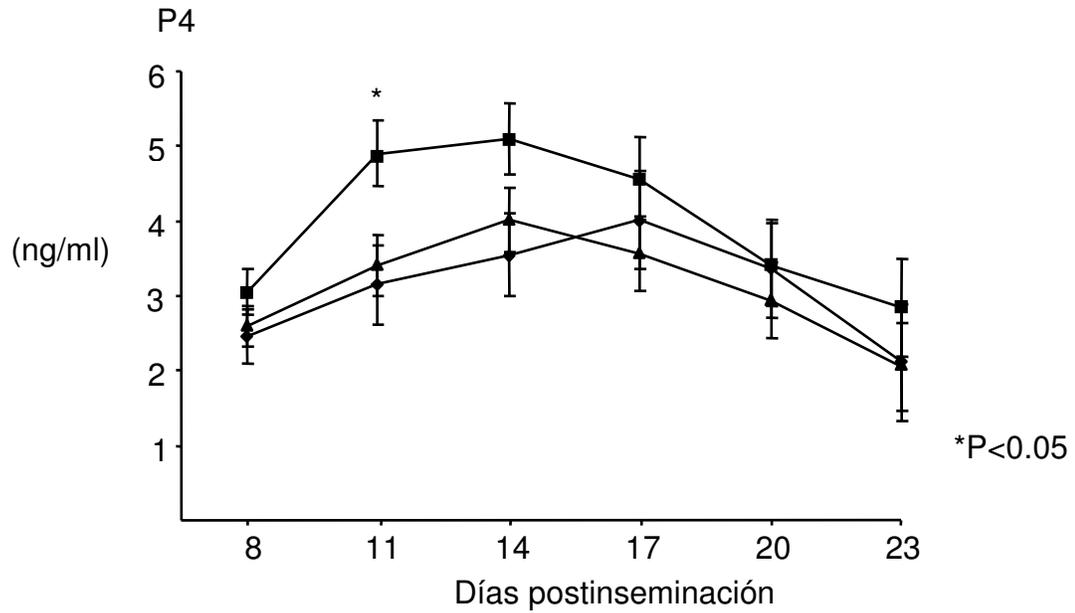
**Figura 1.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) para el perfil general de los niveles de P4, de las vacas de las que se obtuvo una muestra de sangre durante el experimento (n=51). NS: No diferencias significativas entre los días de muestreo.

Cuando se hizo el análisis dentro de tratamiento, no hubo una tendencia en el tiempo para los niveles de progesterona en el grupo GnRH-11, no cambiaron a través del tiempo ( $P=0.15$ ) pero si para el grupo control y el GnRH-5 ( $P<0.01$ ; Anexo 4). Por otro lado, en el tratamiento testigo y en el GnRH-5, se probaron los contrastes polinomiales (Anexo 5). Se encontró que para el tratamiento testigo, sólo el efecto cuadrático fue significativo ( $P< 0.01$ ) alcanzando su máximo al día 14 (4.01 ng/ml). Mientras para el tratamiento GnRH-5, el efecto cuadrático ( $P< 0.01$ ) y cúbico ( $P< 0.05$ ) fueron significativos. En este tratamiento, el máximo nivel de P4 (5.10 ng/ml) se alcanzó en el día 14

después de la inseminación y el efecto cúbico se debió a que el decremento entre el día 20 y 23 no fue tan acentuado.

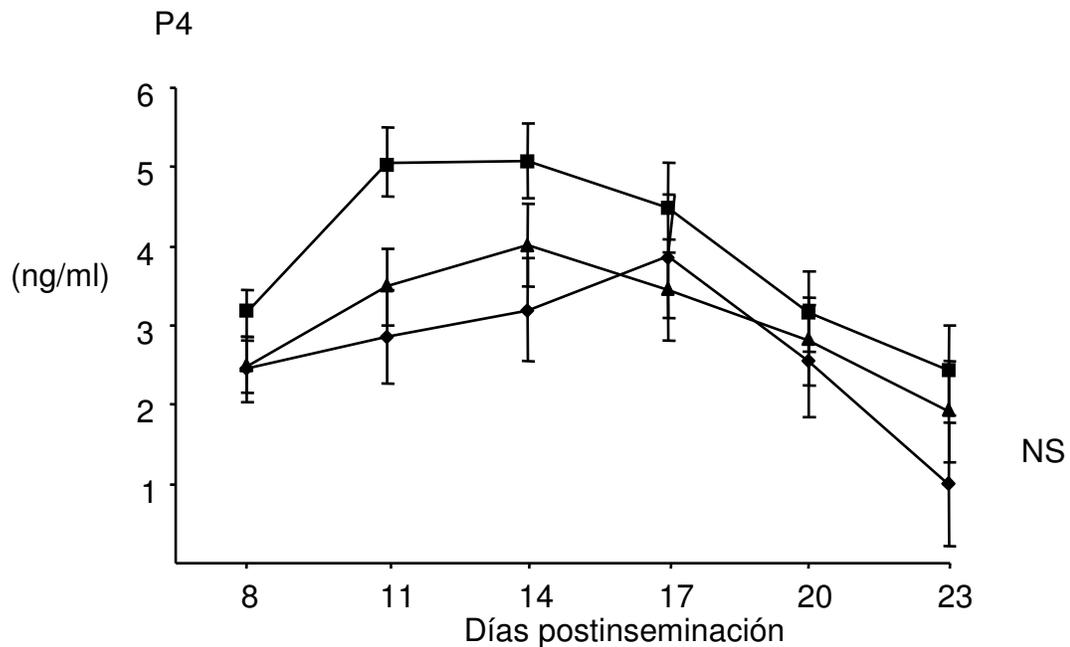
La concentración media para cada uno de los días de muestreo y tratamiento se presenta en las Figuras 2, 3, 4 y Anexos 6, 7 y 8, para todas las vacas de las que se obtuvo una muestra de sangre en el experimento independientemente del estado de gestación, vacas no gestantes y vacas gestantes, respectivamente.

El tratamiento GnRH-5 tuvo una concentración mayor en el día 11 postinseminación que los tratamientos testigo y GnRH-11 ( $P < 0.05$ ) cuando se compararon todas las vacas incluidas en el muestreo dentro del experimento, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Willard *et al.* (2003), cuyas vacas tratadas con GnRH en el día 5 post-IA tuvieron concentraciones de P4 en suero mayores que las vacas control. En vaquillas, también fueron incrementadas las concentraciones de P4 cuando se aplicó hCG entre 3 y 7 días después del estro (Funston *et al.*, 2005). Entre los tratamientos testigo y GnRH-11 los niveles de P4 fueron similares durante todos los días del muestreo ( $P > 0.05$ ; Figura 2 y Anexo 6).



**Figura 2.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 independientemente del estado de gestación de los tratamientos testigo ( $\blacktriangle$ ), GnRH-5 ( $\blacksquare$ ) y tratamiento GnRH-11 ( $\blacklozenge$ ).

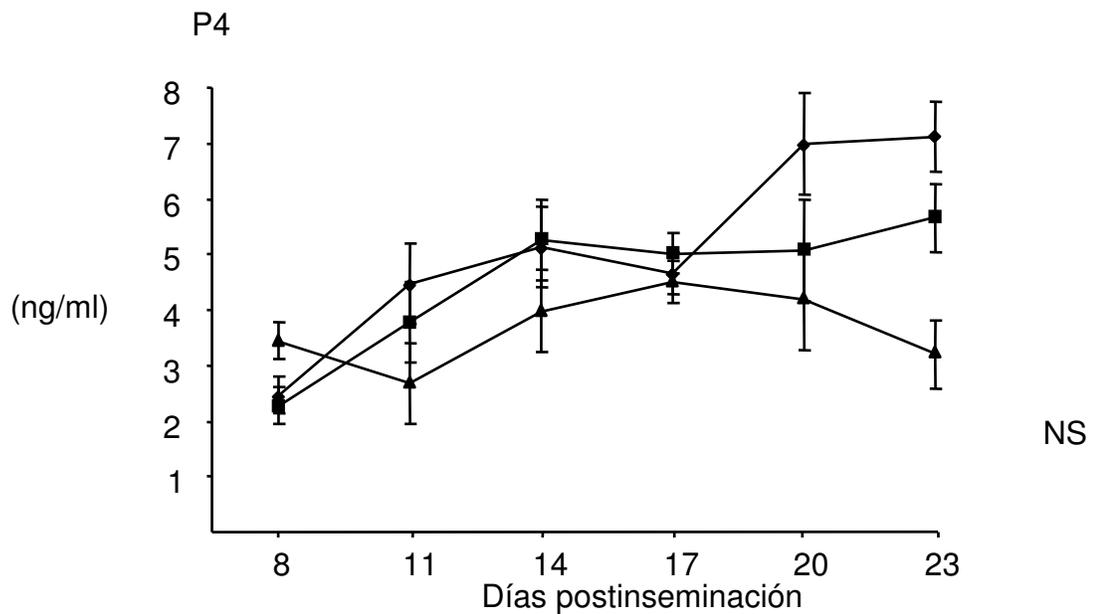
En la Figura 3 y Anexo 7 se presentan los niveles promedio de P4 en vacas no gestantes ( $n=45$ ) y se observa que los perfiles son similares a los obtenidos con los datos totales independientemente del estado de gestación, de la figura 2; sin embargo, en este análisis no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ).



**Figura 3.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 para las vacas no gestantes de los tratamientos testigo ( $\blacktriangle$ ), GnRH-5 ( $\blacksquare$ ) y tratamiento GnRH-11 ( $\blacklozenge$ ). NS: No diferencias significativas.

El número de animales estudiados para los perfiles de P4 fue de 51. El número de vacas muestreadas y que se diagnosticaron gestantes fue de 6, dos por cada tratamiento. Las vacas gestantes mantienen los niveles de P4 por arriba de 5 ng/ml a partir del día 17 llegando hasta casi los 6 ng/ml. Al observar el GnRH-11 (Figura 4 y Anexo 8), los niveles fueron por debajo del testigo hasta el día 14 pero en el día 17 el nivel fue aritméticamente superior que el control ( $P > 0.05$ ). En los animales que recibieron la inyección de GnRH se observa un incremento de los niveles de P4 en los días subsecuentes; sin embargo, en el tratamiento testigo la P4 alcanza concentraciones mayores a 4 ng/ml los días 17 y 20 y vuelve a niveles de 3 ng/ml al final del muestreo (día 23); sin

embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En un estudio realizado por Willard *et al.* (2003), encontraron que las vacas que habían sido tratadas con GnRH en el día 5 post-IA tuvieron concentraciones mayores de P4 en suero que las del control; sin embargo, las vacas preñadas que recibieron GnRH en el día 11 post-IA tuvieron concentraciones similares a las de las vacas control en los días posteriores a la aplicación.

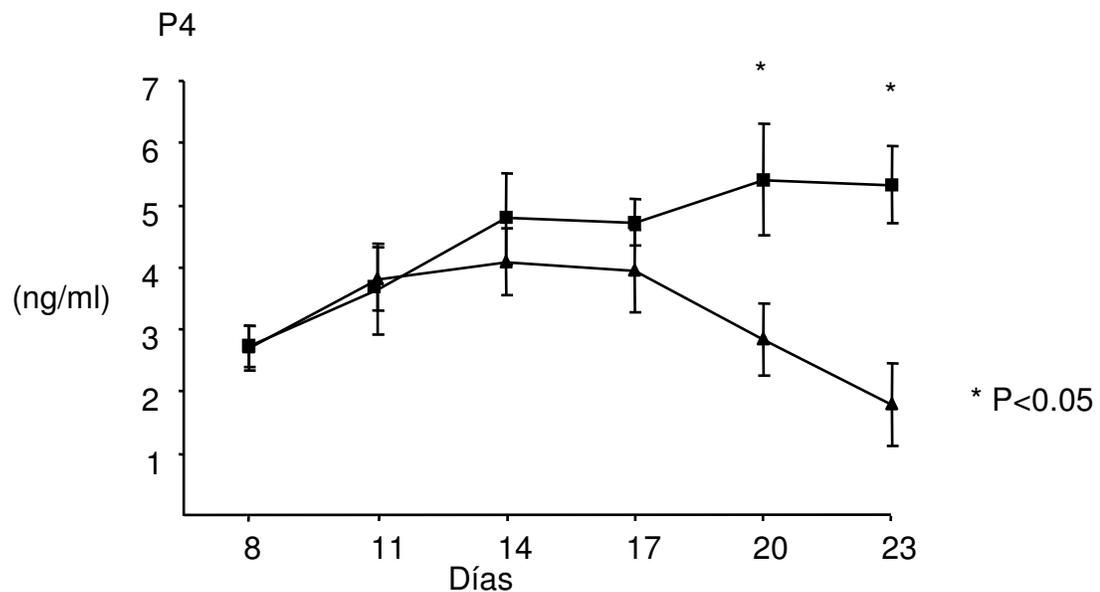


**Figura 4.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 para las vacas gestantes de los tratamientos testigo ( $\blacktriangle$ ), GnRH-5 ( $\blacksquare$ ) y tratamiento GnRH-11 ( $\blacklozenge$ ). NS: No diferencias significativas.

En controversia, las vaquillas preñadas tratadas con acetato de fertirelina (agonista de la GnRH) tuvieron mayor concentración de P4 en suero que las preñadas del tratamiento control del día 4 al 12 después de la inyección que se

llevó a cabo entre los días 11 y 13 post-IA (Rettmer *et al.*, 1992). De igual modo, el tratamiento con hCG en el día 7 o en el 14 después de la inseminación incrementó las concentraciones de P4 plasmática (Rajamahendran y Sianangama, 1992).

Al comparar las vacas gestantes con las vacías (Figura 5 y Anexo 9), se observa que las vacas gestantes tuvieron niveles de P4 aritméticamente mayores que las vacías a partir del día 14, manteniéndose el nivel hasta el día 17, pero a partir del día 20 las diferencias fueron significativas ( $P < 0.05$ ).

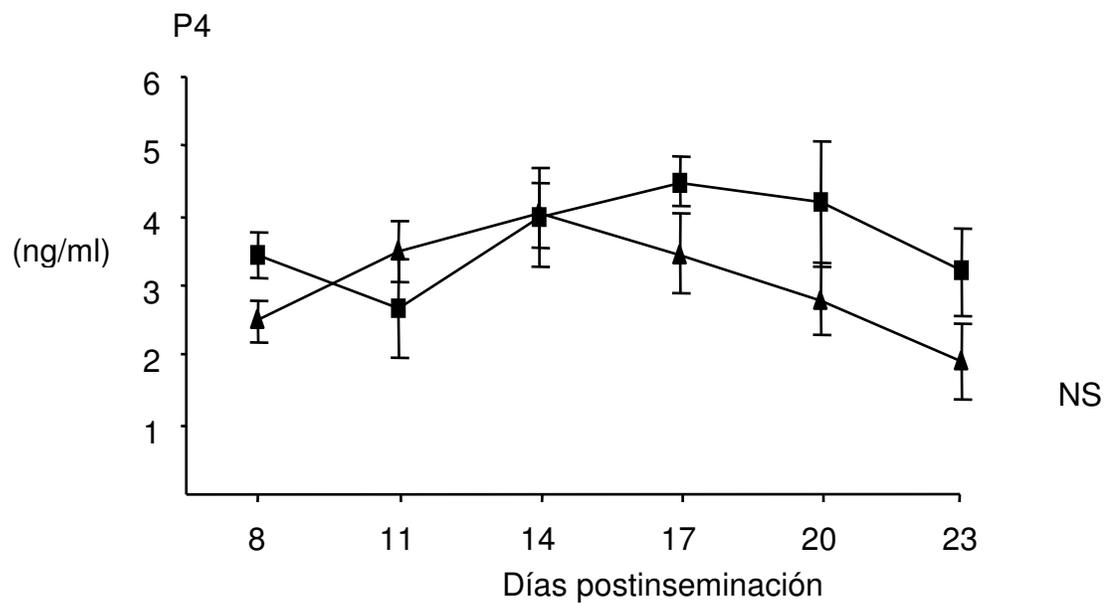


**Figura 5.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 para las vacas gestantes (■) y vacías (▲).

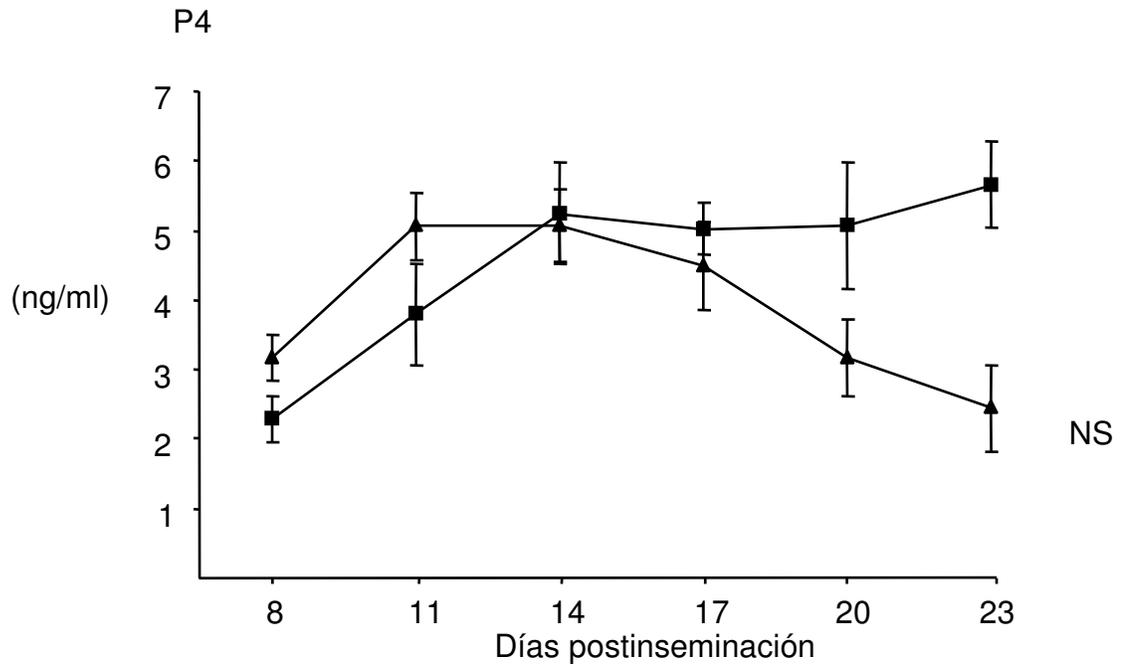
La aplicación de GnRH durante la fase luteal es cuestionable, debido a que al aumentar las concentraciones de P4, se estaría acrecentando también

su efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo: disminuir la frecuencia del pulso de GnRH mediante péptidos opioides endógenos (Goodman *et al.*, 2002).

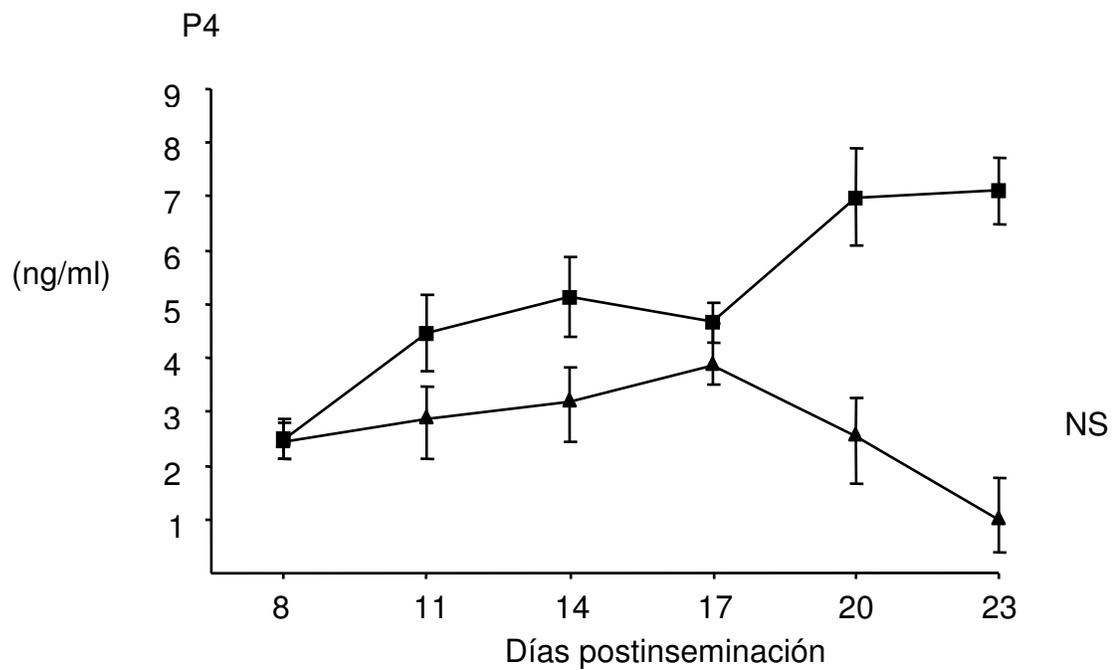
Las concentraciones de P4 de vacas gestantes contra vacas vacías de cada uno de los tratamientos, no fueron diferentes, quizá debido al número reducido de vacas que resultaron gestantes (Figuras 6-8 y Anexos 10-12).



**Figura 6.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 en vacas gestantes (■) y vacías (▲) del tratamiento testigo. NS: No diferencias significativas.



**Figura 7.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 en vacas gestantes (■) y vacías (▲) del tratamiento GnRH-5. NS: No diferencias significativas.



**Figura 8.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de P4 en vacas gestantes (■) y vacías (▲) del tratamiento GnRH-11. NS: No diferencias significativas.

Según Aréchiga *et al.* (2002) los dos motivos por los que una vaca repetidora no logra la gestación es por fallas en la fertilización y por muerte embrionaria temprana. Las concentraciones de P4 están relacionadas con el mantenimiento de la preñez (Inskeep, 2004); sin embargo, en este estudio, el análisis de regresión logística no detectó ninguna relación entre las concentraciones de P4 plasmática y la gestación de la vaca.

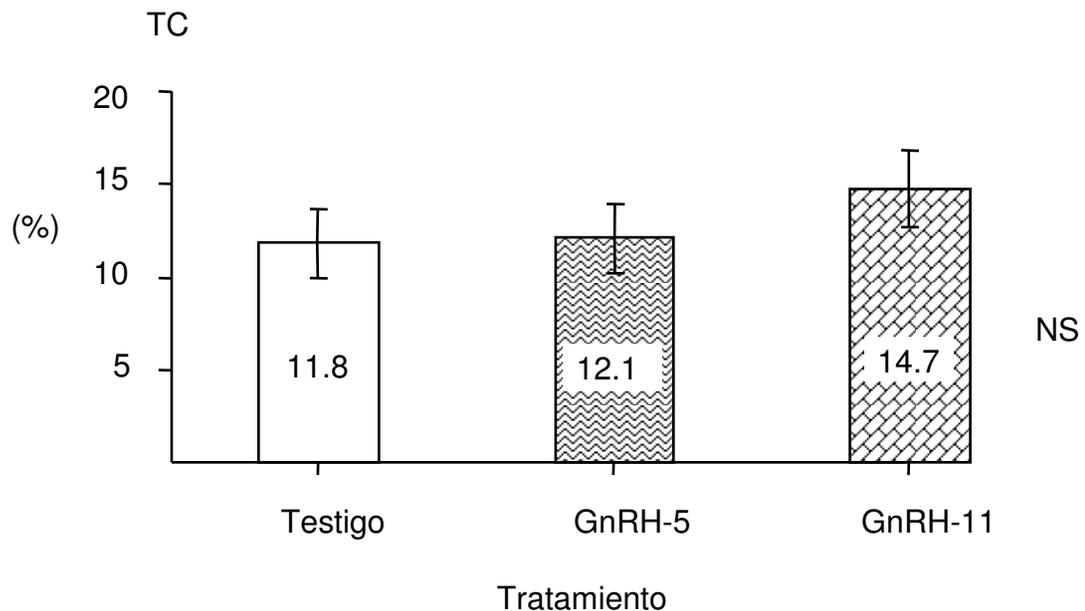
Los efectos de las concentraciones de P4 sobre las tasas de concepción son discutibles, ya que no se encontró influencia del nivel promedio de P4 plasmática de la receptora al momento de la transferencia sobre el porcentaje de preñez (Aké *et al.*, 1995).

El tratamiento con hCG estuvo asociado con el incremento de las tasas de preñez en un estudio realizado por Rajamahendran y Sianangama (1992) sin embargo, las vacas preñadas tratadas en el día 7 y 14 no correspondieron a las que desarrollaron un CL accesorio. En otro estudio, el incremento de las concentraciones de P4 inducida por el tratamiento con gonadotropina coriónica equina (eCG), no mejoró las tasas de preñez en la transferencia de embriones, por el contrario, hubo una disminución en las tasas de concepción en los animales que tuvieron las más altas concentraciones de P4 (Gouveia *et al.*, 2004).

#### **4.2 Tasas de concepción**

Las tasas de concepción al día  $43 \pm 3$  se presentan en la Figura 9. En general, la tasa de concepción fue de 12.87 % en promedio para todos los animales en el estudio. Las tasas de concepción disminuyen de un 35 %

durante la época fría hasta alrededor de 20 % durante la época de calor, según un análisis de desempeño reproductivo en vacas lecheras de la Comarca Lagunera realizado por Fernández (2003), por lo que se puede pensar que el problema es aún más grave en las vacas repetidoras. Por otro lado, las vacas repetidoras presentan bajas tasas de concepción debido a diferentes causas como anomalías en la ovulación, la obstrucción del oviducto, los óvulos anormales, las adhesiones ováricas, además de microorganismos en el útero y el cérvix, que han sido encontrados en el 56% de las vacas repetidoras (Graden *et al.*, 1967).



**Figura 9.** Tasas de concepción (TC) de los tres tratamientos. Testigo: Sin GnRH; GnRH-5: GnRH al 5º día post-IA; GnRH-11: GnRH al 11º día post-IA; NS: No diferencias significativas.

Las bajas tasas de concepción encontradas durante el verano, han sido asociadas al EC, encontrando que las tasas de concepción bajo estas condiciones pueden caer a menos del 10% (Badinga *et al.*, 1992; Ambrose *et al.*, 1999).

Las tasas de concepción (11.8 (4/34), 12.1 (4/33) y 14.7 % (5/34), para el testigo, GnRH-5 y GnRH-11, respectivamente) no fueron diferentes entre los tratamientos. Tampoco se encontraron efectos significativos con ninguna de las covariables incluidas en el análisis de regresión logística (Anexo 13).

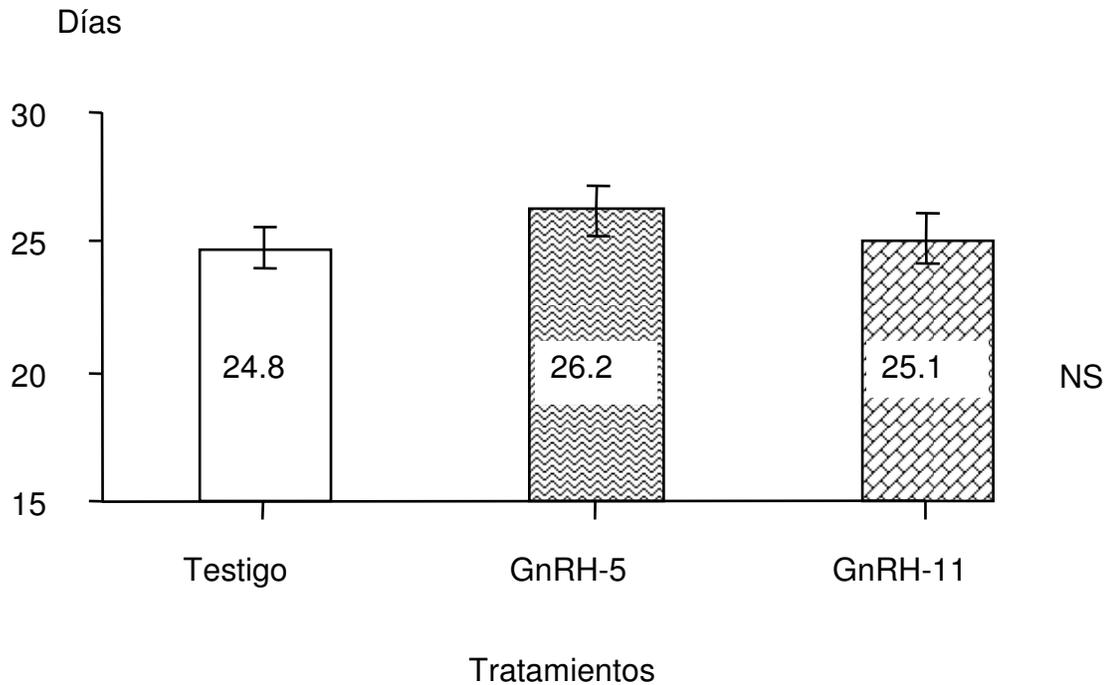
Los efectos de la administración de GnRH durante la fase luteal no son consistentes entre los estudios, según los estudios realizados por Peters *et al.* (2000). Rettmer *et al.* (1992), aplicaron 200 µg de acetato de fertirelina en el día 11, 12 ó 13 después del estro a vaquillas lecheras, encontrando tasas de preñez similares a las vaquillas del tratamiento control. En vacas, de igual modo, Jubb *et al.* (1990) encontraron tasas de concepción similares entre las tratadas y las del grupo control. En otro estudio, la administración de GnRH en el día 5 ó 15 tampoco incrementó la tasa de preñez al día 27 ó 55 post-IA, así como tampoco redujo la pérdida de preñez entre esos días. Además, la administración de GnRH en ambos días (5 y 15) redujo las tasas de preñez al día 27 y 55 con respecto a las vacas que no recibieron GnRH post-IA (Bartolome *et al.*, 2005). Contrario a estos resultados, Willard *et al.* (2003) encontraron una tendencia a incrementar las tasas de preñez en vacas lactantes tratadas con GnRH en el día 5 o en el día 11 después de la inseminación a tiempo fijo. En vacas lactantes altas productoras durante el período de calor, Lopez-Gatius *et al.* (2005) encontraron que el tratamiento con

GnRH al momento de la inseminación y 12 días después, incrementa las tasas de concepción. En ovejas, la aplicación de hCG al día 11.5, tendió a incrementar las tasas de preñez en comparación con las del grupo control (Nephew *et al.*, 1994).

### **4.3 Intervalo entre estros**

En este experimento, el intervalo entre estros (Figura 10) no fue diferente entre las vacas que recibieron (GnRH-5 y GnRH-11) y las que no recibieron GnRH (Testigo). En un experimento realizado por Jubb *et al.* (1990), encontraron que las vacas tratadas con Buserelin (análogo de la GnRH) durante los días 11-13, tuvieron un interestro más largo comparadas con las del grupo control.

Según Rajamahendran y Sianangama (1992) el CL inducido: regresa con el CL espontáneo y las vacas retornan al estro en el tiempo normal (en vacas tratadas con hCG en el día 0 o en el día 7), aunque el ciclo estral fue ligeramente extendido en algunas vacas que llevaron hCG al día 14. Dicha extensión del ciclo estral en vacas tratadas en el día 14 pudo estar relacionada a la mortalidad embrionaria temprana o a la disrupción del folículo dominante que es necesario para la iniciación del proceso luteolítico.



**Figura 10.** Intervalo entre estros (días) de los tres tratamientos. Testigo: Sin GnRH; GnRH-5: GnRH al 5º día post-IA; GnRH-11: GnRH al 11º día post-IA; NS: No diferencias significativas.

El interestro en este experimento fue de 25.4 días, lo cual podría estar relacionado con muerte embrionaria según Humblot (2001), quien reporta que cuando el retorno al estro se da después de 24 días podría estar asociado con muerte embrionaria tardía, ocurriendo al día 16 después de la IA o más.

#### 4.4 Variables control

Las medias ( $\pm ee$ ) de las variables control registradas durante el experimento se presentan en el Cuadro 1. La temperatura rectal media para todos los animales en el experimento fue de 38.58 °C ( $\pm 0.05$ ) con un rango de

37.6 a 39.7 °C. El número de lactancias y el número de servicios promedio fue de 1.9 y 4.6, respectivamente.

Durante los días que duró el experimento se registraron las temperaturas ambientales, las cuales oscilaron entre 20.72 y 32.20°C con una media de 27.76 °C ( $\pm 0.26$ ).

La humedad relativa mínima durante el experimento fue de 16% y la máxima de 89%. Dichas humedades máximas y mínimas fueron utilizadas para obtener los promedios de cada día, los cuales estuvieron en el rango de 26.5 a 57.5% con una media de 42.39% ( $\pm 0.68$ ).

El THI es comúnmente usado para indicar el grado de EC sobre el ganado lechero. En éste estudio, el THI medio al día de la IA para todas las vacas fue de 73.79 ( $\pm 0.51$ ) unidades con un mínimo de 64.5 unidades y un máximo de 77.55 unidades. En general, el 82.2% (83/101) de las vacas fueron inseminadas bajo un  $\text{THI} \geq 72$  unidades, por lo que sí estuvieron bajo condiciones de EC, de acuerdo con Armstrong (1994), quien reporta que las vacas lecheras ya se encuentran bajo esas condiciones y son afectadas de manera adversa cuando rebasan las 72 unidades; aunque Du Preez (2000), maneja como umbral 70 unidades.

**Cuadro 1.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de las variables control registradas el día de la IA para los tres tratamientos.

Variables	Tratamientos		
	Testigo (n = 34)	GnRH-5 (n = 33)	GnRH-11 (n = 34)
Temperatura rectal (°C)	38.58 ( $\pm 0.09$ )	38.60 ( $\pm 0.09$ )	38.57 ( $\pm 0.09$ )
No. de inseminaciones	4.38 ( $\pm 0.22$ )	4.61 ( $\pm 0.24$ )	4.85 ( $\pm 0.21$ )
No. de lactancias	1.76 ( $\pm 0.13$ )	1.94 ( $\pm 0.21$ )	2.12 ( $\pm 0.18$ )
Condición corporal	3.03 ( $\pm 0.03$ )	3.06 ( $\pm 0.05$ )	3.12 ( $\pm 0.05$ )
Temperatura ambiental (°C)	27.52 ( $\pm 0.47$ )	27.52 ( $\pm 0.46$ )	28.22 ( $\pm 0.42$ )
Humedad relativa (%)	43.00 ( $\pm 1.18$ )	42.67 ( $\pm 1.24$ )	41.5 ( $\pm 1.12$ )
THI (unidades)	73.79 ( $\pm 0.51$ )	73.74 ( $\pm 0.50$ )	74.47 ( $\pm 0.45$ )

GnRH-5=GnRH al 5<sup>o</sup> día post-IA; GnRH-11=GnRH al 11<sup>o</sup> día post-IA; THI = índice temperatura humedad

## V CONCLUSIONES

La aplicación de GnRH al 5º día, incrementa las concentraciones de P4 al 11º día postinseminación.

De acuerdo con este estudio, la administración de 100 µg del análogo de la GnRH, gonadorelina, en el día 5 o en el día 11 no incrementa las tasas de concepción durante el verano en vacas Holstein repetidoras.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Prueba corregida para efectos dentro de sujetos en el análisis de perfiles de los niveles de P4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	MMC	F	Valor de P
Tiempo	127,39	2,79	45,62	10,60	0,00
Tiempo x tratamiento	16,38	5,58	2,93	0,68	0,65
Error	516,53	120,07	4,30		

GL=grados de libertad ajustados por la epsilon de Huynh-Feldt = 0.558; MMC=medias de mínimos cuadrados.

**Anexo 2.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) para el perfil general de los niveles de P4, de las vacas muestreadas durante el experimento (n=51).

Días postinseminación	ng/ml
8	2,70 ( $\pm 0,18$ )
11	3,82 ( $\pm 0,27$ )
14	4,22 ( $\pm 0,28$ )
17	4,04 ( $\pm 0,33$ )
20	3,24 ( $\pm 0,33$ )
23	2,33 ( $\pm 0,39$ )

**Anexo 3.** Prueba de contrastes para mediciones repetidas de los niveles de P4.

Día de muestreo	Suma de cuadrados	GL	MMC	F	Valor de P
8 vs. 11	12,134	2	6,067	4,315	0,020
11 vs. 14	1,410	2	0,705	0,329	0,721
14 vs. 17	7,711	2	3,856	1,573	0,219
17 vs. 20	2,880	2	1,440	0,284	0,754
20 vs. 23	3,147	2	1,573	0,480	0,622

MMC=Medias de cuadrados mínimos; GL=grados de libertad corregidos por la epsilon de Huynh-Feldt.

**Anexo 4.** Análisis de varianza para los contrastes polinomiales de los perfiles en los tratamientos testigo y GnRH-5.

Tratamiento	Factor	GL	MMC	Valor de P
Testigo	Lineal	1	5,56	0,25
	Cuadrático	1	40,86	0,00
	Cúbico	1	0,58	0,58
GnRH-5	Lineal	1	8,37	0,30
	Cuadrático	1	58,03	0,00
	Cúbico	1	11,95	0,02

MMC=Medias de cuadrados mínimos; GL=grados de libertad.

**Anexo 5.** Análisis de varianza corregido para los perfiles dentro de cada tratamiento.

Tratamiento	Suma de cuadrados	GL	Media	F	Valor de P
Testigo	47,87	2,86	16,76	4,96	0,00
GnRH-5	78,63	2,77	28,36	5,75	0,00
GnRH-11	27,59	2,40	11,48	2,00	0,15

GL=Grados de libertad

**Anexo 6.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo y el tratamiento de todas las vacas muestreadas, independientemente del estado de gestación.

Días postinseminación	Tratamiento		
	Testigo	GnRH-5	GnRH-11
8	2,59 ( $\pm 0,27$ )	3,05 ( $\pm 0,30$ )	2,45 ( $\pm 0,36$ )
11	3,41 ( $\pm 0,40$ ) <sup>b</sup>	4,90 ( $\pm 0,44$ ) <sup>a</sup>	3,15 ( $\pm 0,53$ ) <sup>b</sup>
14	4,01 ( $\pm 0,43$ )	5,10 ( $\pm 0,47$ )	3,55 ( $\pm 0,56$ )
17	3,56 ( $\pm 0,50$ )	4,56 ( $\pm 0,55$ )	4,01 ( $\pm 0,66$ )
20	2,94 ( $\pm 0,50$ )	3,41 ( $\pm 0,55$ )	3,36 ( $\pm 0,66$ )
23	2,05 ( $\pm 0,59$ )	2,84 ( $\pm 0,65$ )	2,11 ( $\pm 0,78$ )

GnRH-5=GnRH al 5<sup>o</sup> día post-IA; GnRH-11=GnRH al 11<sup>o</sup> día post-IA; Literales distintas en la misma fila difieren  $P < 0.05$ .

**Anexo 7.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo y el tratamiento de las vacas vacías.

Días postinseminación	T r a t a m i e n t o		
	Testigo	GnRH-5	GnRH-11
8	2,49 ( $\pm 0,30$ )	3,16 ( $\pm 0,33$ )	2,45 ( $\pm 0,41$ )
11	3,49 ( $\pm 0,44$ )	5,06 ( $\pm 0,48$ )	2,86 ( $\pm 0,60$ )
14	4,01 ( $\pm 0,47$ )	5,07 ( $\pm 0,52$ )	3,19 ( $\pm 0,65$ )
17	3,45 ( $\pm 0,57$ )	4,49 ( $\pm 0,63$ )	3,87 ( $\pm 0,78$ )
20	2,80 ( $\pm 0,51$ )	3,17 ( $\pm 0,56$ )	2,55 ( $\pm 0,70$ )
23	1,91 ( $\pm 0,57$ )	2,44 ( $\pm 0,63$ )	1,00 ( $\pm 0,78$ )

GnRH-5=GnRH al 5º día post-IA; GnRH-11=GnRH al 11º día post-IA.

**Anexo 8.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo y el tratamiento de las vacas gestantes.

Días postinseminación	T r a t a m i e n t o		
	Testigo	GnRH-5	GnRH-11
8	3,44 ( $\pm 0,33$ )	2,28 ( $\pm 0,33$ )	2,47 ( $\pm 0,33$ )
11	2,68 ( $\pm 0,72$ )	3,79 ( $\pm 0,72$ )	4,47 ( $\pm 0,72$ )
14	3,98 ( $\pm 0,73$ )	5,25 ( $\pm 0,73$ )	5,14 ( $\pm 0,73$ )
17	4,50 ( $\pm 0,37$ )	5,02 ( $\pm 0,37$ )	4,66 ( $\pm 0,37$ )
20	4,19 ( $\pm 0,90$ )	5,07 ( $\pm 0,90$ )	6,99 ( $\pm 0,90$ )
23	3,20 ( $\pm 0,62$ )	5,66 ( $\pm 0,62$ )	7,12 ( $\pm 0,62$ )

GnRH-5=GnRH al 5º día post-IA; GnRH-11=GnRH al 11º día post-IA.

**Anexo 9.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo de todas las vacas vacías contra todas las vacas gestantes.

Días postinseminación	Vacías	Preñadas
8	2,70 ( $\pm 0,35$ )	2,73 ( $\pm 0,33$ )
11	3,81 ( $\pm 0,51$ )	3,65 ( $\pm 0,72$ )
14	4,09 ( $\pm 0,55$ )	4,79 ( $\pm 0,73$ )
17	3,94 ( $\pm 0,66$ )	4,73 ( $\pm 0,37$ )
20	2,84 ( $\pm 0,59$ )	5,41 ( $\pm 0,90$ )
23	1,78 ( $\pm 0,66$ )	5,32 ( $\pm 0,62$ )

**Anexo 10.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo en vacas gestantes y vacías del tratamiento testigo.

Días postinseminación	Vacías	Preñadas
8	2,49 ( $\pm 0,30$ )	3,44 ( $\pm 0,33$ )
11	3,49 ( $\pm 0,44$ )	2,68 ( $\pm 0,72$ )
14	4,01 ( $\pm 0,47$ )	3,98 ( $\pm 0,73$ )
17	3,45 ( $\pm 0,57$ )	4,50 ( $\pm 0,37$ )
20	2,80 ( $\pm 0,51$ )	4,19 ( $\pm 0,90$ )
23	1,91 ( $\pm 0,57$ )	3,20 ( $\pm 0,62$ )

**Anexo 11.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo en vacas gestantes y vacías del tratamiento GnRH-5.

Días postinseminación	Vacías	Preñadas
8	3,16 ( $\pm 0,33$ )	2,28 ( $\pm 0,33$ )
11	5,06 ( $\pm 0,48$ )	3,79 ( $\pm 0,72$ )
14	5,07 ( $\pm 0,52$ )	5,25 ( $\pm 0,73$ )
17	4,49 ( $\pm 0,63$ )	5,02 ( $\pm 0,37$ )
20	3,17 ( $\pm 0,56$ )	5,07 ( $\pm 0,90$ )
23	2,44 ( $\pm 0,63$ )	5,66 ( $\pm 0,62$ )

**Anexo 12.** Medias de cuadrados mínimos ( $\pm ee$ ) de la concentración de progesterona (ng/ml) de acuerdo al día de muestreo en vacas gestantes y vacías del tratamiento GnRH-11.

Días postinseminación	Vacías	Preñadas
8	2,45 ( $\pm 0,41$ )	2,47 ( $\pm 0,33$ )
11	2,86 ( $\pm 0,60$ )	4,47 ( $\pm 0,72$ )
14	3,19 ( $\pm 0,65$ )	5,14 ( $\pm 0,73$ )
17	3,87 ( $\pm 0,78$ )	4,66 ( $\pm 0,37$ )
20	2,55 ( $\pm 0,70$ )	6,99 ( $\pm 0,90$ )
23	1,00 ( $\pm 0,78$ )	7,12 ( $\pm 0,62$ )

**Anexo 13.** Estadístico de Wald para evaluar las variables del modelo de regresión logística propuesto para las tasas de concepción.

Variables	ee ( $\pm$ )	Estadístico de Wald	Valor de P
Tratamiento:		0,508	0,776
GnRH-5	0,771	0,003	0,956
GnRH-11	0,745	0,348	0,555
Temperatura rectal	0,562	0,263	0,608
THI	0,106	0,956	0,328
Días en leche	0,004	1,538	0,215
Número de lactancias	0,377	0,791	0,374

THI=Índice temperatura humedad; ee=error estándar.

## VI LITERATURA CITADA

- Acosta, T. J. y A. Miyamoto. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 82-83:127-140.
- Agresti, A. 1996. An introduction to categorical data analysis. John Wiley and sons, Inc. New York. 103-134
- Aké, L. J. R., L. Holy, A. A. M. Aguayo y Z. J. M. Medina. 1995. Influencia del nivel de progesterona plasmática sobre el porcentaje de preñez en hembras bovinas receptoras de embriones. *Veterinaria México* 26 (2):103-106.
- Al-Katanani, Y. M., D. W. Webb y P. J. Hansen. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 82 (12):2611-2616.
- Al-Katanani, Y. M., F. F. Paula-Lopes y P. J. Hansen. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 85 (2):390-396.
- Alnimer, M., G. De Rosa, F. Grasso, F. Napolitano y A. Bordi. 2002. Effect of climate on the response to three oestrous synchronisation techniques in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 71 (3-4):157-168.
- Ambrose, J. D., M. Drost, R. L. Monson, J. J. Rutledge, M. L. Leibfried-Rutledge, M. J. Thatcher, T. Kassa, M. Binelli, P. J. Hansen, P. J. Chenoweth y W. W. Thatcher. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci* 82 (11):2369-2376.
- Aréchiga, C. F., C. S. Galina, C. J. Hernández, A. A. Porrás, L. E. Rangel, G. S. Romo, M. A. Saharrea, M. J. Valencia y L. A. Zarco. 2002. Infertilidad en la hembra bovina (síndrome de la vaca repetidora de estros o servicios). En: C. J. Hernández (ed.) *Mejoramiento animal, Reproducción*. p 99-109. SUAED, México, D. F.
- Armstrong, D. V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci* 77 (7):2044-2050.
- Badinga, L., W. W. Thatcher, T. Diaz, M. Drost y D. Wolfenson. 1992. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 39:397-810.

- Bartolome, J. A., P. Melendez, D. Kelbert, K. Swift, J. McHale, J. Hernandez, F. Silvestre, C. A. Risco, A. C. Arteche, W. W. Thatcher y L. F. Archbald. 2005. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63 (4):1026-1037.
- Burke, J. M., R. L. De la Sota, C. A. de la Risco, C. R. Staples, E. J. Schmitt y W. W. Thatcher. 1996. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 79 (8):1385-1393.
- CONAGUA. Disponible en: <http://sgp.cna.gob.mx/Publico/Mapoteca/Mapas.htm>. Fecha de acceso: 28 de agosto de 2005.
- Conn, P. M. y M. E. Freeman. 2000. Neuroendocrine regulation of sexual behavior. En: *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. H. press: 9-47, 111-133, 287-297, Totowa, New Jersey.
- Daley, C. A., H. Sakurai, B. M. Adams y T. E. Adams. 2000. Effect of stress-like concentrations of cortisol on the feedback potency of oestradiol in orchidectomized sheep. *Anim Reprod Sci* 59 (3-4):167-178.
- Demmers, K. J., K. Derecka y A. Flint. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 121 (1):41-49.
- De Rensis, F., P. Marconi, T. Capelli, F. Gatti, F. Facciolongo, S. Franzini y R. J. Scaramuzzi. 2002. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG. *Theriogenology* 58 (9):1675-1687.
- Dobson, H. y R. F. Smith. 1995. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl* 49:451-461.
- Dobson, H. y R. F. Smith. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 60-61:743-752.
- Du Preez, J. H. 2000. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *Veterinary Research* 67:263-271.
- Ealy, A. D., M. Drost y P. J. Hansen. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 76 (10):2899-2905.
- Fafioffe, A., J.-F. Ethier, J. Fontaine, E. JeanPierre, C. Taragnat y J. Dupont. 2004. Activin an inhibin receptor gene expression in the ewe pituitary throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol* 182:55-68.

- Ferguson, J. D., D. T. Galligan, N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77: 2695-2703.
- Fernández, D. L. J. 2003. Análisis del comportamiento reproductivo en vacas lecheras de la Comarca Lagunera. En: "II Simposio Nacional de infertilidad en la vaca lechera" y "III Congreso Internacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas especialistas en Bovinos de la Comarca Lagunera". Torreón, Coah. 19-23.
- Findlay, J. K. 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 48 (1):15-23.
- Fortune, J. E., G. M. Rivera y M. Y. Yang. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83:109-126.
- Funston, R. N., R. J. Lipsey, T. W. Geary y A. J. Roberts. 2005. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *J Anim Sci* 83:1403-1405.
- Gilad, E., R. Meidan, A. Berman, Y. Graber y D. Wolfenson. 1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J Reprod Fertil* 99 (2):315-321.
- Gómez, G. A. 2004. Influencia de la calidad del cuerpo lúteo sobre los porcentajes de gestación en vacas Holstein postransferencia de embriones. En Memoria: XXVIII Congreso Nacional de Buiatría, Centro de convenciones y exposiciones Morelia, Michoacán. 233-234.
- Goodman, R. L., M. Gibson, D. C. Skinner y M. N. Lehman. 2002. Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reprod Suppl* 59:41-56.
- Gore, A. C. 2004. Gonadotropin-releasing hormone neurons: multiple inputs, multiple outputs. *Endocrinology* 145 (9):4016-4017.
- Gouveia, N. M. F., D. S. Melo, L. M. Carvalho, E. J. Fuck, L. A. Trinca y C. M. Barros. 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 alpha and eCG? *Theriogenology* 61:1283-1290.
- Graden, A. P., O. Durward, C. R. Mochow y L. R. Mutter. 1967. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. *J Dairy Sci* 51:778-781.

- Guise, M. B. y F. C. Gwazdauskas. 1987. Profiles of uterine protein in flushings and progesterone in plasma of normal and repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 70 (12):2635-2641.
- Guzeloglu, A., J. D. Ambrose, T. Kassa, T. Diaz, M. J. Thatcher y W. W. Thatcher. 2001. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim Reprod Sci* 66 (1-2):15-34.
- Hagemann, L. J. 1999. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51 (2):449-459.
- Halasz, B. 1985. Hipotalamo-anterior pituitary system and pituitary portal vessels. En: H. Imura (ed.). *The pituitary gland*. p 1-23. Raven press, New York.
- Halvorson, L. M. y A. H. DeCherney. 1996. Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine. *Fertil Steril* 65 (3):459-469.
- Hansen, P. J. y C. F. Aréchiga. 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *Animal Science* 77:36-50.
- Howell, J. L., J. W. Fuquay y A. E. Smith. 1994. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J Dairy Sci* 77 (3):735-739.
- Humblot, P. 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56:1417-1433.
- Hunter, M. G., R. S. Robinson, G. E. Mann y R. Webb. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci* 82-82:461-477.
- Inskeep, E. K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 82 E-Suppl:E24-39.
- Johnson, D. E. 2000. *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. International Thomson Editores. México.
- Johnson, H. D. y W. J. Vanjonack. 1976. Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals. *J Dairy Sci* 59 (9):1603-1617.
- Jordan, E. R. 2003. Effects of heat stress on reproduction. *J Dairy Sci* 86:E104-E114.

- Jubb, T. F., D. Abhayaratne, J. Malmo y G. A. Anderson. 1990. Failure of an intramuscular injection of an analogue of gonadotrophin-releasing hormone 11 to 13 days after insemination to increase pregnancy rates in dairy cattle. *Aust Vet J* 67 (10):359-361 [Abstract].
- Karsch, F. J. 1987. Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Ann Rev Physiol* 49:465-482.
- Kulick, L. J., K. Kot, M. C. Wiltbank y O. J. Ginther. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* 52 (5):913-921.
- Looper, M. L., J. A. Vizcarra, R. P. Wettemann, J. R. Malayer, T. D. Braden, R. D. Geisert y G. L. Morgan. 2003. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. *J Anim Sci* 81:269-278.
- Lopez-Gatius, F. 2003. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 60 (1):89-99.
- Lopez-Gatius, F., P. Santolaria, A. Martino, F. Deletang y F. De Rensis. 2005. The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. *Theriogenology*. [Abstract].
- Lucy, M. C., S. McDougall y D. P. Nation. 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.
- Macfarlane, M. S., K. M. Breen, H. Sakurai, B. M. Adams y T. E. Adams. 2000. Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Anim Reprod Sci* 63 (3-4):167-175.
- Mann, G. E. y G. E. Lamming. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121 (1):175-180.
- Mellado, M. 1995. Respuesta fisiológica, producción de leche, eficiencia reproductiva y salud del ganado lechero expuesto a temperaturas ambientales elevadas. *Veterinaria México* 26:389-399.

- Milvae, R. A., S. T. Hinckley y J. C. Carlson. 1996. Lutotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 45:1327-1349.
- Mol, J. A. a. y A. Rijnberk. 1989. Pituitary Function. En: f. edition (ed.) *Clinical Behavior of Domestic Animals*. p 576-592.
- Nephew, K. P., H. Cardenas, K. E. McClure, T. L. Ott, F. W. Bazer y W. F. Pope. 1994. Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. *J Anim Sci* 72 (2):453-458.
- Ozawa, M., D. Tabayashi, T. A. Latief, T. Shimizu, I. Oshima y Y. Kanai. 2005. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction* 129:621-630.
- Padmanabhan, V., F. J. Karsch y J. S. Lee. 2002. Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reprod Suppl* 59:67-82.
- Peters, A. R., T. A. Martinez y A. J. Cook. 2000. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54 (8):1317-1326.
- Peters, M. W. y J. R. Pursley. 2002. Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF2 alpha and GnRH. *J Dairy Sci* 85 (9):2403-2406.
- Pritchard, J. Y., F. N. Schrick y E. K. Inskeep. 1994. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology* 42:247-259.
- Phillips, D. J. 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol* 28 (1):1-16.
- Putney, D. J., J. R. Malayer, T. S. Gross, W. W. Thatcher, P. J. Hansen y M. Drost. 1988. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. *Biol Reprod* 39:717-728.
- Rajamahendran, R. y P. C. Sianangama. 1992. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fertil* 95:577-584.
- Ravagnolo, O., I. Misztal y G. Hoogenboom. 2000. Genetic Component of Heat Stress in Dairy Cattle, Development of Heat Index Function. *J Dairy Sci* 83 (9):2120-2125.

- Rettmer, I., J. S. Stevenson y L. R. Corah. 1992. Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. *J Anim Sci* 70 (2):508-517.
- Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming y D. C. Wathes. 1999. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J Endocrinol* 160 (1):21-33.
- Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming y D. C. Wathes. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122 (6):965-979.
- Roche, J. F. 1996. Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1 (1):19-27.
- Roth, Z., R. Meidan, A. Shaham-Albalancy, R. Braw-Tal y D. Wolfenson. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121 (5):745-751.
- Roth, Z., R. Meidan, R. Braw-Tal y D. Wolfenson. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fertil* 120 (1):83-90.
- Ryan, D. P., E. G. Blakewood, J. W. Lynn, L. Munyakazi y R. A. Godke. 1992. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J Anim Sci* 70 (11):3490-3497.
- Ryan, D. P., J. F. Prichard, E. Kopel y R. A. Godke. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 39:719-737.
- Sánchez-Torres, E. T. 1997. Efecto de la concentración de progesterona en la pulsatilidad de hormona luteinizante en bovinos. En: Séptimo Curso Internacional de Reproducción Bovina, México, D. F. 101-108.
- Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, S. A. Mertens, J. N. Guenther, J. J. Parrish y M. C. Wiltbank. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 85 (11):2803-2812.
- Scott, C. J., A. J. Tilbrook, J. A. Rawson y I. J. Clarke. 2000. Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci* 60-61:313-326.

- Smith, M. F. 1986. Recent advances in corpus luteum physiology. *J Dairy Sci* 69 (3):911-926.
- Smith, M. J. y L. Jennes. 2001. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122 (1):1-10.
- Spencer, T. E., R. C. Burghardt, G. A. Johnson y F. W. Bazer. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 82-83:537-550.
- Stevenson, J. S., E. P. Call, R. K. Scoby y A. P. Phatak. 1990. Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 73 (7):1766-1772.
- Thatcher, W. W., F. Moreira, J. D. Ambrose, C. A. Risco y R. L. Sota de la. 1997. Manejo reproductivo de hatos lecheros bajo estrés calórico. En: III Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Nutrición y Manejo. 29-58.
- Thatcher, W. W., M. Binelli, J. Burke, C. R. Staples, J. D. Ambrose y S. Coelho. 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology* 47:131-140.
- Trout, J. P., L. R. McDowell y P. J. Hansen. 1998. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. *J Dairy Sci* 81 (5):1244-1250.
- Tysseling, K. A., W. W. Thatcher, F. W. Bazer, P. J. Hansen y M. A. Mirando. 1998. Mechanisms regulating prostaglandin F2 alpha secretion from the bovine endometrium. *J Dairy Sci* 81 (2):382-389.
- Ullah, G., J. W. Fuquay, T. Keawkhong, B. L. Clark, D. E. Pogue y E. J. Murphey. 1996. Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holsteins during heat stress. *J Dairy Sci* 79 (11):1950-1953.
- Weitlauf, H. M. 1994. Biology of implantation. En: *The physiology of reproduction* E. Knobil Neill J. D. 1: 1878, New York.
- Willard, S., S. Gandy, S. Bowers, K. Graves, A. Elias y C. Whisnant. 2003. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 59 (8):1799-1810.
- Wilson, S. J., C. J. Kirby, A. T. Koenigsfeld, D. H. Keisler y M. C. Lucy. 1998a. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J Dairy Sci* 81 (8):2132-2138.

- Wilson, S. J., R. S. Marion, J. N. Spain, D. E. Spiers, D. H. Keisler y M. C. Lucy. 1998b. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci* 81 (8):2124-2131.
- Wiltbank, J. N., J. A. Rothlisberger y D. R. Zimmerman. 1961. Effect of human chorionic gonadotrophin on maintenance of the corpus luteum and embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 20:827-829.
- Wolfenson, D., W. W. Thatcher, L. Badinga, J. D. Savio, R. Meidan, B. J. Lew, R. Braw-Tal y A. Berman. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod* 52 (5):1106-1113.
- Wolfenson, D., B. J. Lew, W. W. Thatcher, Y. Graber y R. Meidan. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci* 47 (1-2):9-19.
- Wolfenson, D., Z. Roth y R. Meidan. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci* 60-61:535-547.
- Wolfenson, D., H. Sonogo, A. Bloch, A. Shaham-Albalancy, M. Kaim, Y. Folman, R. Meidan. 2002. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 22 (2): 81-90. [Abstract].
- Wray, S. 2001. Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinology* 13:3-11.
- Zeron, Y., A. Ocheretny, O. Kedar, A. Borochoy, D. Sklan y A. Arav. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121 (3):447-454.