

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**“Evaluación del efecto de hCG y GnRH sobre la tasa de
concepción en vacas Holstein de primer servicio en tres hatos
lecheros localizados en el cantón Mejía”**

JORGE TOMÁS PÉREZ MOYA

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del Título
de Médico Veterinario

Quito

Abril de 2008

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO DE CIENCIA DE LA SALUD: PROGRAMA DE MEDICINA
VETERINARIA

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

“Evaluación del efecto de hCG y GnRH sobre la tasa de concepción en vacas
Holstein de primer servicio en tres hatos localizados en el cantón Mejía”

JORGE TOMÁS PÉREZ MOYA

Dr. Ramiro Díaz
Director de Tesis

Dr. Fernando Salas
Presidente del Tribunal de Tesis

Dr. Germán Romo
Biometrista

Dra. Luz María Granados
Vocal

Dr. Luís Donoso
Director del Programa de Medicina Veterinaria

Cumbayá, Abril de 2008

© Derechos de Autor
Jorge Tomás Pérez Moya
2008

DEDICATORIA

Con mucho Cariño, Admiración y Gracitud:

A mi Familia, por Ustedes y para Ustedes SIEMPRE

AGRADECIMIENTOS

A los señores ganaderos: Doña Guadalupe López, Don Jorge Arturo López y Don Diego Gómez de la Torre por apoyarme en el desarrollo del trabajo de campo y colaborarme con los animales necesarios para sacar adelante el proyecto.

Al personal de las Haciendas: Don Alonso, Don Ángel, Don Medardo, Don Miguel y Don Segundo por su apoyo en el trabajo de campo.

A mis profesores: Ramiro, Fernando y Germán, sinceramente agradecido por el apoyo y la guía que me han dado para que el desarrollo de este trabajo se realice de la mejor manera

RESUMEN

Se realizó un experimento con el propósito de determinar si la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) o factor liberador de gonadotropina (GnRH) al momento de la inseminación artificial mejora la tasa de concepción al primer servicio en vacas Holstein de tres haciendas del Cantón Mejía. Se seleccionó un total de 66 vacas sanas de entre segundo y cuarto parto a partir de 45 días post parto. Posteriormente se detectó la presencia de cuerpo lúteo (CL) mediante palpación rectal y se administró una o más dosis de PGF2 α hasta lograr la manifestación de estro. Las vacas se dividieron en tres grupos: Grupo hCG (n=22), recibieron 2500 U.I. de hCG durante la inseminación, Grupo GnRH (n=22) recibieron 0,25 mg GnRH durante la inseminación y Grupo Control (n=22) recibieron 2,5ml de solución salina durante la inseminación. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonido a partir del día 35 después de la inseminación. Las tasas de concepción para cada grupo fueron: 36,4% (hCG), 54,5% (GnRH) y 45,5% (Control), las mismas que no fueron diferentes (P= 0,48). Se concluye que el uso de hCG o GnRH al momento de la inseminación, no mejoró la tasa de concepción al primer servicio en las vacas tratadas.

ABSTRACT

An experiment was conducted to evaluate whether the administration of human chorionic gonadotropin (hCG) or gonadotropin releasing hormone (GnRH) at the time of artificial insemination (A.I.) increase the conception rate on first service Holstein cows in three farms located at Macahchi valley in Ecuador. 66 healthy cows were selected with no more than 4 parturitions and with 45 - 60 days post partum. Corpus luteum was detected by rectal palpation prior to the administration of one or more PGF2 α doses until estrus was detected. At the time of A.I., cows were divided in three groups: hCG (n=22) administrated 2500 U.I., GnRH (n=22) administrated 0,25 mg, and control (n=22) administrated 2,5ml of saline solution. All the administrations were performed intramuscularly. Pregnancy diagnosis was detected by ultrasonography starting at day 35. Conception rates were: 36,4%, 54,5% and 45,5% for hCG, GnRH and control groups, respectively. There were no significant differences ($P > 0.05$) in pregnancy rates among groups. In conclusion, neither hCG nor GnRH increased pregnancy rates during the first service on treated cows.

Key: Words: AI, CL, GnRH, hCG

Contenido

I. Introducción.....	2
II. Revisión Bibliográfica.....	2
1. Ciclo Estral.....	2
1.1 Fase Folicular.....	3
1.1.1 Proestro.....	4
1.1.2 Estro.....	4
1.2 Fase Lútea.....	5
1.2.1 Metaestro.....	5
1.2.2 Diestro.....	6
2. Ovulación.....	6
3. Descripción de las Gonadotropinas.....	8
3.1. Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).....	8
3.2. Factor Liberador de Gonadotropinas (GnRH).....	8
4. Sincronización del Estro y Ovulación.....	9
4.1. Sincronización del Estro con Prostaglandina F₂α.....	9
4.2. Sincronización de la Ovulación.....	10
4.2.1. PreSynch.....	11
4.2.2. Ovsynch.....	12
4.2.3. CO-Synch.....	13
4.2.4. Select-Synch.....	14
4.3. Uso de hCG como sustituto de GnRH.....	15
5. Fertilización.....	15
6. Reconocimiento Materno.....	17
III. Materiales y Métodos.....	17

Ejecución del Experimento.....	19
IV. Resultados y Discusión.....	20
V. Bibliografía.....	27

Gráficos

Figura 1: descripción del protocolo PreSynch antes del Ovsynch.....	12
Figura 2: Descripción del protocolo Ovsynch.....	12
Figura 3: Descripción del protocolo CoSynch y comparación con el Ovsynch	14
Figura 4: Descripción del protocolo Select-Synch.....	15
Figura 5: Descripción del protocolo utilizado en la tesis.....	18
Gráfico 1: Porcentajes de concepción de los grupos GnRH, hCG y Control.	21

Tablas

Tabla 1: Descripción de las condiciones de los animales por grupos.....	20
Tabla 2: Dietas estimadas de cada hacienda, contenido nutricional y requerimientos nutricionales de acuerdo al nivel de producción.....	25

I. Introducción:

La falla en la concepción o infertilidad, constituye el problema reproductivo más importante en los hatos lecheros (Hernández Cerón y Morales Roura, 2001). La tasa de gestación en el ganado lechero de alta producción, disminuye debido a: una pobre expresión o detección de celos, anestros, bajas tasas de concepción y elevadas mortalidades embrionarias (Thatcher *et al.*, 2002). Por otro lado, las vacas que fallan en concebir en una explotación lechera basada en pasturas son problemáticas porque deben ser suplementadas o retiradas del hato y reemplazadas por otro animal (Cordoba y Fricke, 2001).

El uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de la gonadotropina coriónica humana (hCG) al momento de la inseminación, es una alternativa para enfrentar la falla en la concepción debido a que sincronizan la ovulación con el momento de la inseminación además previenen problemas de ovulación retardada y mejoran el desarrollo del cuerpo lúteo (Hernández Cerón y Morales Roura, 1998b). Sin embargo, los resultados del uso de dichas hormonas son variables (Morales Roura *et al.*, 1998a; Santos *et al.*, 2001; Kaim *et al.*, 2003). Por lo tanto el desarrollo de este trabajo pretende conocer si el efecto de GnRH y hCG sobre la tasa de concepción en vacas de primer servicio, es mayor que la tasa de concepción al primer servicio de las vacas testigo en tres haciendas del cantón Mejía.

II. Revisión Bibliográfica

1. Ciclo estral

El ciclo estral es el espacio de tiempo que transcurre entre dos periodos de estro (Duby y Prange, 2007). En los animales de granja, la ovulación y el estro

ocurren en animales no gestantes con intervalos regulares (ciclo estral) (Mc Leod y Phillips, 1998); por otra parte, la duración del estro depende de la especie y varía ligeramente de una hembra a otra en la misma especie (Hafez *et al.*, 2000).

En lo que al ganado bovino respecta, la duración del ciclo estral tiene un rango de subsistencia de entre diecisiete y veinticuatro días con una media de veintiún días (Senger, 1997).

El ciclo estral puede ser visto como una secuencia de eventos hormonales casuales y relacionados, por tanto cada paso en la terminación de un suceso hormonal comprende el inicio del siguiente (Mc Leod y Phillips, 1998). Teniendo en cuenta la aseveración anterior, Senger (1997), esquematiza el ciclo estral en dos fases cada una con dos etapas respectivamente: fase folicular (proestro y estro) y fase lútea (metaestro y diestro).

1.1 Fase Folicular

Se inicia después de la luteólisis, por tanto hay una reducción marcada en la progesterona. Por ende, la retroalimentación negativa de la progesterona hacia el hipotálamo es removida y la GnRH es liberada en amplias magnitudes y frecuencias (Senger, 1997). Durante la fase folicular, cuatro eventos significantes se llevan a cabo: 1) liberación de gonadotropinas desde el lóbulo anterior de la pituitaria, 2) preparación folicular para la ovulación, 3) receptividad sexual y 4) ovulación (Senger, 2003).

Aunque la fase folicular comprende apenas el 20% del ciclo estral, los procesos de crecimiento folicular y degeneración (conocidos como dinámica folicular) ocurren continuamente a lo largo de todo el ciclo estral (Senger, 2003).

1.1.1 Proestro

El proestro inicia cuando la progesterona decae por resultado de la luteólisis (destrucción del cuerpo lúteo) y termina al establecerse el estro (Senger, 2003). Teniendo en cuenta valores de progesterona en suero inferiores a 1 ng/ml para animales en proestro, Bartolome *et al.* (2005), mencionan una tasa de proestro del 16.2% en vacas lecheras.

El proestro dura de dos a cinco días dependiendo de la especie y es caracterizado por una considerable transición endócrina, de un periodo de dominancia de la progesterona a un periodo de dominancia estrogénica (Senger, 2003). Los niveles de progesterona son bajos y el crecimiento del folículo ovulatorio se lleva a cabo (Duby y Prange, 2007); Es durante el proestro que los folículos son reclutados para la ovulación y el sistema reproductivo femenino se prepara para el establecimiento del estro y el empadre (Senger, 2007).

1.1.2 Estro.

El estro es la etapa más reconocible del ciclo estral, esta caracterizado por síntomas de comportamiento visibles como receptividad sexual y monta (Senger, 2003). El periodo del estro es corto, dura entre 6 y 33 horas con una media aproximada de 20 horas (Lyimo *et al.*, 2000). El estradiol es la hormona dominante durante esta etapa del ciclo estral; a esta hormona se le atribuye las alteraciones del comportamiento y los cambios fisiológicos en el tracto reproductivo (Senger, 2003).

La intensidad del comportamiento estral esta asociado al período del día en la cual inicia el celo; tal es así que los animales que entran en estro durante la mañana, desarrollan mayor actividad estral que aquellos que lo hacen en la tarde (De Silva *et al.*, 1981).

Entre las características manifestadas por el animal para demostrar receptividad sexual tenemos: locomoción incrementada, fonación, nerviosismo e intentos de montar a otros animales (Senger, 2007). Roelofs *et al.* (2005), también señalan que los animales muestran conductas olfatorias y de suspensión de barbilla sobre la espalda junto con la exhibición de signos de monta; además indican que la tasa de detección de estros es apenas del 38%, atribuyendo el 90% de este fallo al encargado de la detección y apenas el 10% restante a la vaca. Por otra parte, López *et al.* (2004), de igual manera mencionan que la tasa de detección de celos esta por debajo del 50%, aduciendo como causa de la pobre expresión de estros a una disminución en las cantidades circulantes de estrógenos lo que acorta la duración del estro en animales con producción láctea incrementada.

1.2 Fase Lútea

La fase lútea dura desde la ovulación hasta la regresión (luteólisis) del cuerpo lúteo cerca del final del ciclo estral. La hormona ovárica predominante es la progesterona (Senger, 2003).

1.2.1 Metaestro.

Los tres a cuatro días posteriores al estro constituyen el metaestro (Duby y Prange, 2007). Este es el periodo entre la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo funcional (Senger, 2003). Las células de la granulosa alrededor del folículo colapsado se vuelven sensibles a LH y forman el cuerpo lúteo (CL) o cuerpo amarillo que empieza a producir progesterona (Duby y Prange, 2007).

Durante el metaestro, la secreción de progesterona es detectable de inmediato a la ovulación. En todo caso se necesitan entre dos a cinco días después de la ovulación para que el cuerpo lúteo recién formado produzca

cantidades significantes de progesterona (Senger, 2003). Teniendo en cuenta valores de progesterona en suero inferiores a 2 ng/ml para animales en metaestro, Bartolome *et al.* (2005), mencionan una tasa de animales en metaestro del 17.9%.

1.2.2 Diestro.

Es la etapa mas larga del ciclo estral (Senger, 2003). El cuerpo lúteo es la estructura dominante durante esta etapa (Duby y Prange, 2007). El diestro perdura entre diez y catorce días en hembras poliéstricas; su duración esta directamente relacionada con la duración de tiempo en el cual el cuerpo lúteo permanece funcional (Senger, 2003). La tasa de animales en diestro según Bartolome *et al.* (2005), es 45.2%

2. Ovulación

Típicamente, el ciclo estral bovino incluye dos o tres oleadas de desarrollo folicular (Soboleva *et al.*, 2000). El primer folículo dominante es seleccionado dentro de los diez primeros días después del parto en la mayoría de el ganado lechero por lo tanto, la primera ovulación puede ser observada después de dos semanas posteriores al parto (Sakaguchi *et al.*, 2004).

Durante el proestro, el folículo destinado a ovular crece de una estructura microscópica a una estructura llena de fluido parecida a una ampolla de entre 3/4 y 1 pulgada de diámetro (Duby y Prange, 2007).

El estro está asociado con la presencia de un folículo saludable y de gran tamaño seleccionado durante el proestro; de esta manera, las concentraciones de progesterona disminuyen y el folículo dominante empieza a producir 17 β -estradiol e inicia su maduración terminal (Sirois y Fortune, 1988). Durante ese periodo, las concentraciones de progesterona declinan (< 1 ng/ml) y el estradiol producido por

el folículo desencadena el estro por la retroalimentación positiva sobre el centro hipotálamo-hipofisiario (Fortune *et al.*, 1988).

Los folículos antrales de varios tamaños se desarrollan en respuesta a los niveles tónicos de FSH y LH, esos folículos están siempre presentes (Senger, 2003). Durante cada ciclo estral, un pequeño número de folículos antrales en crecimiento son estimulados para continuar su desarrollo (McLeod y Phillips, 1998). La dinámica folicular de los folículos antrales envuelve cuatro procesos: reclutamiento, selección, dominancia y atresia (Senger, 2003):

El reclutamiento se da en la fase de desarrollo folicular en el cual un pequeño grupo de folículos antrales empieza a crecer y a producir estradiol. A consecuencia de esto, se da la liberación de FSH y LH en grandes concentraciones, promoviéndose así el desarrollo folicular y la producción de estrógeno. En tanto que algunos folículos reclutados sufren atresia. Atresia significa degeneración de los folículos antrales. Posterior al reclutamiento, un grupo de folículos en crecimiento que no han sufrido atresia son seleccionados. De esta manera, los folículos seleccionados pueden transformarse en dominantes o pueden sufrir atresia. Una vez seleccionados los folículos proceden hacia la dominancia, continúan produciendo cantidades incrementadas de estradiol e inhibina; la inhibina inhibe la liberación de FSH desde el lóbulo anterior de la hipófisis (Senger, 2003). La liberación de LH y FSH durante el estro desencadena la ruptura del folículo aproximadamente 30 horas después del inicio del estro. (Duby y Prange, 2007).

El apareamiento de una oleada folicular es precedido por el incremento periférico de las concentraciones de FSH cuyo pico es observado en promedio de uno a dos días antes de que los folículos de 4 y 5mm sean detectables por

ultrasonido; por otro lado la selección del folículo dominante esta relacionado con la disminución de las concentraciones de FSH (Rhodes *et al.*, 2001). La oleada preovulatoria de Hormona Luteinizante (LH) es críticamente importante porque establece el desencadenamiento de una serie de eventos bioquímicos que conducen a la ovulación; de esta manera, después del pico de LH, las prostaglandinas F₂α y E₂ son sintetizadas y liberadas localmente por el ovario. De esta manera, la prostaglandina F₂α causa contracción del músculo liso así contracciones intermitentes pueden incrementar la presión localmente y fuerzan al estigma a protruir de la superficie del ovario. Así también, la PGF₂α causa que los lisosomas dentro de las células de la granulosa se rompan liberando sus enzimas. Estas enzimas lisosómicas causan la destrucción del ápex del folículo. La prostaglandina E₂ ayuda en la transición del folículo a cuerpo lúteo después de la ovulación (Senger, 2003).

3. Descripción de las Gonadotropinas

3.1 Gonadotropina Coriónica Humana (hCG)

La hCG es una glicoproteína con ocho cadenas de oligosacaridos (Cole *et al.*, 2004). Es producida por los trofoblastos de las vellosidades coriónicas de la placenta durante el embarazo (Birken *et al.*, 1991; Hernández, 1994). La hormona tiene actividad fisiológica tipo LH: induce ovulación del folículo maduro; en el macho estimula las células de Leydig y puede aumentar la producción de andrógenos (Hernández, 1994).

3.1 Factor Liberador de Gonadotropinas (GnRH)

La GnRH es un decapeptido de origen hipotalámico que induce tanto la liberación de la LH como de la FSH a partir de la hipófisis (Peters, 2005).

La GnRH es secretada por neuronas cuyos cuerpos celulares están localizados en la región preóptica y el núcleo arqueado, liberan su hormona en los vasos portales hipotalámico-hipofisarios (Hernández, 1994) la base farmacológica para el uso terapéutico de la GnRH se deriva de su efecto fisiológico de estimular la liberación de LH y FSH desde el lóbulo anterior de la glándula pituitaria (Peters 2005)

4. Sincronización del Estro y la Ovulación

Recientemente, el manejo reproductivo se ha vuelto mas difícil como resultado del incremento en el tamaño de los hatos, lo cual dificulta la detección adecuada de los signos de estro y disminuye las tasas de concepción debido a inseminaciones realizadas fuera del tiempo óptimo (Yamada, 2005). Una forma de manejar la disminución de la capacidad reproductiva de los hatos lecheros es aplicar métodos para controlar la dinámica folicular y el tiempo de vida útil del cuerpo lúteo (Portaluppi *et al.*, 2005).

Las hormonas usadas para controlar farmacológicamente el ciclo estral son idénticas o análogas de las hormonas encontradas dentro del hipotálamo (GnRH), ovario (estradiol y progesterona) y útero (PGF₂α) del ganado; por lo tanto, la actividad biológica de las hormonas exógenas concatenan con la actividad biológica de las hormonas endógenas en una vaca normal (Lucy *et al.*, 2004)

4.1 Sincronización del Estro con Prostaglandina F₂α

El método de sincronización que se desarrolló al inicio (1960) bloqueaba la ovulación por la administración exógena de progestágenos. Aunque dicho método proporcionó una tasa de sincronización aceptable, las tasas de concepción no eran alentadoras (Lucy *et al.*, 2004).

El descubrimiento de la PGF2 α como una luteolisina uterina desencadenó en nuevos métodos de sincronización en los años 70; a partir de ese entonces, los progestágenos exógenos y la PGF2 α fueron combinados para optimizar las respuestas de ambos métodos (Lucy *et al.*, 2004). De esta manera, mediante la aplicación de PGF2 α se proveyó de un método de sincronización de estro por acortamiento de la fase lútea (Mc Donald *et al.*, 1998).

El manejo de la inseminación artificial es más eficiente cuando los métodos de sincronización son usados para reducir la variación entre la primera inseminación y la inseminación subsiguiente. De todos modos, el estro no es sincronizado precisamente con PGF2 α por lo que para la detección del estro se necesitará un periodo de 7 días (Pursley *et al.*, 1997).

Debido a que el cuerpo lúteo de la vaca no es sensible a la prostaglandina entre los días primero y sexto del ciclo estral (Senger, 2003), y para asegurar que todos los animales estén en una etapa de respuesta adecuada, se recomienda el uso de dos dosis de PGF2 α con una separación entre si de 10 a 13 días (Presynch. Citado por Mc Donald *et al.*, 1998).

El control efectivo del ciclo estral requiere la sincronización de las funciones lútea y folicular. Por esta razón, se han desarrollado varios protocolos de sincronización más efectivos enfocados en sincronizar las oleadas foliculares con la inyección de GnRH seguida de la aplicación de PGF2 α siete días después (Ovsynch, CO-Synch, y Select Synch. Patterson *et al.*, 2003).

4.2 Sincronización de la Ovulación

Un mejor entendimiento de la dinámica folicular en los 90 reveló que la persistencia del folículo dominante era el agente causante para una disminución en fertilidad; por lo tanto, los programas que controlan el desarrollo folicular, el

largo de la fase lútea y el tiempo de ovulación se fueron desarrollando (Lucy *et al.*, 2004).

Hay varios tratamientos empleados para sincronizar la ovulación (Presynch antes del Ovsynch, Ovsynch, CoSynch, Select-Synch), los cuales pueden ser implementados de acuerdo a las diversas practicas de manejo existentes (Pursley *et al.*, 1997; Geary *et al.*, 2001a).

4.2.1 PreSynch

Es una estrategia previa a la implementación del Ovsynch orientada a mejorar las tasas de concepción al permitir la administración de la primera dosis de GnRH del Ovsynch en un período adecuado de tiempo (Navanukraw *et al.*, 2004). La etapa optima del ciclo estral en la cual la inseminación a tiempo fijo debe ser iniciada corresponde a la fase lútea temprana (entre los días 5 y 12 del ciclo estral). Por tal razón, para enmarcar la inseminación a tiempo fijo en esta etapa de la fase lútea, es necesario presincronizar a las vacas antes de la primera dosis de GnRH del Ovsynch (Moreira *et al.*, 2001).

En la estrategia de presincronización, las vacas reciben 2 inyecciones de PGF2 α con un periodo de 14 días entre ambas iniciado 26 días antes del Ovsynch (Figura 1) (Navanukraw *et al.*, 2004). En vista que constituye un método que no amerita mayor inversión económica e incrementa la tasa de gestación por inseminación artificial comparado con el Ovsynch; constituye una alternativa para optimizar respuesta reproductiva en los animales (Moreira *et al.*, 2001).

PreSynch antes del Ovsynch

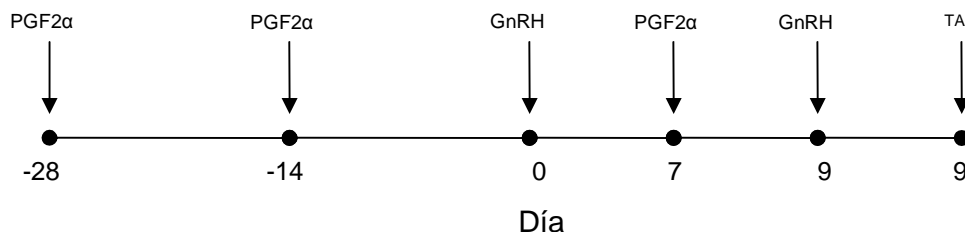


Figura 1: Descripción del protocolo PreSynch antes del Ovsynch. Kasimanickam et al., 2005

4.2.2 Ovsynch

Este método para la sincronización de la ovulación en el Ganado lechero, se basa en la iniciación de una nueva oleada folicular con GnRH antes de inducir luteólisis con prostaglandina F2α. De tal manera que el folículo dominante emergente sea obligado a ovular por un segundo tratamiento con GnRH permitiendo así controlar el tiempo para la inseminación artificial. (Pursley et al., 1995). La aplicación del protocolo de Ovsynch permite la sincronización del desarrollo folicular, regresión lútea y tiempo de ovulación con un mínimo de detección de celo (Figura 2) (Pursley et al., 1997).

Protocolo Ovsynch

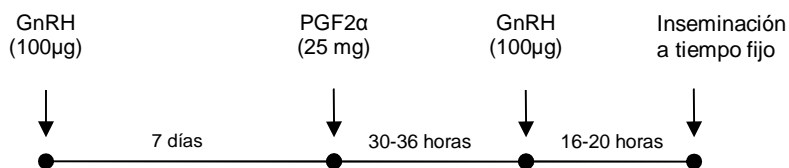


Figura 2: Descripción del protocolo Ovsynch. Pursley et al., 1997

Las tasas de gestación logradas a partir del Ovsynch/TAI (inseminación a tiempo fijo) no se ven mayormente alteradas en comparación con los mismos parámetros obtenidos con protocolos de inseminación previa detección de celo (protocolo de inseminación AM-PM) (Lemaster et al., 2001). El programa de

inseminación a tiempo fijo (TAI) propuesto por el Ovsynch reduce los días abiertos e incrementa las tasas de gestación al permitir el control de la primera inseminación y las subsiguientes (Peters y Pursley, 2003). Además se reconoce un mejor efecto de Ovsynch sobre la fertilidad en vacas primíparas principalmente porque estas presentan menor cantidad de problemas reproductivos (Tenhagen *et al.*, 2004).

Las mayores ventajas del Ovsynch son: 1) Se puede incrementar las tasas de detección de celos al 100%, 2) las tasas de concepción logradas son aceptables, 3) las tasas de preñez pueden ser incrementadas (Yamada, 2005). En cuanto a sus inconvenientes: el protocolo de Ovsynch requiere manejar las vacas tres veces durante las inyecciones y una cuarta vez para la inseminación en masa de animales (Geary *et al.*, 2001a; Jordan *et al.*, 2002). Por esta razón se han desarrollado variantes del protocolo de ovsynch en las cuales se realiza la inseminación a tiempo fijo al mismo tiempo que la segunda inyección de GnRH (CO-synch) debido a que esta estrategia elimina un periodo de manejo de los animales y facilita la conducción del ganado (Sterry *et al.*, 2007).

4.2.3 CO-Synch

Es una variación del protocolo de Ovsynch en el cual se realiza TAI al mismo tiempo que se administra la segunda dosis de GnRH (Figura 3). Por tal motivo, se reduce el manejo de los animales por una ocasión; aunque las tasas de concepción son menores que en Ovsynch (Geary *et al.*, 2001a).

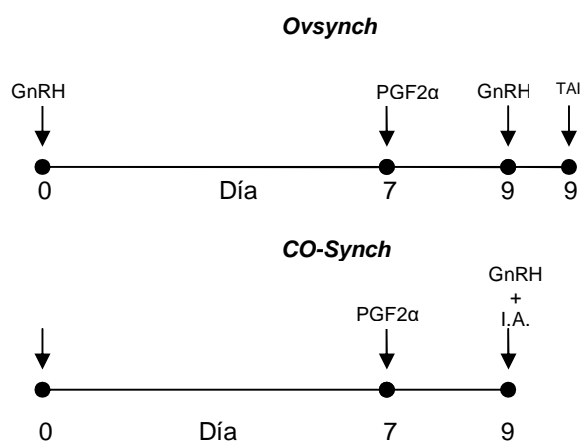


Figura 3: Descripción del protocolo CO-Synch y comparación con el Ovsynch. Geary *et al.*, 2001b

En otro estudio las diferencias entre Ovsynch y Co-Synch fueron mínimas por lo que puede ser recomendado en ocasiones en que se requiere una mayor flexibilidad en el manejo del ganado (Sterry *et al.*, 2007).

4.2.4 Select-Synch

Es un protocolo de mejoramiento de la sincronización de estro asociado con la maduración folicular coordinada y regresión lútea a partir de la administración de GnRH de 6 a 7 días antes de la PGF2α (Figura 4), el cual ha sido demostrado en vacas lecheras y vaconas (Stevenson *et al.*, 2000). Rabiee *et al.* (2005), tras aplicar un meta análisis para comprobar diferencias entre diversos tratamientos inductorios de ovulación y estro concluyen que: los programas de Select-Synch pueden producir una tasa de concepción similar a la tasa de concepción lograda con Ovsynch. Aunque dichos programas van a depender de la detección del estro lo cual podría ser una desventaja práctica en comparación al Ovsynch.

Select-Synch

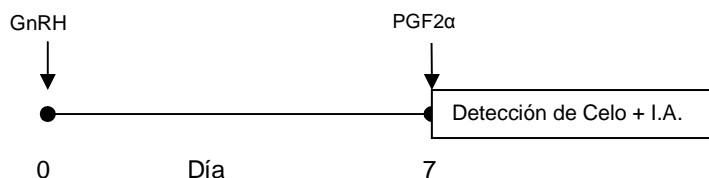


Figura 4: Descripción del protocolo Select-Synch. Larson *et al.*, 2006

En otro estudio, el protocolo de Select-Synch, produjo resultados de detección de estro, concepción y preñez similares a los obtenidos tras administrar acetato de melengestrol o emplear el Presynch. Por otro lado, una de las limitaciones del Select-Synch es la temprana expresión de celos antes de la $PGF2\alpha$ en $< 10\%$ de las hembras tratadas lo que puede ser contrareestado con la adición de un implante de progesterona y su remoción antes de la administración de $PGF2\alpha$ (Richardson *et al.*, 2002).

4.3 Uso de hCG como sustituto de GnRH

Los estudios en los que se ha inyectado GnRH o hCG al momento de la inseminación son variables; aunque los resultados globales indican que sí se mejora la fertilidad (Hernández Cerón y Morales Roura, 2001). En vacas cíclicas, algunos trabajos han mostrado un incremento en tasas de concepción cuando se ha usado hCG los días 5-7 post inseminación. También se ha demostrado que la hCG eleva la concentración de progesterona a niveles mas altos la GnRH (Hanlon *et al.*, 2005).

Schmitt *et al.* (1996a), condujo una investigación en la cual se comparó el Ovsynch tradicional con una variante en la que se sustituyó la segunda dosis de GnRH por una dosis de hCG. Mencionan que: al reemplazar la segunda dosis de

GnRH con hCG, se eliminó la ocurrencia de ciclos estrales cortos. Por tal razón, sugiere la implementación de este tratamiento en situaciones en las que la detección del estro no es posible o es de difícil manifestación (vacas post parto con comportamiento estral reducido bajo condiciones de estrés calórico).

Morales Roura *et al.* (1998), menciona que el uso de hCG al momento de la inseminación en vacas repetidoras produce tasas de concepción similares a las del grupo testigo.

5. Fertilización

Después de la inseminación, los espermatozoides deben atravesar el cérvix, entrar y cruzar el útero hasta alcanzar el oviducto. Además, deben capacitarse antes de que puedan fertilizar el oocito. De tal manera que el espermatozoide al encontrar el oocito experimente la reacción acrosomal y la fertilización se lleve a cabo (Senger, 2003).

El proceso de fertilización empieza con la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida una vez que la reacción acrosomal se ha completado. A continuación, el espermatozoide atraviesa el espacio peri-vitelino y se ancla a la superficie del huevo. A consecuencia de esto, se desencadena una serie de eventos: se inhibe el movimiento del espermatozoide que fertilizó y se induce cambios en la polaridad de la superficie del huevo impidiéndose así la fertilización de más de un espermatozoide. Además, por efecto de la fusión entre el huevo y el espermatozoide, se dan varios cambios en sus membranas provocando así la entrada de la cabeza del espermatozoide en el citoplasma del huevo de tal manera que se fusionan los núcleos de cada gameto ocasionando posteriormente el emparejamiento de sus respectivos cromosomas (McLeod y Phillips, 1998).

6. Reconocimiento Materno

El establecimiento y mantenimiento de la gestación son procesos complejos que requieren comunicación precisa y sincronía entre el conceptus y la madre (Funston *et al.*, 2005).

El establecimiento de la gestación envuelve la interacción entre dos sistemas interdependientes definidos como el conceptus (embrión y membranas extraembrionarias) y el útero. De tal manera que existe una necesidad de sincronía entre el ambiente uterino y las señales del conceptus para que se de el reconocimiento materno (Thatcher *et al.*, 1984).

Después de la syngamia (fusión de los pronúcleos masculino femenino), el cigoto se transforma en embrión. Entendiendo como embrión a un organismo en etapas tempranas de desarrollo. A continuación, cuando distintas cavidades son reconocibles, el embrión es llamado blastocisto. Este blastocisto, produce proteínas específicas que proveen los signos para la prevención de la luteólisis (Senger, 2003).

La señal para el reconocimiento materno es emitida por el interferón tau $IFN\tau$. De esta manera, se regula la expresión de proteínas en el endometrio (Hicks *et al.*, 2003). Así esta interacción suprime los pulsos luteolíticos de la $PGF2\alpha$, resultando en el mantenimiento de la función del cuerpo lúteo (Gifford *et al.*, 2007)

III. Materiales y Métodos

Se seleccionó un total de 66 vacas Holstein de línea genética americana entre segundo y cuarto parto de primera inseminación repartidas en tres grupos con igual número de animales en cada una de las haciendas. La condición corporal de los animales estimada al iniciar el experimento fue 3,1.

Antes de aplicar los tratamientos, los animales recibieron una evaluación sanitaria general para descartar cualquier enfermedad. Posteriormente se detectó la presencia de cuerpo lúteo (CL) por palpación rectal. Ante la presencia de CL, se administró una dosis de PGF2 α (Estrumate® Shering Plough) y se inseminó a celo observado. En caso de no manifestar celo siete días posteriores a la aplicación de la prostaglandina (Pursley *et al.*, 1997), se repitió el proceso anterior, previa confirmación de la presencia de CL y hasta lograr manifestación de celo. La detección de celo estuvo a cargo del personal de granja y se evaluó que la condición del celo sea la adecuada para la inseminación.

Al momento de la inseminación se evaluó la condición corporal de los animales y se administró los tratamientos del experimento de acuerdo a sus grupos correspondientes (Figura 5):

- Grupo A: 2,5 ml GnRH (0,25 mg Gonadorelin) Fertagyl® (Intervet, Holanda)
- Grupo B: 2,5 ml hCG (2500 U.I. hCG): Chorulon® (Intervet, Holanda)
- Grupo C: 2,5 ml Solución salina estéril 0,9%

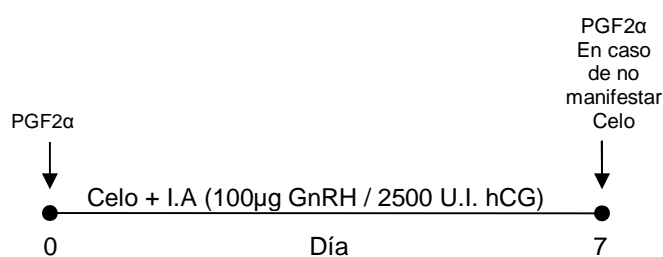


Figura 5: Descripción del protocolo utilizado en la tesis

Las hormonas fueron dosificadas e inyectadas por vía intramuscular en los glúteos utilizando jeringuillas descartables. Se utilizó una jeringuilla y aguja para cada animal.

Otros materiales:

- Ultrasonido (Pie-Medical®, Holanda) modelo *Tringa* equipado con transductor 5,5 Mhertz
- Lápiz para marcar ganado (Marc plus ®, U.S.A)
- Caja de Jeringas 3ml (Nipro ®, Japón)
- Agujas 16Gx1,5 (Nipro ®, Japón)
- 2 Cajas de guantes ginecológicos x 100 unidades (Vetfarm, Ecuador)
- 1lt de lubricante (Ambreed, Nueva Zelanda)

Posterior a la inseminación de las vacas y aplicación de los tratamientos, se realizó el diagnóstico de gestación por medio de ultrasonido a partir de los 35 días post inseminación.

Una vez concluida la toma de datos de gestación, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de Ji cuadrado, utilizando en paquete estadístico Minitab 15® (Minitab Inc. U.S.A.)

Ejecución del experimento:

El experimento se realizó durante los meses de Julio y Diciembre del año 2007. Se dispuso de tres haciendas localizadas en el cantón Mejía (La Calera, San José, La Victoria) a una altitud aproximada de entre 2700 y 2800 msnm. En las tres haciendas se tiene un sistema de producción similar basado en pastoreo rotacional y suplementación de alimento balanceado de acuerdo al nivel de producción de los animales. Los potreros son mixtos principalmente a base de las siguientes especies forrajeras: Trébol (*Trifolium repens*), Ray-grass (*Lolium perenne*), Pasto azul (*Poa pratensis*) y Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*).

Durante el periodo de ejecución del experimento, el clima fue el siguiente:

- Precipitaciones Julio-Noviembre: 630,6-326 mm (INAMHI 2007)

- Luminosidad Julio-Noviembre: 205,9-162,4 horas luz (INAMHI 2007)
- Temperatura Julio-Noviembre: Máxima 21,6°C-20,2°C; Mínima 3,2°-1,0°C (INAMHI 2007)

La topografía de los potreros es plana (San Jose, La Calera) y ligeramente en declive (La Victoria) con adecuada oferta forrajera.

En cuanto al manejo, las tres haciendas realizan dos ordeños diarios: en la mañana entre 04:45-06:15 y en la tarde entre 15:30-18:30

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio se llevó a cabo durante la época lluviosa (Julio-Diciembre. INAMHI 2007), lo que dificultó el trabajo de detección de celo al personal de las haciendas. Además, el exceso de humedad en los potreros (>87%) limitó en el consumo de materia seca a los animales (Romo, 2004). Pese a las condiciones climáticas, los animales mantuvieron los estándares de producción de las haciendas y su condición corporal debido a la suplementación con sobrealimento (Tabla 2).

Tabla 1: Descripción de las condiciones de los animales por grupos

	Tabla descriptiva de los animales					
	Tratamientos					
	GnRH		hCG		Control	
	X	SE	X	SE	X	SE
Edad (parto), años	2,7 ¹	0,18	2,8 ¹	0,18	2,68 ¹	0,16
Producción Lechera, lt/d	24 ²	1,40	26 ²	1,42	26 ²	1,44
Tasa de detección de celos, (%)	77	0,097	82	0,074	82	0,074
Condición Corporal, escala 1 a 5	3,1	0,034	3,1	0,038	3,1	0,019
Días abiertos animales gestantes	71	17	72	24	67	26

¹ Promedio en relación al número de partos

² Producción lechera estimada a 100 días

Las tasas de concepción por haciendas fueron: La Calera (42%), San José (67%), La Victoria (33%); las diferencias entre haciendas probablemente se deban a la eficiencia en la detección de celos (Tabla 1). La técnica de inseminación

empleada por cada personal a cargo y el manejo nutricional propio de cada hacienda.

El estudio comparó las tasas de concepción al primer servicio en vacas lecheras tras la administración de hCG o GnRH al momento de la inseminación. El número total de animales gestantes por grupos fue: 12 (GnRH n=22), 8 (hCG n=22), 10 (Control n=22). Tras el análisis con Ji cuadrado, este estudio indica que el uso de GnRH o hCG al momento de la inseminación en vacas de primer servicio en tres haciendas del cantón Mejía no mejora la tasa de concepción (Grafico 1).

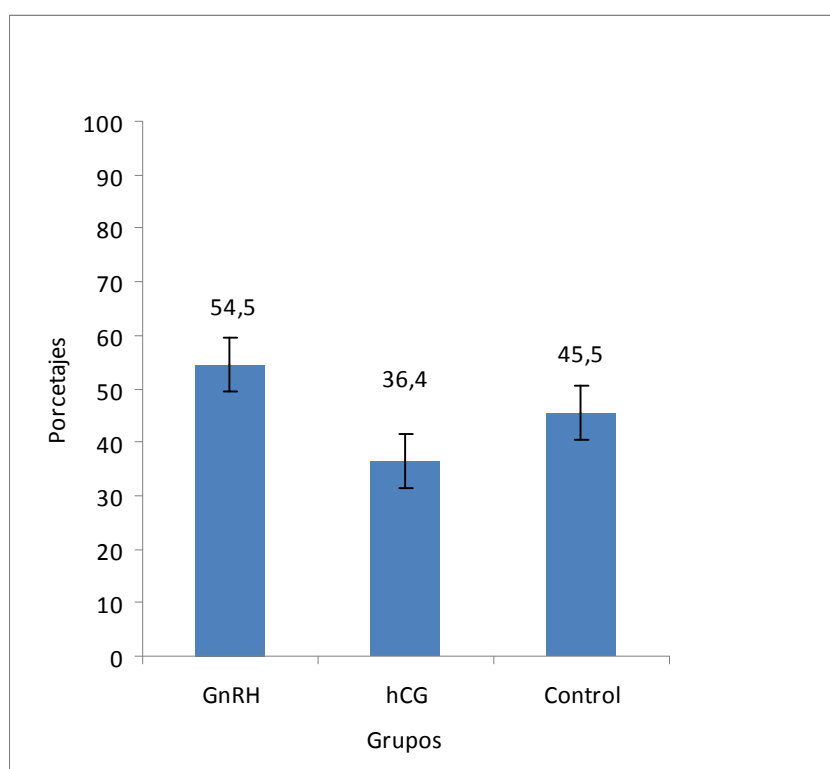


Grafico 1: Porcentajes de concepción de los grupos GnRH, hCG y Control. Las diferencias entre los grupos no son significativas ($P=0,48$)

Vasconcelos *et al.*, (1999) señalan que los protocolos de inseminación a tiempo fijo en donde se utiliza la GnRH, si mejoran las tasas de concepción con respecto a las practicas de inseminación artificial tradicionales (32% vs. 42% para control y Ovsynch respectivamente). Estos datos no coinciden con los resultados

de la presente investigación, posiblemente debido a que en el presente trabajo, se inseminó a los animales a celo observado.

Lewis *et al.* (1990), encontraron que la GnRH y la hCG no presentan un efecto positivo sobre tasa de concepción al primer servicio (50,0%; 44,3%; 47,2% para hCG, GnRH y Control respectivamente). A su vez, los mismos autores no reportan efecto sobre la tasa de concepción en el segundo (hCG 46,0%; GnRH 45,0%; Control 41,1%) y el tercer servicio (46,2%; 43,4% para hCG y GnRH respectivamente vs. 44,8% Control). Aunque mencionan una elevación de los niveles de progesterona en sangre tras el uso de hCG (25ng/dl vs. 15ng/dl para hCG y control respectivamente desde el día 15 después de la inseminación). Por otro lado, Kasimanickam *et al.* (2005), compararon la aplicación de GnRH al momento de la inseminación a tiempo fijo con la inseminación a celo detectado en animales de primer servicio y no encontraron diferencias significativas (23,9% vs. 31,0%). Estos resultados son similares a los encontrados en la presente investigación.

El efecto de la GnRH y la hCG sobre la fertilidad aún no está completamente claro (Schmitt *et al.*, 1996a; Morales-Roura, 1998b). La actividad de estas hormonas puede estar relacionada a un efecto indirecto dependientes de las características del hato y variedad de la etiología de los problemas de infertilidad, por lo que su acción en la vida media del folículo y su estimulación en la función lútea no son suficientes para mejorar la fertilidad (Swanson *et al.*, 1990). Por otro lado, Kasimanickam *et al.* (2005), atribuyen la falla en incrementar la tasa de concepción tras el uso de GnRH a un elevado número de vacas presentan una fase lútea corta, lo que puede estar asociado a una fertilidad reducida (Inskeep, 1995).

En la presente investigación, no hay diferencia entre las tasas de concepción logradas tras el uso de GnRH vs. hCG (36,4% 54,5% para hCG y GnRH respectivamente. $P=0,22$). Resultados semejantes fueron encontrados por Schmitt *et al.*, (1996a), en un estudio en el que compararon el efecto de hCG vs GnRH administradas al momento de la inseminación en vacas de primer servicio. No hubo diferencia en la tasa de concepción de ambos tratamientos (73,9% vs. 63,4% para hCG y GnRH respectivamente), aunque mencionan que el CL inducido por acción de la hCG tiene una mayor capacidad secretora de progesterona que el CL inducido por GnRH. Esto se debe a que la hCG persiste en el plasma del ganado por un periodo de tiempo mayor (hCG hasta 66 horas en vacas Schmitt *et al.*, 1996b vs. 5 horas de GnRH Chenault *et al.*, 1990) lo que puede incrementar la maduración del folículo ovulatorio y por ende resultará en un CL de mayor competencia. En otro estudio, Morales-Roura *et al.* (1998b), señalan que el uso de hCG al momento de la inseminación no tiene efecto sobre la tasa de concepción (40,8 vs. 34,2 para tratamiento y control respectivamente), sin que exista variación en los niveles plasmáticos de progesterona. Posiblemente las diferentes dosis usadas por cada uno de los autores (3000 U.I hCG Schmitt *et al.*, 1996 vs. 2500 U.I Morales-Roura *et al.*, 1998) sea la causa de la diferencia en los perfiles de progesterona.

A seis animales que formaron parte de esta investigación no se les detectó celo a tiempo, por lo que a la palpación de CL, se repitió la dosis de PGF2 α hasta la detección de celo e Inseminación. Hay que tomar en cuenta que una falla en la detección de celos, incrementa la probabilidad de vacas que se presentan al inseminador en un estado no propicio para la inseminación (Zarco, 1990); esto afecta la tasa de concepción (Zarco, 2003). No debemos descartar

que la técnica de I.A., incida sobre la tasa de concepción. King y Macpherson (1965) demuestran que inseminadores con alta experiencia sin reentrenamientos periódicos, pueden llegar a depositar el semen en un lugar distinto al cuerpo del útero hasta en un 76% de las inseminaciones. Los mismos autores recomiendan el reentrenamiento de los técnicos ya que demostraron que se puede llegar a mejorar los índices de concepción hasta en un 8%.

En cuanto al aspecto nutricional, la Tabla1 indica valores de energía por debajo de los requeridos por los animales de acuerdo a sus niveles de producción, este desbalance, incide negativamente sobre el tiempo que transcurre entre el parto y la primera ovulación (Butler, 2000). La respuesta del ovario a la estimulación de LH se reduce así como también disminuyen los niveles de insulina y el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-I), lo cual provoca una baja estimulación a las células foliculares deprimiendo así el desarrollo folicular (Beam y Butler, 1999). Probablemente esta sea una de las razones que hayan ocasionado una baja respuesta de los tratamientos sobre la tasa de concepción.

Por otro lado los niveles de proteína disponibles para los animales son superiores a los requeridos por los mismos (Tabla 1). Chagas *et al.* (2007), mencionan que el exceso de proteína en las dietas si bien es importante para mantener elevados los niveles de producción, también provocan la alteración de la calidad del oocito y la consecuente baja en las tasas de concepción. Además, Butler (1998), indica que la urea producto del catabolismo de las proteínas, altera el ambiente uterino desencadenando fallas en la concepción.

Tabla 2: Dietas estimadas de cada Hacienda, Contenido Nutricional y Requerimientos Nutricionales de acuerdo al nivel de producción

Dieta	Consumo estimado, Kg MS/ día		
	Hcda. La Calera	Hcda. San José	Hcda. La Victoria
Forraje/Pasturas ^a	8,21 ^c	8,55 ^d	6,78 ^e
Balanceado	6 ^f	5 ^g	6 ^h
Sal Mineral	0,25	0,25	0,2
Contenido Nutricional			
Proteína cruda (gramos)			
• Consumo	2,031	1,940	1,962
• Requisito ^b	1,862	1,862	1,862
• Diferencia	170	800	100
ENlact (Mcal/kg)			
• Consumo	20,8	18,3	19,5
• Requisito ^b	32,2	28,2	30,5
• Diferencia	- 11,44	- 9,85	11,04
Ca (gramos)			
• Consumo	0,16	0,12	0,07
• Requisito ^b	0,646	0,646	0,646
• Diferencia	- 0,49	- 0,53	- 0,58
P (gramos)			
• Consumo	0,14	0,19	0,05
• Requisito ^b	0,42	0,42	0,42
• Diferencia	- 0,28	- 0,22	- 0,37
Litros de leche ⁱ			
	27	22	25

^a Consumo estimado en base a la disponibilidad de pasto por metro cuadrado por animal: San José (8,55 kg MS:51,5 m²/vaca), La Calera (8,21 kg MS:54,7 m²/vaca), La Victoria (6,78 kg MS:37,04 m²/vaca)

^b Requerimiento nutricional de acuerdo al NRC 2001 para ganado de leche cuya producción sea 25 kg con 3% de grasa en leche

^c Mezcla forrajera: Ray-grass (36,25%), Trébol (19,38%), Kikuyo (35%), Pasto azul (9,37%)

^d Mezcla forrajera: Ray-grass(43,8%), Alfalfa (21,87%), Kikuyo (20%), Festuca (9,33%), Trébol (5%)

^e Mezcla forrajera: Kikuyo (70%), Ray-grass (25%), Alfalfa (5%)

^f Balanceado: Maíz (28,63%), Palmiste (24,05%), Afrecho (22,9%), Balanceado comercial (20,35%), Sal Mineral (4,07%)

^g Balanceado: Maíz (34,2%), Palmiste (24,4%), Afrecho (19,5%), Melasa (14,6%), Soya (4,8%), Sal Mineral (2,5%)

^h Balanceado comercial: PB (16%), ENlact (2,9 Mcal/kg)

ⁱ Producción lechera estimada de los animales que participaron en el experimento.

En resumen, el uso de GnRH o hCG al momento de la inseminación, no incrementó la tasa de concepción al primer servicio en vacas Holstein con

desbalance energético negativo y exceso de proteína en dieta de tres haciendas del cantón Mejía cuya detección de celos no fue apropiada.

Se recomienda realizar este protocolo midiendo niveles de progesterona en sangre, para evaluar el efecto de estas hormonas sobre la función del ovario. Igualmente, calcular las tasas de detección de celos para así descartar a este factor como incidente en la fertilidad de los hatos; también, estimar las condiciones de manejo a las que serán expuestos los animales antes, y durante el estudio con el fin de identificar variables tales como: dietas, técnica de inseminación que posiblemente influirán sobre los resultados del trabajo.

Una vez identificadas las variables que pudieran tener inferencia sobre los resultados, previo al estudio se recomienda capacitar al personal que colaborará con el trabajo de campo sobre técnicas y estrategias de manejo orientadas a controlar las variables.

V. Bibliografía:

- 1) Bartolome JA, Sozzi A, Mc Hale J, Melendez P, Arteche ACM, Silvestre FT, Kelbert D, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology*. 2005; 63:1628-1642
- 2) Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999; 54: 411-424
- 3) Birken S, Gawinowicz MA, Kardana A, LA Cole. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). II. Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards. *Endocrinology*. 1991; 129: 1551-1558
- 4) Butler WR. Review: Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle. *J Dairy Sci*. 1998; 81: 2533-2539
- 5) Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 2000; 60–61:449–457
- 6) Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between-Method Variation in Human Chorionic Gonadotropin Test Results. *Clinical Chemistry*. 2004; 50: 874-882
- 7) Cordoba MC, Fricke PM, Evaluation of Two Hormonal Protocols for Synchronization of Ovulation and Timed Artificial Insemination in Dairy Cows Managed in Grazing-Based Dairies. *J. Dairy Sci*. 2001; 84: 2700-2708
- 8) Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR. Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW. Webb R. Invited Review: New Perspectives on the Roles of Nutrition and Metabolic Priorities in the Subfertility of High-Producing Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 2007; 90: 4022-4032
- 9) Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, M. C Goodwin. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate gonadorelin and buserelin. *Theriogenology*. 1990; 34:81
- 10) De Silva AWMV, Anderson GW, Gwazdauskas FC, McGilliard ML, Lineweaver JA. Interrelationships with oestrus behaviour and conception in cattle. *J. Dairy Sci*. 1981;64, 2409-2418
- 11) Duby RT, Prange RW. Physiology and Endocrinology of the Estrus Cycle. University of Massachusetts. Citado en Dairy Integrated Reproductive Management (serial on line). 28/11/2007. Available from: <http://www.wvu.edu/~exten/infores/pubs/livepoul/dirm2.pdf>

- 12) Fortune JE, Sirois J, Quirk SM. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 1988; 29:95-109
- 13) Funston RN, Lipsey RJ, Geary TW, Roberts AJ. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentration of progesterone and conception rates in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 2005; 83:1403–1405
- 14) Geary TW, Salverson RR, Whittier JC. Synchronization of Ovulation using GnRH or hCG with the CoSynch protocol in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 2001a; 79:2536–2541
- 15) Geary TW, Whittier JC, Hallford DM, MacNeil MD. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *J. Anim. Sci.* 2001b; 79:1–4
- 16) Gifford CA, Racicot K, Clark DS, Austin KJ, Hansen TR, Lucy MC, Davies CJ, Ott TL. Regulation of Interferon-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 274–280
- 17) Hafez ESE, Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Mc Graw Hill. Séptima Edición. México DF. México. 2000
- 18) Hanlon DW, Jarratt GM, Davidson PJ, Millar AJ, Douglas VL. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 2005; 63: 1938–1945
- 19) Hernández Cerón J, Morales Roura JS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Méx.* 2001; 32: 279-287
- 20) Hernández MV. *ENDOCRINOLOGÍA FISIOLÓGICA GENERAL*. Editorial Universitaria. Primera Edición. Quito. Ecuador. 1994
- 21) Hicks BA, Etter SJ, Carnahan KG, Joyce MM, Assiri AA, Carling SJ, Kodali K, Johnson GA, Hansen TR, Mirando MA, Woods GL, Vanderwall DK, Ott TL. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. *J. Anim. Sci.* 2003; 81: 1552–1561
- 22) Inskeep EK. Factors that affect fertility during oestrous cycles with short and normal luteal phases in postpartum cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1995; 49: 493-593.
- 23) Jordan ER, Schouten MJ, Quast JW, Belschner AP, Tomaszewski MA. Comparison of Two Timed Artificial Insemination (TAI) Protocols for Management of First Insemination Postpartum. *J. Dairy Sci.* 2002; 85:1002–1008
- 24) Kaim M, Bloch A, Wolfenson D, Braw-Tal R, Rosenbrg M, Voet H, Folman Y. Effects of GnRH Administered to Cows at the Onset of Estrus on Timing of

- Ovulation, Endocrine Responses, and Conception. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 2012-2021
- 25) Kasimanickam R, Cornwell JM, Nebel RL. Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 2005; 63: 2550–2559
 - 26) King GJ, Macpherson JW. Observations on retraining of artificial insemination technicians and its importance in maintaining efficiency. *Can. Vet. Jour.* 1965; 6: 83-85
 - 27) Lemaster JW, Yelich JV, Kempfer JR, Fullenwider JK, Barnett CL, Fanning MD, Selph JF. Effectiveness of GnRH plus prostaglandin F₂ α for estrus synchronization in cattle of *Bos indicus* breeding. *J. Anim. Sci.* 2001; 79:309–316
 - 28) Lewis GS, Caldwell DW, Rexroad CE, Dowlen HH, Owen JR. Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone and Human Chorionic Gonadotropin on Pregnancy Rate in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 1990; 73: 56-72
 - 29) López H, Satter LD, Wiltbank MC, Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 2004; 81: 209-223
 - 30) Lucy MC, McDougall S, Nation DP. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 495-512
 - 31) Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruij TAM, van Eerdenurg FJCM. Relationship among Estradiol, Cortisol and Intensity of Estrus Behavior in Dairy Cattle. *Theriogenology.* 2000; 53: 1783-1795
 - 32) McDonald MF, Barrel GK, Xu ZZ. Modifying Reproductive Processes. Citado en: Fielden E.D, Smith J.F. *Reproductive Management of Grazing Ruminants in New Zealand.* The New Zealand Society of Animal Production. Occasional Publication N°12, Hamilton-New Zealand. 1998
 - 33) McLeod BJ, Phillips DJ. Hormonal control of de Reproductive Processes. Citado en: Fielden ED, Smith JF. *Reproductive Management of Grazing Ruminants in New Zealand.* The New Zealand Society of Animal Production. Occasional Publication N°12, Hamilton-New Zealand. 1998
 - 34) Minitab Inc. MINITAB15 (30 day-trial). USA. 2008.
 - 35) Morales RJS, Santiago G, Hernández CJ. Efectividad del Uso de GnRH, hCG y la reinseminación como tratamientos de vaca repetidora en la cuenca lechera de Tizayuca. *Memorias del XII Congreso Nacional de Buiatría;* 1998 Julio 20-25; Acapulco (Gro) México. México (DF); Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. A.C., 1998a: 323-325

- 36) Morales RJS, Hernández CJ, Vázquez GJA. Efecto del Tratamiento con hCG al momento de la Inseminación Artificial sobre la función del cuerpo lúteo y fertilidad de vacas Holstein repetidoras. *Vet Méx.* 1998b; 29: 269-272
- 37) Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 2001; 84: 1646–1659
- 38) Navanukraw C, Redmer DA, Reynolds LP, Kirsch JD, Grazul-Bilska AT, Fricke PM. A Modified Presynchronization Protocol Improves Fertility to Timed Artificial Insemination in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 2004; 87: 1551–1557
- 39) National Research Council (NRC). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 7th edition. National Academy Press, Washington D.C. 2001
- 40) Patterson DJ, Kojima FN, Smith MF. A review of methods to synchronize estrus in replacement beef heifers and postpartum cows. *J. Anim. Sci.* 2003; 81(E. Suppl. 2):E166–E177
- 41) Peters AR. Veterinary clinical application of GnRH—questions of efficacy. *Anim Reprod Sci.* 2005; 88: 155–167
- 42) Peters MW, Pursley JR. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology.* 2003; 60: 1197–1204
- 43) Portaluppi MA, Stevenson JS. Pregnancy Rates in Lactating Dairy Cows after Presynchronization of Estrus cycles and Variations of the Ovsynch Protocol. *J. Dairy Sci.* 2005; 88: 914–921
- 44) Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology.* 1995; 44: 915-923
- 45) Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. Pregnancy Rates Per Artificial Insemination for Cows and Heifers Inseminated at a Synchronized Ovulation or Synchronized Estrus. *J Dairy Sci.* 1997; 80:295–300
- 46) Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA. Efficacy of Ovsynch Program on Reproductive Performance in Dairy Cattle: A Meta-Analysis. *J. Dairy Sci.* 2005; 88: 2754–2770
- 47) Richardson AM, Hensley BA, Marple TJ, Johnson SK, Stevenson JS. Characteristics of estrus before and after first insemination and fertility of heifers after synchronized estrus using GnRH, PGF2 α , and progesterone. *J. Anim. Sci.* 2002; 80:2792–2800
- 48) Rhodes FM, Peterson AJ, Jolly PD. Gonadotrophin responsiveness, aromatase activity and insulin-like growth factor binding protein content of

- bovine follicles during the first follicular wave. *Society for Reproduction and Fertility*. 2001; 122: 561–569
- 49) Roelofs JB, van Eerdenburg FJCM, Soede NM, Kemp B. Various behavioral signs of estrus and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*. 2005; 63:1366-1377
- 50) Romo, G. Efectos de la calidad del forraje en la producción de la vaca y niveles de suplementación. *II Seminario Nacional: La Producción de Ganado Bovino Lechero en el Ecuador, Cuenca*. 2004.
- 51) Sakaguchi M, Sasamoto Y, Suzuki T, Takahashi Y, Yamada Y. Postpartum Ovarian Follicular Dynamics and Estrus Activity in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci*. 2004; 87: 2114–2121
- 52) Santos JEP, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci*. 2001; 79: 2881-2894
- 53) Schmitt ÉJ-P, Diaz T, Drost M, Thatcher WW. Use of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist or Human Chorionic Gonadotropin for Timed Insemination in Cattle. *J. Anim. Sci*. 1996a; 74: 1084–1091
- 54) Schmitt ÉJ-P, Diaz T, Barros CM, De la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R, Thatcher WW. Differential Response of the Luteal Phase and Fertility in Cattle Following Ovulation of the First-Wave Follicle with Human Chorionic Gonadotropin or an Agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone. *J. Anim. Sci*. 1996b; 74:1074–1083
- 55) Senger PL. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions Inc. First Revised Edition 1997. Washington U.S.A.
- 56) Senger PL. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions Inc. Second Revised Edition 2003. Washington U.S.A.
- 57) Sirois, J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod*. 1988; 39:308-317
- 58) Soboleva TK, Peterson AJ, Pleasant AB, McNatty KP, Rhodes FM. A model of follicular development and ovulation in sheep and cattle. *Anim Reprod Sci*. 2000; 58:45–57
- 59) Sterry RA, Jardon PW, Fricke PM. Effect of timing of Cosynch on fertility of lactating Holstein cows after first postpartum and Resynch timed-AI services. *Theriogenology*. 2007; 67: 1211–1216
- 60) Stevenson JS, Smith JF, Hawkins DE. Reproductive Outcomes for Dairy Heifers Treated with Combinations of Prostaglandin F₂ α , Norgestomet, and Gonadotropin-Releasing Hormone. *J. Dairy Sci*. 2000; 83:2008–2015

- 61) Swanson LV, Young AJ. Failure of Gonadotropin releasing hormone or human chorionic gonadotropin to enhance the fertility of repeat breeder cows when administered at the time of insemination. *Theriogenology*. 1990; 34:955-965
- 62) Tenhagen B, Surholt R, Wittke M, Vogel C, Drillich M, Heuwieser W. Use of Ovsynch in dairy herds—differences between primiparous and multiparous cows. *Anim Reprod Sci*. 2004; 81: 1–11
- 63) Thatcher W.W, Bartol F. F, Knickerbocker J. J, Curl J. S, Wolfenson D. Maternal Recognition of Pregnancy in Cattle. *J Dairy Sci*. 1984; 67: 2797-2811
- 64) Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolomé JA, Santos JEP. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology*. 2002; 23: 243-254
- 65) Yamada K. Development of Ovulation Synchronization and Fixed Time Artificial Insemination in Dairy Cows. *J.Reprod.Dev*. 2005; 51: 177-186
- 66) Zarco QL. Factores que afectan los resultados de la inseminación artificial en el bovino lechero. *Vet. Mex*. 21:235-240 (1990).
- 67) Zarco QL. Eficiencia y precisión en la detección de estros en la vaca lechera. Memorias del XXVII congreso nacional de Buiatría AMMVEB Villahermosa Tabasco México. 12 – 14 Junio 2003