

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL**



Endometritis en vacas Holstein y su asociación con factores climáticos

Por:

JULIETA GUADALUPE ARIAS GARCÍA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Endometritis en vacas Holstein y su asociación con factores climáticos

POR:

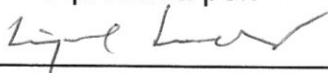
JULIETA GUADALUPE ARIAS GARCÍA

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
requisito para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Aprobada por:



Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque

Presidente del jurado



Ing. Jose Amando Rodríguez Galindo

Asesor



Dr. José Dueñez Alanís

Asesor



Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Junio de 2016

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sr. Celso Arias Mendoza.

Sra. Edilberta Petra García Vásquez.

Por traerme a la vida y darme la oportunidad de crecer y desarrollarme dentro de la sociedad. Por brindarme su confianza y apoyo incondicionalmente en cada momento de mi vida. Gracias por haberme dado la mejor herencia: mi carrera profesional.

A mi abuelo:

Sr. Fortino Arias López.

Porque en un momento de mi vida me aconsejó, impulsó y motivó a seguir con mi carrera profesional, gracias en donde quiera que estés.

A mis queridos hermanos (as):

Por el apoyo, confianza, consejos, y todo el cariño que me han dado.

A mis amigos (as):

Marcos J. Luna Reyes, Esteban Gonzales Vital, Eduardo Pérez Torres, Brenda Orta Guerrero, Araceli Datoli Garrido, Liliana Cortez Martínez, Dulce Marisol Martínez Castañeda, Omar Guadalupe Nájera Pedraza, Martin Hernández, Daniel Aguilar, José Alberto García Robles. Por su amistad, consejos, apoyo, risas, cariño, lagrimas, momentos de hermandad; por compartir parte de esta experiencia tan bonita como lo es la universidad.

AGRADECIMIENTOS

A dios: por darme salud, inteligencia, fuerza para poder llevar adelante tan gran desafío de culminar una carrera.

A mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro: que me ofreció y brindo la oportunidad de realizar el sueño de forjarme como Ingeniero Agrónomo Zootecnista.

Al Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque: Por su confianza y apoyo para trabajar en esta tesis, y por su gran disposición y asesoría.

Al Ing. Jose Amando Rodríguez Galindo: por su disposición para aclarar mis dudas en diferentes aspectos.

Al Dr. José Dueñez Alanís: Por su confianza y apoyo en diferentes aspectos académicos.

A los profesores de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Por impartir conocimientos y experiencias para formarme en mi carrera universitaria.

A los ranchos productores de leche Torreón, Coahuila. Y las ciudades vecinas de Gómez Palacio, Ciudad Lerdo, se conoce como la Comarca Lagunera.

Al supervisor de zona Mario Valdez, al encargado de granja Ismael Silva Hernández, a los operarios Ezequiel Martínez, J. Cruz Gonzales, José Alfredo Jiménez de la granja 2561 “Guadalupe 2” de la empresa Bachoco Operación Saltillo. Por permitirme desarrollar mi semestre de prácticas profesionales, por sus atenciones, enseñanzas y consejos.

MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA

La que suscribe, Julieta Guadalupe Arias García, estudiante de la carrera de Ingeniero Agrónomo Zootecnista, con matrícula 41110567 y autora de esta tesis, manifiesta que:

- 1.- Reconozco que el plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país.
- 2.- Las ideas opiniones datos e información publicada por otros autores y utilizadas en la presente tesis, han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.
- 3.- Toda la información consultada ha sido analizada e interpretada por la suscrita y redactada según mi criterio y apreciación, de tal manera que no se ha incurrido en el “copiado y pegado” de dicha información.
- 4.- Reconozco la responsabilidad sobre los derechos de autor de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifiesto no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.
- 5.- Entiendo que la función y alcance de mi comité de asesoría, está circunscrito a la orientación y guía respecto a la metodología de la investigación realizada por la siguiente tesis, así como el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionada al plagio académico a mi comité de asesoría y acepto que cualquier responsabilidad al respecto es únicamente por parte mía.

ATTE.

Julieta Guadalupe Arias García
Tesisista de licenciatura/UAAAN

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA	vii
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
Objetivos	3
Hipótesis	3
REVISION DE LITERATURA	3
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Descripción general del área de estudio	13
Vacas y su manejo	13
Datos Meteorológicos	14
Análisis estadístico	15
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	19
LITERATURA CITADA	20

INTRODUCCIÓN

En la región norte de México se encuentra Torreón Coahuila entre ciudades vecinas como Gómez Palacio, Ciudad Lerdo y otros 17 municipios de Coahuila y Durango los cuales conforman la Comarca Lagunera. Las unidades de producción de leche de esta zona son explotaciones de gran escala, con altas producciones de leche por vaca. Las vacas en esta zona presentan un deficiente comportamiento reproductivo (Mellado et al., 2013) el cual se asocia fuertemente al estrés por calor (Roth et al., 2008). La eficacia reproductiva de las vacas lecheras bajo estrés se reduce sensiblemente (Mellado et al., 2012). En el caso de estrés calórico, las vacas pueden llegar a elevar su temperatura corporal, lo cual es causa de infertilidad. El flujo de sangre de la circulación interior se desvía a la circulación periférica en un intento de reducir la temperatura corporal. La reducción del flujo de sangre a los órganos, reduce los nutrientes disponibles e incrementa los productos bioquímicos de desecho a nivel de los tejidos. Dentro de los órganos que dejan de percibir sangre se encuentran los oviductos, ovarios y útero, este último muy importante si el estrés se presenta en el parto, ya que puede ser causa de retención placentaria (Rocha. et al 2008). Esto repercute en el desarrollo de infección y la inflamación en el tracto reproductivo de vacas lecheras durante los 2 primeros meses después del parto (LeBlanc, 2014). La incidencia de metritis y de endometritis clínica o flujo vaginal purulento se acentúa en vacas con partos en meses de intenso calor (Mellado et al., 2012).

En los establos lecheros de la Comarca lagunera la presentación de celos “sucios” (moco acompañado de pus o de secreciones opacas) es muy frecuente. Existe la duda de si las vacas que presentan esta condición debieran inseminarse. La mayoría de las vacas con celo “sucio” son inseminadas en la Comarca Lagunera, pero se desconoce que tanto afecta esta anomalía reproductiva la tasa de concepción. También se desconoce cómo afectan las condiciones climáticas sobre la ocurrencia de celos acompañados de moco cervical turbio o purulento. Por lo anterior, se consideró pertinente averiguar cómo afecta el clima sobre la ocurrencia de celos acompañados con moco cervical turbio.

RESUMEN

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura, la humedad y el índice de temperatura-humedad (ITH) sobre la presencia de un moco cervical turbio o purulento (“celo sucio”) en vacas Holstein (nulíparas y multíparas) en 29 establos de la Comarca Lagunera. Se utilizaron 66,319 datos de celos. El moco cervical se clasificó como claro y transparente, o moco cervical atípico, con turbidez a moco opaco, que contenía grumos grises. Se llevaron a cabo regresiones no lineales para determinar la asociación entre la tasa de celos acompañados de moco cervical turbio y temperatura máxima, porcentaje de humedad relativa e índice de temperatura humedad. El porcentaje de celos acompañados de moco cervical turbio fue de 19.9%. Al analizar la temperatura máxima el día de la ocurrencia del estro sobre la ocurrencia de celos con moco cervical anormal se observó una tendencia cuadrática, con un efecto mínimo de la temperatura cuando esta estuvo por debajo de los 24°C. Sin embargo, se presentó un 30% de vacas con celo acompañado de moco turbio con temperaturas cercanas a los 40°C. Al incrementarse el ITH se aumentó el porcentaje de vacas con presencia de moco turbio durante el celo. El 96% de la variabilidad de la ocurrencia de “celos sucios” fue explicada por el ITH. Al incrementarse la humedad ambiental se incrementó la incidencia de celos con moco cervical turbio. Esta relación fue cuadrática con una alta incidencia de este desorden cuando la humedad ambiental alcanzó el 60%. Se concluyó que tanto la temperatura ambiental elevada como la humedad relativa elevada propician una alta incidencia de moco cervical turbio durante el estro en vacas Holstein sometidas a estrés por calor la mayor parte del año.

Palabra clave. Temperatura, Humedad, índice temperatura humedad, celo sucio, moco cervical.

Correo Electronico; Julieta Guadalupe Arias García, lupe_1386@hotmail.com

Objetivos

Determinar la influencia del índice de temperatura-humedad sobre la incidencia de los “celos sucios” en vacas Holstein en un clima con altas temperaturas la mayor parte del año.

Determinar cómo afecta la humedad relativa la incidencia de un “celo sucio” en las vacas Holstein de alta producción de leche y sometidas a estrés térmico.

Hipótesis

A mayor incremento de temperatura y humedad ambiental habrá una mayor incidencia de celos acompañados de moco turbio, indicativo de procesos infecciosos del útero.

REVISION DE LITERATURA

En un estudio de Walsh et al. (2011) se indica que la fertilidad en vacas lecheras ha disminuido en las últimas cinco décadas, mientras la producción de leche por vaca ha aumentado. Se han propuesto muchas hipótesis para explicar esta relación. Se incluyen las cuestiones de la genética, la fisiología, la nutrición, y estos factores han sido investigados en el animal, órgano, y nivel celular en momentos críticos de la vida productiva de las vacas lecheras. La revisión de estos investigadores cubre los eventos fisiológicos y sus causas y consecuencias que afectan la fertilidad en las vacas lecheras. Los investigadores recomiendan, en primer lugar, reducir al mínimo el balance energético negativo y resolver cualquier infección del útero después del parto. En segundo lugar, la expresión y la detección del estro seguidos por inseminación con semen de alta calidad (día 0). En tercer lugar, lograr la ovulación y la fertilización de un oocito de alta calidad (día 1). En cuarto lugar, un aumento temprano en la secreción de progesterona

del cuerpo lúteo (días 3-7). En quinto lugar, el endometrio uterino debe producir un ambiente temprano y apropiado para estimular el desarrollo del embrión (días 6-13). Esto lleva a sexto lugar, un gran embrión producirá cantidades adecuadas de interferón tau (días 14-18) que altera la secreción de prostaglandina uterina y las señales de reconocimiento materno de la gestación (días 16-18).

LeBlanc et al. (2014) indican que hasta la mitad de las vacas lecheras se ven afectados por al menos una metritis, flujo vaginal purulento, endometritis o cervicitis en el período posparto. Estas condiciones son el resultado de la respuesta inmune inadecuada a la infección bacteriana (dificultad para eliminar las bacterias patógenas del útero) o inflamación persistente, afectando la función reproductiva. El grado de movilización de la grasa y la eficacia con que se utiliza como “combustible” metabólico es bien reconocida como un factor de riesgo para el metabolismo y enfermedades infecciosas. La liberación de ácidos grasos no esterificados tiene efectos directos sobre el hígado y la función inmune, pero también produce citocinas pro-inflamatorias (factor α de necrosis tumoral y la interleucina-6), que contribuyen a la inflamación sistémica y a la resistencia a la insulina. Por lo tanto, la enfermedad inflamatoria del tracto reproductivo puede ser una función de ambos estímulos inflamatorios locales y regulación sistémica, así como la regulación del metabolismo de las grasas. Una mejor comprensión de las variables asociadas con resistencia a la insulina y la regulación inflamatoria en el tejido adiposo y el hígado puede conducir a la mejora de la salud del tracto reproductivo.

Bromfield et al. (2015) mencionan que la contaminación uterina con bacterias es ubicua en la vaca lechera posparto. Casi la mitad de todas las vacas lecheras posparto desarrollan la enfermedad clínica que resulta en metritis y endometritis, que causan la infertilidad y una reducción en la producción de leche. Los vínculos causales entre la infección uterina e infertilidad incluyen un ambiente hostil uterino, señalización endocrina interrumpida, y perturbaciones en la función ovárica y el desarrollo de los ovocitos. Existen diversos mecanismos de vinculación de la infección uterina con la infertilidad en la vaca lechera, concretamente; 1) presentación inmune innata en el endometrio, 2) alteración endocrina en respuesta a agentes infecciosos, y 3) el impacto de la infección en la función ovárica, desarrollo de los ovocitos, y el desarrollo folicular. El desarrollo de

los ovocitos requiere una serie de eventos temporales y organizados; sin embargo, varias de las vías celulares necesarios para la función ovárica también se utilizan durante la respuesta inmune innata a patógenos bacterianos. Estos autores proponen que la activación de las vías celulares durante esta respuesta inmune tiene un impacto negativo en la fisiología ovárica, que se manifiesta como la infertilidad detectada después de la liquidación de las bacterias del útero.

Werner et al. (2012) mencionan que el lumen uterino en las primeras semanas posparto de las vacas lecheras está contaminado con diferentes bacterias. Los patógenos uterinos más relevantes son *Escherichia coli* y *Trueperella pyogenes*. La prevalencia de α -hemolítica, Streptococos y Stafilococos coagulasa negativos (CNS) también es alta; sin embargo, estos patógenos se consideran oportunistas. El objetivo general del estudio mencionado fue investigar los efectos de la presencia intrauterina de *E. coli*, *T. pyogenes*, Streptococos hemolítico- α , o CNS a los 10 ± 1 días de lactancia (DIM) en el tipo de bacteria 2 semanas más tarde y su influencia en las infecciones uterinas y el desempeño reproductivo posterior de las vacas. Por otra parte, se cuantificaron 2 factores metodológicos relevantes (es decir, de laboratorio y de instrumentos de muestreo). Se recogieron muestras bacteriológicas a 10 ± 1 y 24 ± 1 DIM del lumen uterino utilizando un citocepillo (CB). El moco vaginal se clasificó por vaginoscopia. En una submuestra se compararon resultados bacteriológicos de 3 laboratorios diferentes, de citocepillo, y bastoncillos de algodón (CS).

Se recogieron muestras de descarga uterina a 10 ± 1 DIM y se tomaron muestras bacteriológicas con citocepillo y bastoncillos de algodón. Las bacterias se identificaron y cuantificaron; el crecimiento bacteriano se cuantificó en una escala de 4 puntos. Los animales infectados con *E. coli* o *T. pyogenes* a 10 ± 1 DIM tenían un mayor riesgo de una infección con las mismas especies bacterianas a 24 ± 1 DIM [*E. coli* riesgo relativo (RR) = 3.7 y *T. pyogenes* RR = 2.9]. Por otra parte, el riesgo de ser diagnosticadas con flujo vaginal anormal a 24 ± 1 DIM aumentó en vacas con *E. coli* (RR = 1.7) o *T. pyogenes* (RR = 1.7) a 10 ± 1 DIM. La infección uterina con Streptococos hemolítico α o Stafilococos coagulasa negativos no aumentó el riesgo de una infección con *T. pyogenes* o *E. coli* o flujo vaginal anormal 2 semanas más tarde. Las vacas con *E. coli* a 10 ± 1 DIM o *T. pyogenes* a 24 ± 1 DIM tuvieron mayores intervalos a la primera

inseminación artificial de vacas positivas para las 3 especies de bacterias restantes. Las vacas con *T. pyogenes* en 10 ± 1 DIM requirieron más días para quedar preñadas y más vacas fueron sacrificadas cuando eran positivas para *E. coli* a 10 ± 1 DIM.

El objetivo de un estudio de Bicalho et al. (2012) fue evaluar la relación entre los factores bacterianos específicos de especie virulencia (VFS) presentes en el útero en 3 etapas diferentes de la lactancia (1-3, 8-10 y 34-36 días de lactancia (DIM)) y la incidencia de metritis y endometritis clínica en vacas lecheras. Los siguientes genes VFS se investigaron: la OLP (pyolysin), (proteína de colágeno vinculante) CbpA y fimA (expresión fimbrias), *Arcanobacterium pyogenes* específicos; FimH (un tipo 1 componente pilus), *Escherichia coli* específica; y IktA (leucotoxina), *Fusobacterium necrophorum* específico. Hisopos uterinos fueron recogidos de 111 vacas lecheras posparto. Se utilizó PCR para detectar la presencia de OLP, CbpA, fimA, FimH, y los genes IktA. *A. pyogenes* CbpA se detectó en sólo 5 muestras y, por lo tanto, no fue sometido a un análisis más profundo. *E. coli* (FimH) se asoció significativamente con metritis y endometritis cuando se detectó a 1-3 DIM; *F. necrophorum* (IktA) se asoció significativamente con metritis cuando se detectó en 1-3 y 8-12 DIM y con endometritis cuando se detectó a 34-36 DIM; y *A. pyogenes* (fimA y OLP) se asoció con metritis (fimA) cuando se detectó a los 1-3 DIM y endometritis (fimA y OLP) cuando se detectó a los 8-10 y 34-36 DIM.

En un estudio de Duffield et al. (2012) se identificaron los factores de riesgo para cuantificar el efecto de la anovulación posparto en el rendimiento reproductivo en vacas lecheras. Se utilizaron datos de 2,178 vacas Holstein en 6 hatos comerciales en un ensayo clínico aleatorizado. Se recogieron datos sobre la incidencia de enfermedades periparto, los antecedentes de parto, y la condición corporal de las vacas. Las vacas fueron examinadas en la semana 5 después del parto para las enfermedades del aparato reproductivo. La endometritis se definió como $\geq 6\%$ de polimorfonucleares en la citología endometrial, y la secreción vaginal purulenta se definió como la presencia de flujo vaginal mucopurulenta. Las vacas fueron monitoreadas hasta los 300 días de lactancia (DIM) para el desempeño reproductivo. La concentración de ácidos grasos no esterificados séricos (NEFA) se midió una vez durante la semana antes del parto esperado. Se

midieron β -hidroxibutirato en suero sanguíneo, NEFA, y la haptoglobina en la semana 1, 2, y 3 después del parto. La progesterona sérica (P4) se midió en la semana 3, 5, 7 y 9 después del parto. El final del período de anovulación posparto se definió como el primer tiempo de muestreo en el que P4 era > 1 ng / ml. La prevalencia de la anovulación fue de 72, 44, 26, y 17% en la semana 3, 5, 7 y 9, respectivamente. Las vacas fueron clasificadas de acuerdo a su estado ovulatorio; como tener la función lútea en 21 DIM (Cyc21), como de baja progesterona sérica a 21 DIM pero tener la función lútea, al menos una vez en 35 o 49 o 63 DIM (Cyc63), o ser anovulatorio en 63 DIM (Anov63; no hay muestras con P4 > 1 ng / ml). Los factores asociados con la ovulación temprana (Cyc21) incluyeron la estación, el número de partos, disminución de haptoglobinemia, y la disminución de la concentración de ácidos grasos no esterificados séricos antes y después del parto. Los factores de riesgo para la anovulación prolongada (Anov63) presentaban endometritis citológica, aumento de haptoglobinemia y mayores concentraciones de ácidos grasos no esterificados séricos en suero sanguíneo antes y después del parto. Las vacas clasificadas como Anov63 tenían un mayor tiempo medio hasta la primera ovulación en comparación con Cyc63 (74.1 vs 73.2 días). El efecto de la prolongada anovulación posparto en mediano tiempo hasta la gestación estuvo condicionada al número de partos; con un efecto perjudicial en vacas de ≥ 3 partos (129 días para Cyc21, 151 días para Cyc63, y 180 para Anov63 días), pero no se observó efecto en vacas con menos de 2 partos. En general, estos hallazgos sugieren que la anovulación posparto se asoció con indicadores de balance de energía y la inflamación uterina, y con efectos perjudiciales sobre el comportamiento reproductivo.

Deguillaume et al. (2012) estudiaron muestras citológicas endocervicales y endometriales en 168 vacas Holstein de entre 21 y 60 días de lactancia (DIM) para investigar la prevalencia de la inflamación cervical y el efecto en los días a la concepción. Los análisis estadísticos se basaron en estratificación de los DIM en el examen (< 35 vs ≥ 35 DIM). La inflamación endocervical con $\geq 5\%$ de neutrófilos antes de 35 DIM (sin tener en cuenta el nivel de inflamación del endometrio) se asoció con una disminución de riesgo de preñez dentro de los 300 DIM (índice de riesgo ajustada, 0.4; 95% intervalo de confianza: 0.3-0.8). Se observó una disminución en el riesgo de preñez cuando se contaron $>6\%$ de

neutrófilos en los frotis del endometrio (índice de riesgo ajustado= 0.4). Este estudio sugiere un efecto aditivo endocervical combinado con la inflamación del endometrio en el riesgo de preñez dentro de los 300 DIM. Con el uso de los umbrales del 5% de neutrófilos para el cuello del útero y 6% de neutrófilos en el útero, el 11% de las vacas examinadas antes de los 35 DIM presentaron solo cervicitis, el 13% fueron afectados por endometritis solamente, y el 32% sufría de tanto de infecciones endometriales y endocervicales. La presencia (ausencia) de cervicitis no era indicativa de la presencia (ausencia) de endometritis. Este estudio mostró que, además de inflamación uterina, la inflamación endocervical en la lactancia temprana afecta a la tasa de concepción.

Huzzey et al. (2007) indican que la metritis es una enfermedad especialmente preocupante después del parto, debido a sus profundos efectos negativos en el comportamiento reproductivo de las vacas lecheras. Las vacas con riesgo de metritis tienen tiempos de alimentación más cortos en los días antes del parto, pero el consumo de materia seca preparto y la ingesta de agua también pueden ser útiles en la identificación de las vacas en riesgo de esta enfermedad. Medidas de alimentación, consumo de agua y la ingesta también pueden verse afectados por las interacciones sociales entre vacas alojadas en grupo. El objetivo de este estudio, fue medir el consumo, la alimentación, la bebida y el comportamiento social para determinar qué medidas podrían identificar vacas en riesgo de metritis después del parto. Se registraron medidas de alimentación y conducta de beber y de admisión de 101 vacas lecheras Holstein de 2 semanas antes del parto y hasta 3 semanas después de éste utilizando un sistema de monitoreo electrónico. El comportamiento social en el comedero se evaluó a partir de grabaciones de vídeo. La severidad de metritis fue diagnosticada con base en la temperatura diaria corporal rectal, así como la condición de flujo vaginal que se evaluó cada 3 días después del parto hasta el día 21. En este estudio, 12% de las vacas fueron clasificados con metritis grave y el 27% con metritis no tan severa. La hora de comer en el periodo preparto y DMI fueron más relevantes para identificar a las vacas en riesgo de metritis. Las vacas que desarrollaron metritis severa pasaron menos tiempo alimentándose y consumieron menos alimento en comparación con las vacas sanas que comenzaron 2 semanas antes de la

observación de signos clínicos de infección. Por cada 10 min de disminución de la media en cuanto a la hora de la comida diaria durante la semana antes del parto, las probabilidades de metritis severa aumentaron un 1.72%, y por cada disminución de 1 kg en DMI durante este período, las vacas fueron casi 3 veces más propensas a ser diagnosticados con este trastorno. Durante la semana antes del parto, las vacas que luego fueron diagnosticadas con metritis severa, presentaron consumos de alimento más bajos y menos veces de alimentación durante las horas siguientes a la entrega de alimentación fresca. Este artículo revisa la importancia del metabolismo energético en vacas lecheras de transición, sus asociaciones con la enfermedad y la reproducción, y las estrategias para el control de las vacas en condiciones de campo durante este tiempo crítico. Esencialmente todas las vacas lecheras experimentan un período de resistencia a la insulina, la reducción de la ingesta de alimento, balance energético negativo, hipocalcemia, la función inmune reducida y la contaminación bacteriana del útero poco antes, o en las semanas después del parto. Un tercio de las vacas lecheras puede verse afectada por algún tipo de enfermedad metabólica o infecciosa en la lactancia temprana. Acciones de rutina proactivas, observaciones o análisis están destinados a proporcionar precisa y eficiente la detección temprana de problemas, para proporcionar una oportunidad para la investigación y la intervención con el fin de limitar las consecuencias y los costos de los problemas de salud y el desempeño reducido o bienestar animal.

LeBlanc et al. (2012) revisaron los datos y conceptos sobre el desarrollo de la inflamación en el tracto reproductivo de vacas lecheras durante los 2 primeros meses después del parto. La incidencia de metritis es típicamente 10-20%, con 5-15% de las vacas que tienen secreción purulenta vaginal (PVD), 15-40% que tiene cervicitis aproximadamente 1 mes después del parto, y 10-30% que tiene endometritis citológica entre 1 y 2 meses después del parto. La endometritis, cervicitis y PVD son condiciones distintas, cada una de las cuales está asociada con un aumento significativo de tiempo para quedar preñadas, y las vacas afectadas suelen tener más de una de estas condiciones. En conjunto, el 35-50% de las vacas tienen al menos una forma de inflamación patológica del tracto reproductivo entre 3 y 7 semanas después del parto. Se plantea la hipótesis de

que la enfermedad del tracto reproductivo representa una falla del sistema inmune para cambiar lo suficientemente rápido para el mantenimiento de la preñez a un estado en el cual cumpla la función de deshacerse de las bacterias y restos de tejido y luego a un estado estable después de 3-4 semanas. Existen numerosos vínculos entre el metabolismo de las grasas, la inflamación y la función inmune, los cambios en éstas preceden a la enfermedad del tracto reproductivo por varias semanas. Un estado pro-inflamatorio excesivo temprano en el período post-parto parece ser una característica clave de las vacas con endometritis, aproximadamente 1 mes después. Generalmente, el balance negativo de energía postparto (NEB) se asocia con inflamación uterina más severa o prolongada. Aspectos relacionados a la proliferación de células mononucleares y explosión oxidativa de los neutrófilos son comúnmente afectadas, particularmente en asociación con concentraciones elevadas de ácidos grasos no esterificados y en menor grado por la cetosis. En resumen, estos autores indican que NEB contribuye a la disfunción inmune que a su vez es un componente importante de la enfermedad inflamatoria del tracto reproductivo.

LeBlanc et al. (2011) indican que la incidencia de metritis es típicamente entre 10 y 20%, de endometritis clínica o flujo vaginal purulenta (PVD) de aproximadamente 15%, y de subclínica o endometritis detectada con citología un 15%. Un balance energético negativo después del parto se asocia con inflamación uterina más grave o prolongada. Los cambios en el consumo de alimento, la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias, en particular la interleucina (IL) 1, IL6 y IL8, las concentraciones de beta-hidroxibutirato (BHBA) o ácidos grasos no esterificados (NEFA), y la función inmune innata que circulan preceden tanto a metritis como a endometritis por varias semanas. Las infecciones por *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* y *Arcanobacterium* se asocian tanto con la metritis y PVD. Hay nuevos datos que sugieren que los factores de virulencia específicos en *E. coli* asociados con la adherencia pueden ser importantes en metritis y PVD. Endometritis diagnosticada con un examen citológico y PVD se superponen pero en gran medida presentan distintas condiciones, y hay datos emergentes que muestran que existe cervicitis concurrente e independiente de la endometritis. Estos autores mencionan que

queda mucho por aprender acerca de lo que inicia y sostiene la inflamación nociva en el tracto reproductivo. Dicha información es necesaria para el desarrollo de tratamientos eficaces para las diferentes formas de la enfermedad y, más importante, para desarrollar medios para prevenir la endometritis y cervicitis. En particular, la vacunación frente a patógenos e intervenciones uterinas específicas para modular la respuesta inmune innata parecen ser importantes vías de investigación. En la actualidad, las mejores prácticas de gestión comúnmente recomendados para vacas en el período de transición es probable que sean útiles para mitigar el riesgo de enfermedad reproductiva.

El objetivo de un estudio de Salasel et al. (2010) fue determinar la prevalencia y factores de riesgo de endometritis subclínica (SE) y sus efectos sobre la fertilidad de las vacas lecheras. Las vacas lecheras de 1 a 5 partos que fueron inseminadas artificialmente (AI) 3 o más veces (en un promedio de 3.9 veces) se examinaron a 190 ± 40 días en lactancia y vacas clínicamente normales ($n = 77$) fueron seleccionadas con base en la ausencia de las descargas anormales en la inspección externa y la ausencia de hallazgos anormales en la palpación transrectal y el examen ecográfico. Muestras endometriales se recogieron desde el útero mediante el uso de la técnica de lavado en la fase lútea del ciclo estral. Las muestras recogidas se centrifugaron y una gota de sedimento se colocó en un porta objetos limpio y fueron teñidas con Giemsa. El porcentaje de células polimorfonucleares (neutrófilos) se contó para cada espécimen. Los datos analizados mostraron que la presencia media de los neutrófilos fue de 3.1% (0-9) en las vacas seleccionadas. Infecciones que siguieron a un parto anormal (distocia, nacimientos de gemelos, y el aborto), retención de placenta, y uterina posparto se asociaron con un aumento de la prevalencia de la SE. Posteriormente, SE se asoció significativamente con una disminución en la tasa de concepción en la próxima inseminación artificial (IA). La tasa de concepción en la próxima IA fue del 5% para las vacas ($n = 38$) con SE ($\geq 3\%$ de neutrófilos), y el 47% para las vacas ($n = 34$) y sin SE ($<3\%$ de neutrófilos). La prevalencia de la SE citológicamente diagnosticada ($\geq 3\%$ de neutrófilos) fue 52.7% ($n = 38$). Estos autores concluyeron que el parto anormal, la placenta retenida, y las infecciones uterinas posparto pueden estar asociados con un aumento en la prevalencia de la

SE y, posteriormente puede disminuir la eficiencia reproductiva y aumentar la incidencia de repetir el síndrome descrito.

Mari et al. (2012) indica que en el ganado vacuno, la eliminación de la contaminación bacteriana en el lumen uterino después del parto a menudo se retrasa o compromete, y las bacterias patógenas pueden persistir, causando enfermedades uterinas e infertilidad. El objetivo del estudio de este grupo de investigadores fue comparar la recuperación clínica y bacteriológica después de una sola administración intrauterina de formosulphatiazole, cefapirina o placebo en vacas con endometritis clínica. Las vacas (n= 80), no menos de 28 días después del parto, con endometritis clínica se incluyeron en el estudio. La endometritis se diagnosticó mediante un examen reproductivo completo, incluyendo la palpación rectal, ecografía, vaginoscopía e hisopo uterino. Todas las vacas fueron asignadas aleatoriamente a recibir uno de tres tratamientos intrauterinos (T0): 2500 mg de formosulphatiazole (Grupo A); 500 mg de cefapirina (Grupo B); placebo (4,250 mg de propilenglicol; Grupo C). Las vacas fueron examinadas en el primer estro después del tratamiento o 30 días después (T1). Las bacterias aisladas fueron *E. coli*, *A. pyogenes*, *Pasteurella spp.* y *Streptococcus spp.* Después del tratamiento, en el Grupo A y B sólo 6/30 (20.0%) y 6/24 (25.0%) de las vacas mostraron un cultivo bacteriológico positivo, mientras que en el Grupo C el número de animales positivos fue significativamente mayor (19/26; 73.1%). En T0, puntuaciones clínicas totales fueron similares entre los tres grupos (Grupo A: 5.84 ± 1.07 ; Grupo B: 5.91 ± 1.0 ; Grupo C: 5.62 ± 1.17) y el indicativo de endometritis clínica. En T1, las puntuaciones de endometritis fueron significativamente más bajas que los reportados antes de la infusión uterina. Sin embargo, el Grupo A y la puntuación B, 0.4 ± 0.9 y 1.0 ± 2.1 , respectivamente, corresponden a una ligera endometritis, mientras que los animales del grupo C reportaron una puntuación total de endometritis significativamente mayor (4.6 ± 3.5) que corresponde a la endometritis. En conclusión, la preparación formosulphatiazole comercial fue tan eficaz como cefapirina y más eficaz que el placebo para el tratamiento de la endometritis clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general del área de estudio

Este estudio se realizó en la Comarca Lagunera en 29 establos comerciales cada uno con 1,200 a 3,000 vacas Holstein en ordeña. Los establos se ubican en las proximidades de la Latitud 25° 32' Norte y 103° 28' de longitud oeste, a una altitud de 1140 msnm. En la zona de estudio se presenta un clima semidesértico, con una precipitación pluvial anual de 230 mm, y una temperatura anual promedio de 23.7°C, pero puede alcanzar una temperatura máxima de 43° C en verano y una temperatura mínima de -5° C en invierno. Se presenta una humedad relativa promedio de 58%, con una máxima de 83% y una mínima de 29% (CONAGUA, 2008). Se presentan vientos máximos de 5 km/h y la evaporación es de 2500 mm anual.

Vacas y su manejo

Se utilizaron datos de vacas Holstein alta productoras (entre nulíparas y multíparas) de un alto potencial lechero (>9,000 kg en 305 días). Las vacas se manejaban en forma intensiva, ofreciéndoles heno de alfalfa y concentrado (proporción forraje: concentrado 50:50), 3 veces por día, de acuerdo a sus requerimientos nutricionales en sus diferentes etapas fisiológicas. El agua se les proporcionaba a libre acceso.

Las vacas se ordeñaban 2 o 3 veces al día, según el establo. Los establos cuentan con equipo enfriador con ventiladores y atomizadores, los cuales se activan cuando la temperatura ambiental llega a los 26°C. La detección de celos se realizaba por medio de podómetros, observaciones visuales, crayoneo y detección de calores a través del personal encargado y personal técnico de inseminación (2 veces por día). Las vacas eran inseminadas artificialmente aproximadamente 12 h después de que éstas eran detectadas en celo.

Después del parto, el aparato reproductivo de todas las vacas era revisado por un médico veterinario para determinar la correcta involución uterina y la ocurrencia de metritis. Las vacas no se inseminaban hasta rebasar los 50 días de

lactancia. Después de este tiempo, las vacas eran observadas por signos de celo dos veces por día (800 y 1700, durante 30 minutos) y aquellas detectadas en celo eran inseminadas artificialmente (semen importado de los Estados Unidos de América). Para las inseminaciones se utilizaba la regla de la deposición del semen aproximadamente 12 horas después de la detección del celo.

En algunas vacas (repetidoras) se aplicaba un tratamiento para la inducción de la ovulación consistente en el siguiente protocolo: el día 0 se aplicaba el implante de progesterona (CIDR 1g) más GnRH (2 ml Fertagyl); el día 7 del programa se retira el dispositivo intravaginal y se aplica PGF2a (2 ml Celosil); el día 8 se aplica 1 mg de Benzoato de estradiol (estradiol); el día 9 GnRH (2 ml Fertagyl) después de 16 a 20 horas se lleva a cabo la inseminación artificial a tiempo fijo.

Los datos se seleccionaron para incluir sólo las vacas con al menos un servicio, en la lactancia, y con un intervalo del parto al servicio mayor de 45 días y de menos de 150 días.

Se utilizaron 66,319 datos de celos. El moco cervical se clasificó como claro y transparente, con una viscosidad sana y sin mal olor; o moco cervical atípico, con la presencia de ligera turbidez a moco opaco, que contenía grumos grises. Varios técnicos participaron en la IA en las explotaciones evaluadas, y todos ellos recibieron entrenamiento para detectar el moco vaginal opaco. La observación de la mucosidad se hizo durante las descargas espontáneas de las vacas en estro o por el escrutinio del moco adherido a la pipeta de inseminación después de la IA.

Datos Meteorológicos

La temperatura máxima y la humedad, el día de la inseminación, se obtuvieron de una estación meteorológica ubicada aproximadamente a 20 km de las explotaciones lecheras.

Esta información se utilizó tanto en forma individual como para calcular el índice de temperatura-humedad (ITH) para cada día, de acuerdo con la siguiente ecuación (Mader et al., 2006):

$THI = 0.8 \times \text{temperatura} + RH / 100 \times (\text{temperatura} - 14.4) + 46,4$, en el que RH es la humedad relativa (%). El estudio se llevó a cabo de enero de 2012 hasta diciembre de 2013.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo correlaciones de Pearson para determinar el grado de asociación entre las variables consideradas en este estudio. Posteriormente se probaron varios modelos de regresión no lineales para detectar aquel con el mejor ajuste entre la tasa de celos acompañados de moco cervical turbio y temperatura máxima, porcentaje de humedad relativa e índice de temperatura humedad. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el Proc REG y Proc NONLIN de SAS, versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). La elección de los modelos antes mencionados se basó en el análisis de los coeficientes de determinación, la dispersión de los valores residuales y los criterios de información Akaike. Se consideró un valor de $P < 0.01$ como criterio para probar la hipótesis de que la pendiente (β) de la ecuación no es igual a cero.

RESULTADOS

El porcentaje de celos acompañados de moco cervical turbio fue de 19.39% (12,858 “celos sucios”/ 66,319 total de celos x 100).

En el presente estudio se analizó la temperatura máxima del día sobre la ocurrencia de celos con moco cervical anormal. Esta asociación se presenta en la Figura 1. La asociación anterior mostró una tendencia cuadrática, con un efecto mínimo de la temperatura cuando esta estuvo por debajo de los 24°C. Sin embargo, a medida que la temperatura fue en aumento, el porcentaje de celos acompañados de moco turbio fue en aumento, alcanzándose un 30% de vacas con celo acompañado de moco turbio con temperaturas cercanas a los 40°C. Se tuvo un $R^2=0.93$ lo cual muestra que la relación entre las variables indicadas tienen una estrecha correlación. Otros modelos como el lineal, exponencial y logarítmicos no mostraron un coeficiente de determinación como el alcanzado con

el modelo cuadrático, por lo que la ecuación exponencial fue la que mejor describió la asociación ya mencionada, siendo el valor de $p < 0.01$ para probar la hipótesis de que β no es igual a 0.

La Figura 2 muestra que al incrementarse el ITH se aumentó el porcentaje de vacas con presencia de moco turbio durante el celo. Esta relación fue cuadrática, y al igual que la temperatura ambiental, la relación entre estas variables fue muy estrecha, pues el 96% de la variabilidad de la ocurrencia de “celos sucios” fue explicada por el ITH.

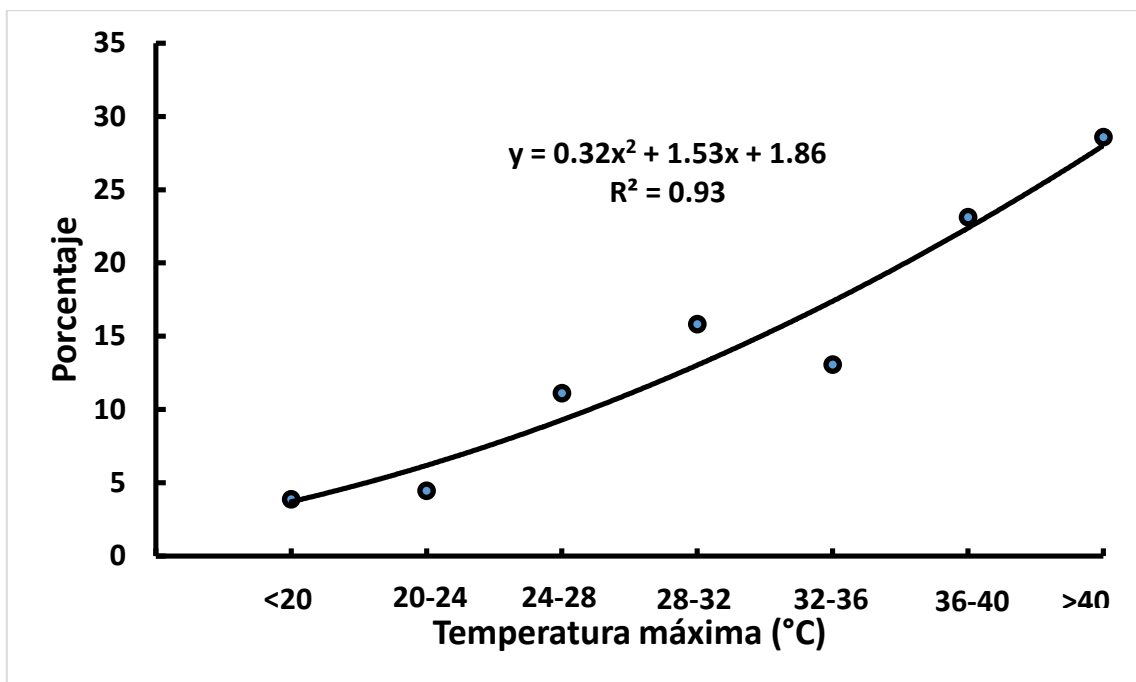


Figura 1. Asociación entre la temperatura ambiental y el porcentaje de ocurrencia de los 12,858 “celos sucios” acompañados de moco cervical turbio del total estudiado de 66,319 vacas Holstein en la Comarca Lagunera.

En la Figura 3 se muestra la asociación entre la humedad relativa al momento de la ocurrencia del celo y la presencia de celos acompañados de moco turbio o purulento. Al igual que las variables climáticas ya descritas, al incrementarse la humedad ambiental se incrementó la incidencia de celos con moco cervical turbio. Esta relación fue cuadrática con bajos casos de celo con moco turbio con humedad ambiental alrededor de 30%, pero con una alta incidencia de este desorden cuando la humedad ambiental alcanzó el 60%.

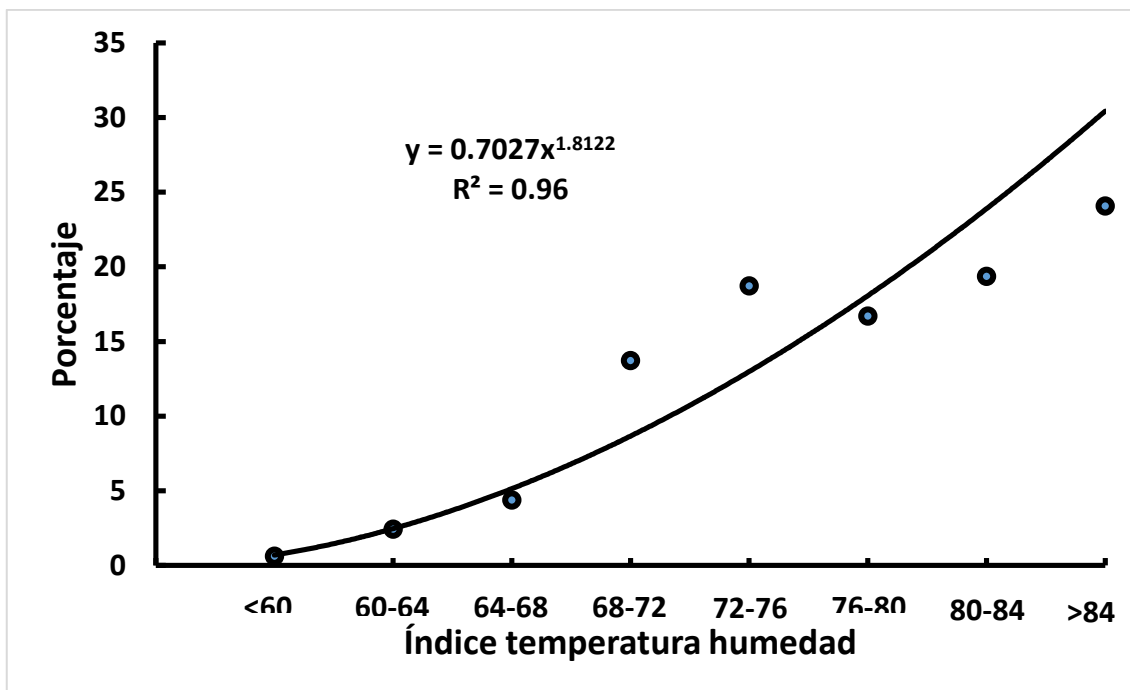


Figura 2. Asociación entre el índice temperatura-humedad y el porcentaje de ocurrencia de los 12,858 “celos sucios” del total estudiado de 66,319 vacas Holstein en la Comarca Lagunera.

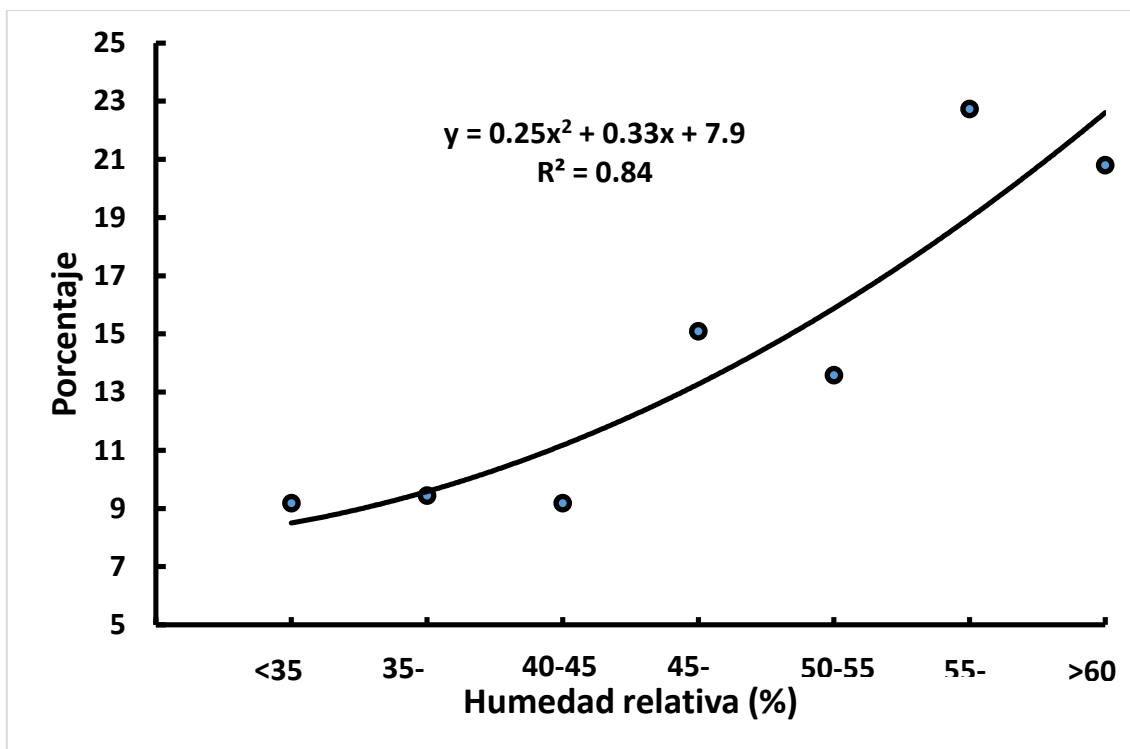


Figura 3. Asociación entre la humedad relativa y el porcentaje de ocurrencia de los 12,858 “celos sucios” del total estudiado de 66,319 vacas Holstein en la Comarca Lagunera.

DISCUSIÓN

En el presente estudio las vacas que experimentaron altas temperaturas ambientales al momento de la ocurrencia del celo presentaron porcentajes notablemente más alto de moco purulento, es decir, “celo sucio” durante el estro. Esto concuerda con la observación de otros autores al mencionar que un estrés térmico puede interferir en una recuperación posparto, causando expulsión de moco espeso y sanguinolento (Ronchi et al., 2001; Tibbrook et al., 2000).

La detección de un patrón estacional claro para la ocurrencia de estros con moco cervical turbio al momento de la inseminación artificial está de acuerdo con observaciones de Reyes y Mellado (1994) y Gautam et al. (2009), quienes encontraron tasas más altas de las infecciones uterinas en verano.

Los mecanismos responsables de las infecciones uterinas estacionales son poco conocidos. En el presente estudio, las altas temperaturas ambientales posiblemente propiciaron el crecimiento de bacterias oportunistas y patógenos (Tummaruk et al., 2010), lo que dio lugar a una mayor supervivencia de patógenos fuera de las vacas (Gautam et al., 2011). Otra posibilidad es una reducción en el sistema inmune del huésped debido al estrés por calor durante el verano (Do Amaral et al., 2011; Tao et al., 2012).

Al mostrarse una gran relación entre la temperatura y la ocurrencia de celos con moco turbio sugiere que el rango de confort térmico en el área de estudio, resulta ser inapropiado para las vaca Holstein; esta observación se apoya en el drástico impacto que tiene la temperatura ambiental sobre la tasa de concepción de las vacas en esta zona (Mellado et al., 2013).

Al incrementarse la temperatura ambiental, causa que el flujo de sangre de la circulación interior de la vaca se desvíe a la circulación periférica en un intento de reducir la temperatura corporal. La reducción del flujo de sangre a los órganos, reduce los nutrientes disponibles e incrementa los productos bioquímicos de desecho a nivel de los tejidos. Dentro de los órganos que dejan de percibir sangre

se encuentran; útero' oviductos, y ovarios (Rocha et al., 2008). Lo anterior posiblemente incrementa la susceptibilidad de las vacas a presentar moco turbio durante el celo, lo que puede suponer una forma de inflamación patológica del tracto reproductivo derivado de una metritis, endometritis o cervicitis (LeBlanc et al., 2014). Las vacas lecheras son propensas a la contaminación uterina con bacterias, los patógenos uterinos más relevantes son *Escherichia coli* y *Trueperella pyogenes*. La prevalencia de α -hemolítica, streptococos y stafilococos coagulasa negativos (CNS) también es alta; sin embargo, estos patógenos se consideran oportunistas (Galvão, 2013).

Este estudio mostró una alta asociación entre la humedad relativa y la incidencia de celos acompañados de moco cervical turbio, esto independiente de la temperatura ambiental. Lo anterior sugiere que la humedad es otro factor determinante para que se presente el moco cervical turbio, indicativo de alta actividad de agentes patógenos en el útero, cérvix o vagina.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De conformidad con los resultados obtenidos de trabajar con correlaciones estadísticas, desarrollando las regresiones no lineales, y las condiciones bajo las cuales se realizó, se puede concluir lo siguiente:

Los datos de este estudio demuestran una $p < 0.01$, siendo una probabilidad con seguridad del 99%. Se identifica que una alta temperatura ambiental tiene una gran influencia en la presencia de un moco cervical turbio durante el celo.

Para el índice temperatura humedad también resultó una $p < 0.01$, la probabilidad estadística es segura.

Igualmente, un alto porcentaje de humedad es un factor muy importante para la ocurrencia de celos acompañados con moco cervical turbio. Se obtuvo una $p < 0.01$ esto da una seguridad del 99%.

Por lo anterior, se aconseja a los productores de leche que minimicen el estrés por calor de las vacas para reducir las ocurrencias de “celos sucios”, ya que con los resultados obtenidos no queda duda de que las vacas Holstein de alto rendimiento tienden a ser más propensas a presentar celos acompañados de secreciones cervicales con rastros de infecciones uterinas con el incremento del calor o humedad del ambiente. Estos datos sugieren que el estrés por calor a que son sometidas las vacas Holstein dan oportunidad al desarrollo de bacterias produciendo infecciones en el tracto reproductivo.

LITERATURA CITADA

- Bicalho**, M.L.S., Machado V.S., Oikonomou G., Gilbert R.O., Bicalho. R.C. 2012, Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Microbiologia Veterinaria*, 157: 125–131.
- Bromfield**, J.J., Santos. J.E.P., Block. J., Williams. R.S., Sheldon. M. 2015, PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. *Alliance of Crop, Soil, and Environmental Science Societies*, 93: 2021-2033.
- Deguillaume**, L., Geffré, L. Desquilbet, A. Dizien, S. Thoumire, C. Vornière, C, Constant F, Fournier R, Chastant-Maillard S. 2012. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 1776–1783.
- Do Amaral**, B.C., Connor, E.E., Tao, S., Hayen, M.J., Bubolz, J.W., Dahl, G.E. 2011. Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 86-96.
- Duffield**. T.F., Leslie. K.E., Waltton. J.S., LeBlanc. S.J. 2012, Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 1845–1854.

- Galvão, K.N.** 2013. Uterine diseases in dairy cows: understanding the causes and seeking solutions. *Animal Reproduction*, 10: 228-238.
- Gautam, R., Bani-Yaghoub, M., Neill, W.H., Döpfer, D., Kaspar, C., Ivanek, R.** 2011. Modeling the effect of seasonal variation in ambient temperature on the transmission dynamics of a pathogen with a free-living stage: example of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 102: 10-21.
- Gautam, G., Nakao, T., Yusuf, M., Koike, K.** 2009. Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Animal Reproduction Science*, 116: 175-187.
- Huzzey, J.M., Veira, D.M., Weary, D.M., Keyserlingk, M.A.G.** 2007, Prepartum Behavior and Dry Matter Intake Identify Dairy Cows at Risk for Metritis. *J Journal of Dairy Science*, 90:3220-3233.
- LeBlanc, S.J.** 2012. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 18-30.
- LeBlanc, S.J.** 2014. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*, 8: 54-63.
- LeBlanc, S.J, Takeshi Osawa., Jocelyn Dubuc.,** 2011, Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Teriogenology An International Journal of Animal Reproduction*, 76: 1610-1618.
- LeBlanc, SJ,** 2010, Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56: 29-35.
- Mari, G., Lacono. E., Toni. F., Predieri. P.G., Merlo. B.** 2012, Evaluation of the effectiveness of intrauterine treatment with formosulphathiazole of clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Teriogeology*, 78: 189–200.

- Mellado**, M., Lara, L.M., Veliz, F.G., de Santiago, M.A., Avendaño-Reyes, L., Meza-Herrera, C., García, J.E. 2015. Conception rate of artificially inseminated Holstein cows affected by cloudy vaginal mucus, under intense heat conditions. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50: 492-498.
- Mellado**, M., Sepúlveda, E., Meza-Herrera, C., Veliz, F.G., Arevalo, J.R., Mellado, J., de Santiago, A. 2013. Effect of heat stress on reproductive efficiency of high yielding Holstein cows in a hot-arid environment. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26: 193-200.
- Mellado**, M., Zuñiga, A., Veliz, F.G., de Santiago, A., Garcia, J.E., Mellado, J., 2012. Factors influencing pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder cows induced to ovulate with a CIDR-based protocol. *Animal Reproduction Science*, 134: 105–111.
- Reyes**, C., Mellado, M. 1994. Ocurrencia de desórdenes derivados del parto y mastitis en vacas Holstein, en función del número de partos y meses del año. *Veterinaria México*, 25: 133-135.
- Rocha**, J.C., Córdova-Izquierdo, A. 2008, Causas de retención placentaria en el ganado bovino. *Revista electrónica de clínica veterinaria RECV*, 3: p. 16.
- Ronchi**, B., Stradaioli, G., Verini Supplizi, A., Bernabuci, U., Lacetera, N., Accorsi, P.A., 2001. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17beta, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livestock Production Science* 68: 231-241.
- Roth**, Z. 2008, Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 238–244.
- Salasel**, B., A. Mokhtari, Taktaz, T. 2010. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Teryogenology*, 74: 1271–1278.

- Tao, S.;** Monteiro, A.P.A., Thompson, I.M., Hayen, M.J., Dahl, G.E. 2012. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 95: 7128-7136.
- Tilbrook, A.J.,** Turner, A.I., Clarke, I.J. 2000. Effects of heat stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Journal of Reproduction and Fertility* 5: 105-113.
- Tummaruk, P.,** Kerdangsakonwut, S., Prapasarakul, N., Kaeoket, K. 2010. Endometritis in gilts: reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 575-584.
- Walsh, S.W.,** Williams. E.J., A.C.O. Evans. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123: 127–138.
- Werner, A.,** Suthar, V., Plontzke. J., Heuwieser, W. 2012. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *Journal of Dairy Science*, 95: 7105–7114.