



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

TRATAMIENTOS HORMONALES PARA EL CONTROL
REPRODUCTIVO EN VACUNO LECHERO: Comparación de
resultados de los tratamientos en diferentes explotaciones

HORMONAL TREATMENTS ON REPRODUCTIVE CONTROL IN
DAIRY CATTLE: Comparison of results from different farms

Autora: Gal·la Tejedor Atxer

Directores: Antonio del Niño Jesús García
Noelia González Ortí

Índice	Páginas
1. Resumen	1
1.1 Abstract	2
2. Introducción	3
2.1 Regulación hormonal: Eje Hipotálamo- hipófisis- ovario	3
2.2 Foliculogénesis y dinámica folicular	4
2.3 Ciclo Estral	6
2.3.1. Modificaciones endocrinas durante el ciclo estral	8
2.4 Patologías reproductivas	9
2.4.1. Trastornos de la función ovárica	9
2.4.2. Trastornos en la fecundación	11
2.4.3. Fallo Gestacional	11
2.5 Tratamientos hormonales	11
2.5.1. Principios en la sincronización del celo	12
2.5.2. Uso de progestágenos	12
Cronología del uso de progestágenos	13
2.5.3 Uso de prostaglandinas	13
2.5.4. Uso de GnRH	16
2.5.5. Usos combinados	16
2.5.5.1. Uso de progesterona combinado con prostaglandinas (PGF2 α)	16
2.5.5.2. Uso de GnRH al inicio del protocolo de progesterona con PGF2 α	16
2.5.5.3. Utilización de GnRH en las pautas de sincronización con PGF2 α	16
Factores que influyen la respuesta al Ovynch	17
2.5.5.4. Uso de progesterona en los protocolos de GnRH y prostaglandinas	18
2.5.6. Protocolos usados en el trabajo de campo	18
3. Objetivo y justificación	20
4. Material y metodología	20
4.1. Material	20
4.2. Metodología	20
5. Resultados y discusión	21
6. Conclusiones	25
6.1. Conclusions	26
7. Valoración personal	27
8. Bibliografía	28

<u>Índice de figuras</u>	<u>Páginas</u>
1. Fig. 1. Estructuras que intervienen en la regulación hormonal	3
2. Fig.2. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-ovario	4
3. Fig.3. Corte transversal del ovario en la foliculogénesis	5
4. Fig.4. Esquema de la dinámica folicular	6
5. Fig.5. Representación gráfica de las alteraciones hormonales durante el ciclo estral	8
6. Fig. 6. Esquema de los distintos métodos	14

<u>Índice de tablas</u>	<u>Páginas</u>
1. Tabla 1. Tipos de tratamientos y número de ejemplares usados en cada uno	21
2. Tabla 2. Índice de fertilidad de la explotación 1	22
3. Tabla 3. Índice de fertilidad de la explotación 2	22
4. Tabla 4. Índice de fertilidad de la explotación 3	23
5. Tabla 5. Índice de fertilidad de la explotación 4	23
6. Tabla 6. Índice de fertilidad de la explotación 5	23

<u>Índice de gráficos</u>	<u>Páginas</u>
1. Gráfica 1. Métodos reproductivos y de sincronización	22
2. Gráfica 2. Porcentaje de fertilidad de los distintos métodos y explotaciones	23
3. Gráfica 3. Fertilidad media de los tratamientos	24

1. RESUMEN

Una de las principales tareas de un veterinario de vacuno lechero es determinar las causas de infertilidad de las explotaciones lecheras que asesora. En las últimas décadas y con ese objetivo, el uso de tratamientos hormonales ha ido en aumento, poniendo de manifiesto la necesidad de mantener un manejo productivo y reproductivo óptimo para tener el máximo rendimiento productivo. Por otro lado, la selección genética del vacuno lechero está encaminada a una mayor capacidad productiva lechera, pero esa capacidad va en muchas ocasiones en detrimento de la fertilidad, punto que hay que considerar.

Actualmente existen múltiples protocolos de tratamientos hormonales para la sincronización del estro y la inseminación artificial (IA) a tiempo fijo, con el uso de dispositivos intravaginales, por ejemplo, pero en nuestro caso, las explotaciones optan por sincronizar sólo en los casos que las hembras no se quedan gestantes de manera fisiológica. También se usan tratamientos hormonales para dar soluciones a problemas reproductivos concretos, tales como: quistes foliculares y luteales, cuerpo lúteo (CL) persistente, celos silentes o retrasados, así como problemas post-parto como retención placentaria o metritis entre otras. Hay que tener en cuenta que los problemas de infertilidad incluyen muchos factores a parte de los meramente reproductivos como son: una alimentación equilibrada, una detección eficaz del celo y unas condiciones ambientales y de manejo óptimas entre otras.

El uso de D-Cloprostenol (prostaglandina) y Lecilerina (análogo GnRH) permite solventar en gran medida los problemas de infertilidad presentes en las explotaciones. Su uso dependiendo del caso, puede ser único o combinado, provocando el efecto deseado en muchas ocasiones pero no siempre mejorando los índices globales de la explotación.

En este trabajo la metodología llevada a cabo ha consistido en: una revisión bibliográfica encaminada a entender y determinar los distintos métodos hormonales y la realización de una recopilación de datos englobada en un trabajo de campo, mediante un programa informático de control reproductivo (reproGTV).

Éste programa permite obtener el porcentaje de fertilidad de cada explotación, que nos permite entre otras cosas valorar los diferentes tratamientos hormonales aplicados. Dadas las características de los datos recogidos, no hemos podido realizar un estudio estadístico con los datos recogidos acerca de la fertilidad obtenida con los diferentes tratamiento hormonales, puesto que los resultados no se pueden comparar de forma objetiva.

Son explotaciones distintas, con densidades, manejo, genética, alimentación e ubicación distinta. Aún así, se puede observar que el uso de tratamientos hormonales y sus consecuencias, son un campo aún por mejorar, puesto que puede ir implementándose a mayor escala en las pequeñas y medianas explotaciones que existen en nuestro país, haciéndose más competitivas e eficientes.

1.1 ABSTRACT

One of dairy cattle veterinarians' main tasks is to determine the causes of infertility of dairy farms as well as to give advice about this issue. To this regard, in the past few decades, the use of hormonal treatments has increased, which reflects the need of maintaining an optimal productive and reproductive management in order to reach the greatest productive performance. Furthermore, the genetic selection of dairy cattle is aimed at a greater milk production capacity, but this capacity often goes to the detriment of fertility, a point that must be considered.

Currently there are multiple hormonal treatment protocols for the synchronization of estrus and artificial insemination (AI) at fixed time, using intravaginal devices, for example. However, in our case, farms choose to synchronize only in cases that females do not get pregnant in a physiological way. Hormonal treatments are also used to provide solutions to specific reproductive problems, such as: follicular and luteal cysts, persistent corpus luteum (CL), silent or delayed heat, as well as post-partum problems such as retention of placenta or metritis, among others. It must be borne in mind that infertility problems include many factors other than those that are merely reproductive, such as: a balanced diet, effective detection of heat and optimum environmental and management conditions, among others.

The use of D-Cloprostenol (prostaglandin) and Lecilerin (GnRH analogue) makes possible to solve, to a great extent, infertility problems existing in farms. Its use, depending on the case, can be unique or combined, causing the desired effect on many occasions but not always improving the global indexes of exploitation.

In this work, the methodology carried out consists of: a bibliographic review aimed at understanding and determining different hormonal methods and the accomplishment of a data collection included in a field work, through a computer program of reproductive control (reproGTV). This program allows us to obtain the percentage of fertility of each farm, which allows us, among other things, to assess the different hormonal treatments applied. Given the characteristics of the data collected, we were not able to perform a statistical study with the collected data about fertility obtained with the different hormonal treatments, since the results can not be compared objectively.

Although researched farms vary on densities, management, genetics, feeding and location, it can be observed that the use of hormonal treatments and its consequences is still a field to be improved given that it may be implemented on a larger scale, in small and medium-sized farms that exist in our country, making them more competitive and efficient.

2. INTRODUCCIÓN

Para el estudio y comparación del uso de tratamientos hormonales en vacuno lechero en el que se basa este trabajo, es necesario sentar las bases fisiológicas primero, puesto que su comprensión permite modificar o adaptar los distintos escenarios en los que nos podemos encontrar. Éste es el fundamento del ciclo productivo en el vacuno lechero junto con la selección genética enfocada a la capacidad productiva lechera.

2.1 REGULACIÓN HORMONAL: EJE HIPOTÁLAMO- HIPÓFISIS- OVARIO

El ciclo productivo puede empezar una vez alcanzada la pubertad, cuando se presenta la actividad ovárica cíclica regular. El eje hipotálamo- hipófisis- ovario es el responsable de la actividad reproductiva, en el cual mediante la sinergia hormonal se permite la reproducción. Inicialmente, el eje no es plenamente funcional, pero en el momento que las hembras alcanzan la pubertad (madurez sexual) la sinergia hormonal es óptima y permite a los ovarios ovular ciclicamente y en consecuencia permite a la hembra reproducirse.

En las hembras prepúberes en el núcleo pre-óptico y tónico del hipotálamo se liberan pulsos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) de baja frecuencia y amplitud, una vez se llega a la pubertad, la GnRH basal es mayor por el aumento de la frecuencia de los pulsos de GnRH. Este cambio en la pulsatilidad (con un feedback positivo hacia los estrógenos) es causada por los cambios neuroendocrinos en la pubertad condicionados por el peso corporal, el ambiente, las feromonas, el fotoperíodo y la temperatura y humedad relativa así como por la raza. Estos cambios neuroendocrinos incluyen la producción de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante) en la adenohipófisis. Se capta o sintetiza colesterol, que mediante la LH se transforma en andrógenos en las células teca del ovario. Éstos atraviesan la membrana basal y en las células de la granulosa por acción de la FSH pasan a ser estrógenos. Esto ocurre para que crezcan los folículos previo a la ovulación.

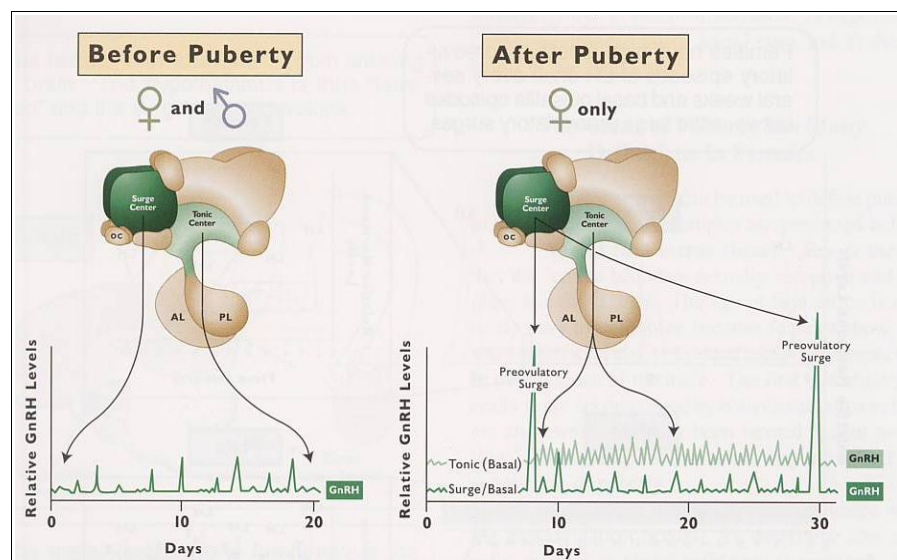


Fig. 1. Estructuras que intervienen en la regulación hormonal (Senger, P. L. 2003).

El eje hipotálamo- hipófisis- ovario una vez alcanzada la madurez sexual funciona de la siguiente manera: la GnRH es liberada por el hipotálamo, que estimula la adenohipófisis y ésta, estimula la secreción de FSH y LH. Estas dos hormonas estimulan el ovario, la FSH estimula el desarrollo folicular, y se produce gran cantidad de estrógenos por parte de los folículos. La LH actúa en la ovulación y en el desarrollo del cuerpo lúteo (CL) el cual sintetiza progesterona. La ovulación se produce cuando la FSH está elevada (máximo crecimiento folicular), hay bajas tasas de progesterona (CL degenerado) y se produce un pico de LH. En el momento de la ovulación los estrógenos ejercen retroalimentación positiva hacia la GnRH y LH para el posterior desarrollo del cuerpo lúteo, encargado de mantener la gestación (si hay fecundación), liberando grandes cantidades de progesterona que ejerce retroalimentación negativa hacia GnRH, impidiendo el crecimiento folicular.

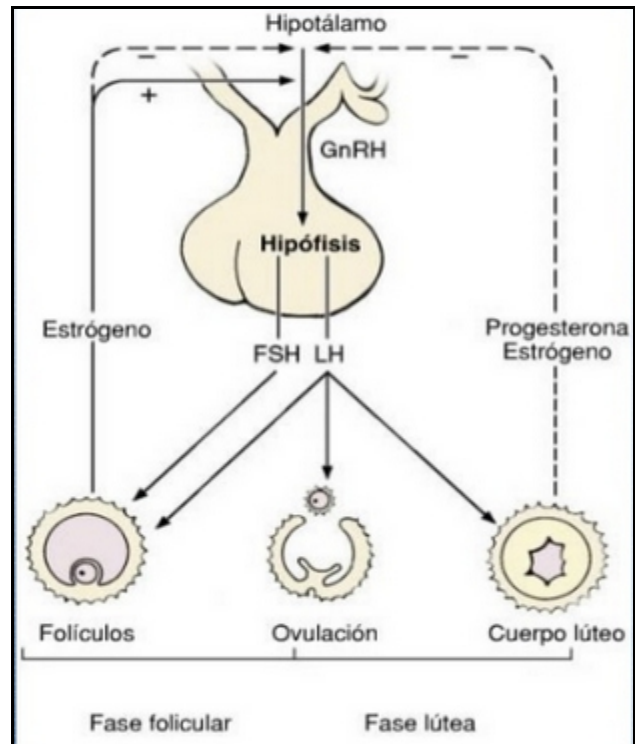


Fig. 2. Esquema del eje hipotálamo-hipofisis-ovario. Activación/inhibición (Fraga, E., 2000).

2.2 FOLICULOGÉNESIS Y DINÁMICA FOLICULAR

En el ovario podemos encontrar diferentes tipos de estructuras fisiológicas, todas ellas resultantes del desarrollo y regresión de los folículos ováricos a lo largo de los ciclos. En el desarrollo embrionario se establece un número finito de gametos que son posteriormente reclutados en cada ciclo.

La foliculogénesis permite la ovulación mediante un proceso que consiste en formar en el ovario folículos maduros capaces de ovular un ovocito a partir del grupo de folículos primordiales establecidos en la embriogénesis. La foliculogénesis y sus etapas se representa en la fig.3

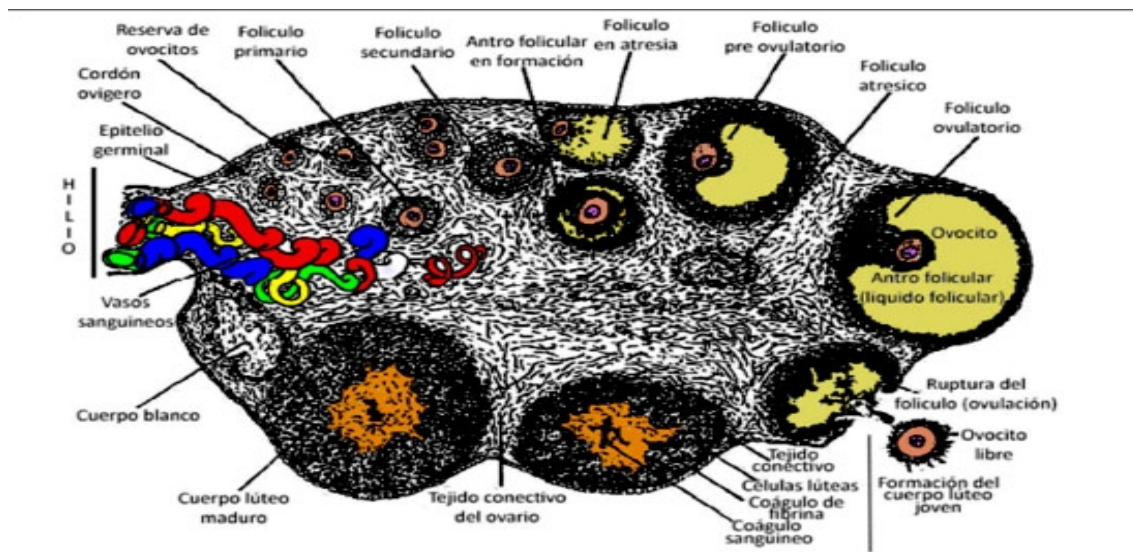


Fig. 3. Corte transversal del ovario en la foliología (Modificado por Ham, A. 1975).

En el vacuno, se estima que menos del 1% de los 100,000 folículos presentes en la pubertad se desarrollarán hasta la madurez y ovularán. Los folículos tienen diferentes funciones, las cuales permiten:

- 1) proteger y nutrir un ovocito en desarrollo
- 2) secretar hormonas esteroideas que regulan la morfología y función de los órganos reproductivos así como la conducta reproductiva durante el estro
- 3) proporcionar las células precursoras que luteinizarán y formarán el cuerpo lúteo después de la ovulación

El crecimiento folicular se da bajo un patrón de ondas u oleadas foliculares, dependiendo de la hembra pueden ser 2, 3 o 4; y es la última la que culmina con la formación del folículo dominante, capaz de ovular. Cada onda contiene 3 fases:

1º **Reclutamiento:** un grupo de folículos es capaz de responder a las gonadotropinas y crecen, alcanzando 1- 2mm diámetro.

2º **Selección:** un grupo de folículos son seleccionados, siendo rescatados del proceso de atresia que el resto sufrirá.

3º **Dominancia:** uno de los folículos, con un mayor número de receptores para la LH, se convertirá en dominante, suprimiendo el crecimiento del resto de los folículos e inhibirá el reclutamiento de un nuevo grupo folicular.

El folículo dominante de la 1ª onda folicular es anovulatorio, porque se encuentra en presencia de un cuerpo lúteo, productor de progesterona. Ésta inhibe al hipotálamo evitando la liberación de LH, por tanto la ovulación no se lleva a cabo. Posteriormente, la regresión del cuerpo lúteo permite que el folículo dominante de la segunda o tercera onda folicular alcance la ovulación. El estradiol sintetizado por el folículo dominante estimula al hipotálamo, liberando GnRH, consecuentemente la hipófisis aumenta la liberación de LH provocando la ovulación (Ginther et al., 1996).

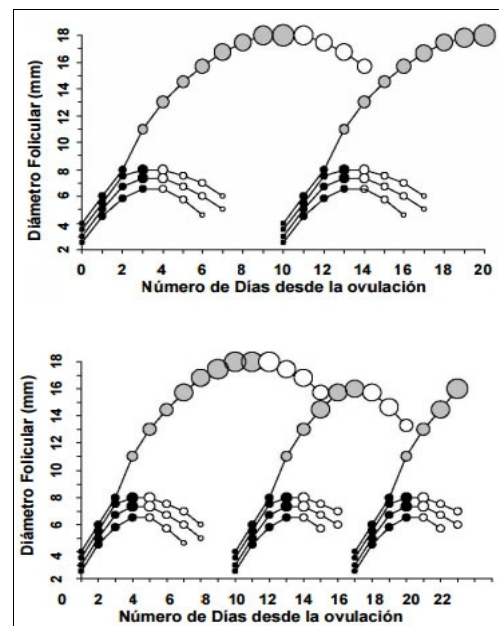


Fig. 4. Esquema de la dinámica folicular (Fricke P. M., 2016).

La ovulación provoca la formación de cuerpos lúteos. Estas glándulas endocrinas temporales comienzan a formarse en el momento que las concentraciones de estradiol periférico van *in crescendo*, lo que a su vez estimula la secreción de hormona luteinizante (LH), que provocará la ovulación y posterior luteinización de las células tanto de la granulosa como tecaes, permitiendo la secreción de progesterona. Ésta es la encargada, preparando el tracto reproductivo, de la implantación y la gestación.

Cuando la fecundación y/o la gestación no se establece, el CL involucre por la acción de la prostaglandina F2 α (PGF2 α) secretada por el útero (Brunner et al., 1969). En las vacas no gestantes la regresión lútea normalmente se presenta alrededor del día 16 al 18 tras la ovulación.

En general, las vacas lecheras primíparas y multíparas en lactación exhiben más ciclos de dos ondas foliculares mientras que las novillas lecheras nulíparas tienden a exhibir más ciclos de tres ondas. Algunos factores que pueden influenciar el número de curvas por ciclo de estro en ganado lechero incluyen tanto el estado nutricional (Murphy et al., 1991) como la edad, paridad y estado de lactancia (Lucy et al., 1992).

2.3 CICLO ESTRAL

En general, la bibliografía establece que la pubertad en razas lecheras se alcanza entre los 7-18 meses de edad y con un 45% de su peso corporal (Thibault et al., 1975; McDonald et al., 1975), aún así en la práctica, no es hasta los 15 meses cuando se empieza con el uso de tratamientos hormonales para las que aún no han salido en celo. En general, en las novillas, al estar juntas, la pubertad se presenta bastante homogénea.

En las novillas la duración del ciclo estral es de 18- 22 días (media 20), y en las vacas es de 21 a 24 días. La duración media del celo es de 15 a 18 horas. Existen varios factores que afectan la duración del celo, por ejemplo la raza, la estación del año, la presencia de toro, la nutrición, la lactancia, etc. La ovulación es espontánea y tiene lugar 12 horas después de terminar el celo.

Cada ciclo consta de varias fases, descritas a continuación:

Fase folicular:

- **Proestro: precede al celo** (3- 4d). El sistema reproductivo se prepara. Hay crecimiento folicular y regresión del cuerpo lúteo del ciclo previo. El útero está hipertrófico y el endometrio congestionado, edematoso y con abundante actividad secretora. La mucosa vaginal presenta hiperemia, estando cornificadas las capas celulares más superficiales.
- **Estro o celo: receptividad sexual** (8- 18h). Es la fase donde la hembra busca al macho, quedándose quieta en su presencia para que la cubra. Su comportamiento es provocado por los estrógenos, incluye: excitación, bramidos, disminución del apetito y producción de leche y pupilas dilatadas. Tienden a juntarse (gregarias) en grupo y montarse entre ellas. Se aprecia moco filante secretado por las glándulas del útero, cérvix dilatada, vagina y vulva congestionadas.

Fase Lúteal:

- **Metaestro: subsiguiente al estro** (2- 4d). La ovulación en la vaca es espontánea y tiene lugar unas 12 horas una vez finalizado el estro. Las células granulosas del folículo que ha ovulado se transforman en células luteales, a partir de las cuales se forma el cuerpo lúteo. En esta fase se reducen las secreciones de las glándulas uterinas, cervicales y vaginales. Los síntomas de celo empiezan a desaparecer.
- **Diestro:** es la fase con presencia de un **cuerpo lúteo funcional**, produciéndose así, grandes cantidades de progesterona. Desaparece la hiperplasia e hipertrofia de las glándulas uterinas y el cuello uterino se contrae. Las secreciones del aparato genital son escasas y pegajosas. La mucosa vaginal se vuelve pálida.

El diestro, la etapa más larga del ciclo (unos 14 días), es la única cuya duración se puede manipular con tratamientos que pretenden acortar o prolongar ésta etapa, para que una vez suspendido el mismo, los animales entren en celo más o menos al mismo tiempo.

2.3.1 Modificaciones endocrinas durante el ciclo estral:

A causa del aumento de la concentración de estrógenos se manifiestan los síntomas de celo, siendo los valores más elevados al inicio de éste y van fluctuando a medida que pasan los días. Los niveles basales se establecen en la ovulación (metaestro).

En las vacas con un ciclo estral con 2 ondas foliculares, la elevación de los estrógenos se produce alrededor del día 9, por acción del folículo dominante de la primera ola de crecimiento folicular, que regresará. El folículo dominante de la segunda ola de crecimiento folicular será el que ovulará, ya que la regresión del cuerpo lúteo de la última ovulación ocurre el día 16 - 17 del ciclo.

En vacas con 3 ondas foliculares se observa una pequeña elevación alrededor del día 6, es producido por el folículo de la primera onda folicular. Pero además de estrógenos, los folículos producen otras hormonas, entre ellas la inhibina. Se puede detectar también otro pequeño pico de estrógenos alrededor del día 11, producido por el folículo dominante de la segunda onda folicular. Tras éste, existe otro incremento de estrógenos en la fase de proestro que es el causante de la ola de LH. Esta última ola es imprescindible para completar la maduración del folículo, ovulación y formación del cuerpo lúteo final si no hay gestación.

La progesterona, fruto del cuerpo lúteo llega al umbral máximo aproximadamente los días 7 y 8 después de la ovulación y paulatinamente van disminuyendo a partir del día 16-18. Cuando la progesterona disminuye a niveles basales, se desbloquea la hipófisis y se liberan las gonadotropinas.

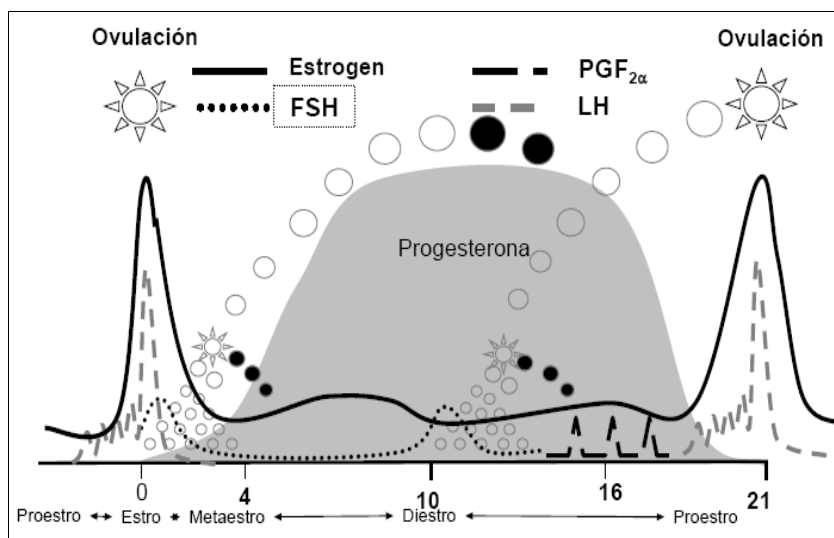


Fig. 5. Representación gráfica de los cambios hormonales durante el ciclo estral (<http://docplayer.es>).

2.4. PATOLOGÍAS REPRODUCTIVAS

Cuando existe una alteración del sistema reproductivo se produce un fallo reproductivo, el cual provoca infertilidad.

Las principales causas de infertilidad son:

1. Humanas: eficiencia y/o errores en la detección del celo
2. Fisiológicas: déficit nutricional y/o de condición corporal
3. Ambientales: estrés por calor, bienestar animal
4. Reproductivas: quistes ováricos, retención de placenta, infección uterina, entre otras

La patología reproductiva la podemos subdividir en: **trastornos de la función ovárica** (incapacidad ovulatoria, anormalidades en la ovulación, trastornos del ciclo); **trastornos en la fecundación** (incapacidad de fertilización, fecundación atípica); **fallo gestacional** (mortalidad embrionaria/fetal, alteraciones congénitas).

En la práctica, las patologías reproductivas más frecuentes que se presentan son trastornos de la función ovárica, entre las cuales se incluyen los quistes, ya sean foliculares o luteales. Así como los trastornos en la fecundación, siendo la incapacidad de fertilización la causa más frecuente.

2.4.1 *Trastornos de la función ovárica*

La incidencia producida por los quistes ováricos en vacas lecheras va del 10 al 13% (Erb y White, 1981 y Bartlett et al., 1986), y los rebaños con problemas pueden tener una incidencia mucho mayor (30 a 40%) durante períodos cortos (Archbald, 1992). Los quistes ováricos pueden ser foliculares y/o luteales. También existen los cuerpos lúteos persistentes y los quísticos.

Quistes foliculares

Son estructuras llenas de fluido, fallando la ovulación, y de más de 25mm de diámetro que persisten en los ovarios por más de diez días (Archbald y Thatcher, 1992). En las vacas lecheras, son la causa principal de pérdida económica y disfunción reproductiva en la producción láctea (Garverick, 1997) y las vacas a las que se les diagnostica, generalmente muestran intervalos entre partos largos (Bartlett et al., 1986). Los quistes foliculares se forman por permanencia y desarrollo de un folículo con capacidad de ovular pero que no lo hace debido a un defecto en el eje reproductivo o una disfunción ovárica.

Defecto del eje reproductivo (hipotálamo- hipófisis- ovario) causado por:

1. Inadecuada secreción de GnRH
2. Inadecuada magnitud y presencia de pulsos de LH
3. Deficiencia en la respuesta a la estimulación positiva de los estrógenos

La disfunción ovárica es provocada por una carencia de receptores para la LH, así como otras causas como: déficit de glucosa y estrés, que induce liberación de ACTH (hormona adrenocorticotropa) y cortisol bloqueando el eje.

Los quistes foliculares son consecuencia de un fallo en la ovulación. Eso puede producir que los folículos sigan creciendo de diámetro en el ovario. Las gonadotropinas (GnRH) son las encargadas del crecimiento folicular y la ovulación, y éstas son secretadas por la hipófisis. Si existe un fallo en la regulación o recepción en dicho órgano esto se traduce también en un fallo en la ovulación causando posiblemente un quiste. El eje reproductivo también incluye la secreción por parte del hipotálamo de la GnRH responsable de la posterior secreción de LH, principal hormona relacionada con la ovulación y si ésta falla, posibilita la formación de quistes. La posibilidad de aparición de quistes puede ser producido por un fallo en cualquiera de los tres niveles del eje reproductivo. Siendo una teoría sobre el posible origen de un quiste, un fallo en el hipotálamo puesto que éste gestiona tanto la hipófisis como los ovarios.

Otra hormona muy importante es la LH, sin su correcto funcionamiento no se produce la ovulación. La carencia de receptores de LH en el ovario provoca una disfunción ovárica. Esto sucede por un desarrollo ineficaz de los receptores en los folículos maduros del ovario, haciéndose refractarios a la LH y por tanto, no se produce la ovulación. Este hecho también puede comprometer la respuesta a la FSH por parte de las células de la granulosa o de las tecas.

El estradiol es la hormona encargada de ejercer control sobre la hipófisis que prepara a la hembra para la reproducción. Controla la capacidad de liberación de GnRH, ésta a su vez, estimula la liberación de LH, indispensable para la ovulación. Por tanto, en una vaca quística, donde el estradiol es incapaz de estimular la liberación de GnRH, no se libera el pico de LH y no se produce la ovulación.

Quistes luteales

Los quistes luteales son de paredes gruesas, con fluido, y de más de 2.5 mm de diámetro que secretan cantidades normales o superiores de progesterona. Son en su mayoría consecuencia de la luteinización de un quiste folicular (Garverick, 1997) y son causa de infertilidad si persisten y mantienen la progesterona sistémica en concentraciones que mantienen bloqueando el eje hipotálamo- hipófisis- ovario, y por tanto el incremento de LH y la ovulación.

La diferencia con un cuerpo lúteo normal es que éste último contiene cavidades y papila ovulatoria. Van de menos de 2 mm hasta más de 10 mm de diámetro según la fase del ciclo estral y la preñez temprana (Kastelic et al., 1990).

Otras estructuras diferentes son los cuerpos lúteos quísticos que son CL mal conformados, con una cavidad que contiene fluido en su interior. El diámetro total de un cuerpo lúteo quístico es más grande que un cuerpo lúteo normal; además de presentar una protuberancia o papila ovulatoria en la superficie del ovario. El cuerpo lúteo quístico es normalmente más esférico que un cuerpo lúteo normal, pero no tan redondo como un quiste luteinizado.

Dentro de los trastornos de la función ovárica también hay que mencionar otras causas de infertilidad como la atresia folicular, la ovulación retrasada (más relacionada con la nutrición y la herencia que con problemas estrictamente reproductivos) y las alteraciones del ciclo en las que se incluyen: retraso en la ciclicidad, estro silencioso y duración anormal del ciclo.

2.4.2. *Trastornos en la fecundación*

Los problemas genéticos, anatómicos, nutricionales y de estrés pueden llevar a la infertilidad por la incapacidad para que se lleve a cabo la fecundación. La incapacidad por parte del espermatozoide de fecundar al ovocito puede estar generada por motivos relativos al manejo reproductivo: sobretodo por inseminaciones en vacas sin celo, IA en un momento no idóneo (temprana o tardía) y otras causas como una deficiente calidad seminal o una mala praxis del inseminador.

2.4.3. *Fallo Gestacional*

Otra de las causas nombradas de infertilidad es el fallo gestacional. La etiología puede ser diversa: *intrínseca del animal*: balance energético negativo o mal balanceado, infección de útero, metritis; *extrínseca o ambientales* : estrés por calor, bienestar animal.

También hay que mencionar las alteraciones hormonales como falta de progesterona, alteraciones congénitas y fenómenos inmunológicos.

Todos los factores a los que se le atribuyen infertilidad: reproductivos, ambientales, de manejo y nutricionales están interrelacionados, no pudiéndose tratar individualmente, sino en conjunto, para paliar los problemas de infertilidad que provocan.

2.5. TRATAMIENTOS HORMONALES

En este trabajo se pretende observar y comparar el uso concreto de protocolos de tratamiento en diferentes explotaciones. Existen múltiples protocolos para la sincronización y el tratamiento de problemas de infertilidad.

2.5.1 *Principios de la sincronización del celo*

La sincronización del ciclo estral de la vaca se basa, en general, en el uso de prostaglandinas o sus análogos que acortan el ciclo, puesto que eliminan el CL del ciclo anterior y la hembra comienza un nuevo ciclo, y de progestágenos que simulan la presencia de un CL, bloqueando el ciclo. Para mejorar los resultados de los protocolos anteriores y sincronizar el crecimiento folicular y la regresión del cuerpo lúteo, es común el uso de GnRH y sus análogos para inducir la ovulación. Además, algunos protocolos de sincronización incluyen gonadotrofinas placentarias, de actividad FSH y hCG, de acción LH.

Cabe mencionar que con anterioridad el uso de estrógenos se permitía y sigue vigente en otros países pero que actualmente y como consta en el RD 2178/2004 no se pueden administrar tratamientos hormonales a especies domésticas de abasto (bovina, en este caso) con efecto estrogénico, androgénico o gestágeno que vayan a consumo humano.

La evolución en la investigación de los métodos de sincronización se puede explicar de manera simplificada en 5 fases o etapas. En la primera, en los años 40 se investigó en prolongar la fase lútea con el uso de progesterona exógena para que una vez sin tratamiento las vacas entraran en celo sincrónicamente. En una etapa posterior se introdujo el uso de estrógenos y gonadotropinas para inducir el celo y posterior ovulación. La tercera etapa incluye el uso de prostaglandinas con el objetivo de acortar la fase lútea, para así tener un inicio más precoz de la fase folicular. Ésta última evolucionó y se investigó sobre la asociación progestágenos y prostaglandinas y finalmente la dinámica actual es manipular tanto la fase lútea como la folicular con el uso de progestágenos para bloquear el eje hipotálamo-hipófisis simulando la fase lútea y prostaglandinas y sus análogos como agentes luteolíticos sobre el cuerpo lúteo.

2.5.2 *Uso de Progestágenos*

La progesterona es liberada por el cuerpo lúteo y cuando éste degenera, deja de producirse. Su función es suprimir la fase estral y la ovulación, así pues inducen el estro tras su retirada. Hay diferentes dispositivos para administrarlo: implantes o dispositivos intravaginales (CIDR, PRID) que permiten inducir y sincronizar el estro.

Los progestágenos tienen la ventaja de que su uso combinado con hormonas luteolíticas, a parte de mejorar la sincronización, inducen el estro y la ovulación a un porcentaje aceptable de vacas en anoestro.

Para esto, debe prolongarse la fase luteal mediante la administración exógena de progesterona o de progestágenos sintéticos (Odde, 1990). Una vez se retira el tratamiento el ciclo se reanuda y comienza a manifestarse la sintomatología de celo.

Cronología del uso de progestágenos

El primer método usado se aplicó en los años 40, mediante inyecciones diarias de progesterona (Ulberg et al., 1951). Después se administró acetato de megestrol (AMG) o acetato de medroxiprogesterona (AMP) por vía oral (Hansel et al., 1961).

Posteriormente se aplicó progesterona por vía intravaginal mediante esponjas (Carrick y Shelton, 1967), se aplicaron implantes de acetato de megestrol en el cuello (Dziuk et al., 1966) o implantes de norgestomet y estrógenos durante 9 días en el pabellón auricular (Wishart y Young 1974). Finalmente se utilizaron espirales intravaginales de silicona impregnadas de norgestomet (Progesterone Releasing Intravaginal Device , PRID) (Roche, 1974) o de silicona impregnada de progesterona (Controlled Intravaginal Drug Release , CIDR) (Macmillan y Peterson 1993).

Existen distintos protocolos que difieren en el tiempo de duración. La aplicación de tratamientos largos, de 14-16 días, disminuyen la fertilidad, en gran medida por el desarrollo folicular y disminución de la calidad del ovocito (Savio et al., 1993). En los ovocitos se detectó una meiosis prematura, con una asincronía entre la maduración nuclear y citoplásmica que provocó un retraso en el desarrollo del embrión al día 6 (Ahmad et al., 1997). Sin embargo, en tratamientos de 7 a 9 días la fertilidad es normal, aunque el nivel de sincronización es menor (Roche, 1974).

La fertilidad después de los tratamientos con progesterona depende de los niveles de progesterona en sangre durante la fase luteal, de la presencia o no de un CL y de las pautas de varios tratamientos en la dinámica folicular (Smith y Stevenson, 1995). También puede variar la fertilidad según el progestágeno utilizado.

Así la fertilidad posterior al PRID es mayor a la del implante de norgestomet (Smith y Stevenson, 1995) y a la del CIDR. La fertilidad no varía cuando el tratamiento se inicia al principio del ciclo estral, pero disminuye cuando empieza a partir del día 11 (Van Niekerk y Belonje, 1970) debido a que los niveles subluteales tienen un menor efecto supresor de la LH que promueve la formación de folículos persistentes y una activación prematura del ovocito.

2.5.3. Uso de Prostaglandinas

La prostaglandina F2 α y sus análogos (alfaprostol, cloprostenol, fenprostalene, luprostiol y tiaprost) son luteolíticos y permiten por tanto conseguir la presentación simultánea del estro en un grupo de hembras, entre los días 5 y 16 tras su aplicación. La PGF2 α es secretada por el útero provocando la ruptura y lisis del cuerpo lúteo. Al administrar una prostaglandina, teniendo un CL presente, el 85-95% de las vacas ovulan 7 días tras su administración y entre un 70-90% lo hacen entre el día 3 y el 5 (Rosenberg et al., 1990; Ferguson et al., 1993).

La pauta de administración que consta de una doble inyección en un intervalo de 7- 11 o mejor 14 días, permite casi con total seguridad, la formación de un CL funcional al recibir la segunda dosis de prostaglandinas (Rosenberg et al., 1990). Esta doble pauta se motiva por la sensibilidad del CL a las prostaglandinas, y con un intervalo de 14 días, el 67% de las vacas entre el día 7 y el 20 del ciclo ovularán de forma espontánea (días 18 al 20) o mediante las prostaglandinas (días 7 al 17). Estas vacas se encontraran entre los días 9 y 14 de su ciclo al aplicar la segunda inyección. El 33% de vacas restantes están entre el día 0 y 6 a la primera inyección y entre el día 14 al 20 en el segundo tratamiento.

También, se ha descrito un protocolo con 3 inyecciones (Target Breeding Program). Las hembras sin signos de celo tras la primera administración se trataron con 2 dosis separadas 14 días y se inseminaron al entrar en celo o entre las 72-80 horas después de la tercera dosis (Nebel y Jobst, 1998).

La fertilidad tras los tratamientos es normal o incluso está aumentada, aunque puede disminuir en IA a tiempo fijo, debido a las variaciones en el tiempo de ovulación. En los tratamientos de doble inyección a los 14 días se reduce el número de días abiertos, que son aquellos en los que la vaca no está en lactación (Tenhagen et al., 2000).

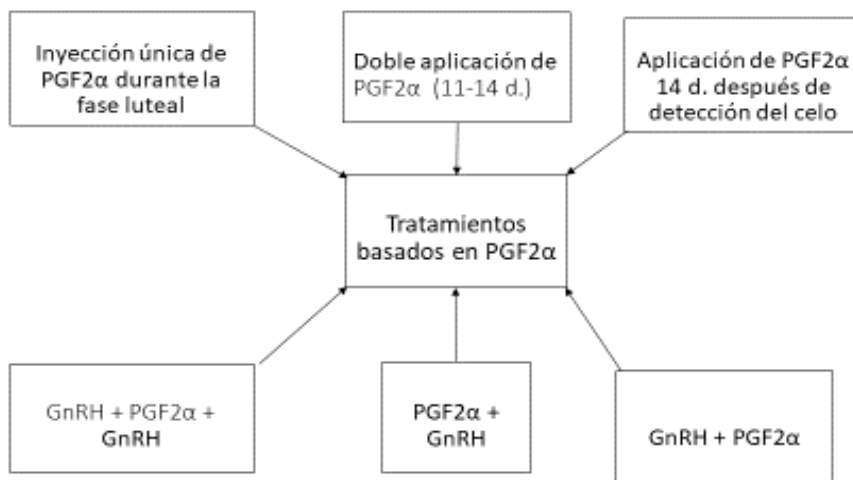


Fig. 6. Esquema de los distintos métodos (Gordon, Ian, 1996)

Existen factores limitantes a la hora de aplicar prostaglandinas:

- falta de ciclicidad
- inadecuada pauta de sincronización
- variación en el tiempo de ovulación
- número de vacas tratadas (ya que disminuye el éxito de la detección de celo si hay muchas).

Los resultados al tratamiento con prostaglandinas con un CL funcional, dependen de diferentes factores:

➔ Fase del estro: Dependiente de la madurez del folículo dominante. Si en el momento del tratamiento el folículo dominante está próximo a la ovulación, ésta se produce al tercer día, pero si el nuevo folículo empieza a emerger, la ovulación se produce a los 4 o 5 días (Kastelic et al., 1990). Existe un intervalo medio entre la aplicación de PGF2 α y el inicio del celo de 48 a 72 horas, según si la administración se lleva a cabo entre los días 5 al 8, de unas 70 horas, entre los días 8 y 11 y de unas 62 horas o entre los días 12 y 15.

➔ Nivel de progesterona: El nivel de progesterona en el inicio del celo puede modular la respuesta del celo. Altos niveles de progesterona en el momento del tratamiento retrasan el inicio del celo, pero éste será más manifiesto (84%) que en las vacas con niveles inferiores 3,1ng/mL (56%) (Larson et al., 2004). En primíparas, la fertilidad después de una pauta de 14 días es mejor que en una pauta de 11 días, debido a un mayor nivel de progesterona antes de la ovulación (Rosenberg, 1990).

➔ Aplicación del producto: El tipo de aplicación puede afectar en ocasiones: habiendo diferencias PRID/CIDR y pudiendo observar o no diferencias acerca de la fertilidad según los casos.

➔ Dosis y vía: generalmente se pone por vía intramuscular, aunque también se han aplicado por vía intravenosa, SC., en la fosa isquiorectal, en la submucosa vulvar, intraovárica, en el cérvix, por infusión intrauterina, en la pared uterina y en los labios vulvares (Murugavel et al., 2003). Los resultados varían según el momento del ciclo y el estado del CL.

➔ Otras causas: Existen diferencias entre *Bos indicus* y *Bos taurus*, así como por la edad, la raza y la estación del año. La presencia de otras hembras en celo o de un macho mejora los resultados de sincronización y de la manifestación del celo.

2.5.4. *Uso de GnRH*

La hormona liberadora de gonadotropina es la responsable de la liberación de FSH y LH. Cuando esta se presenta en mayor cantidad y pulsatilidad se llega a la madurez sexual. Es la precursora del inicio de la foliculogénesis. La GnRH se aplica en protocolos combinados. Es común su uso combinado con las hormonas descritas anteriormente.

Existen múltiples protocolos para la sincronización en los rumiantes que han ido evolucionando y surgiendo a medida que se profundizaba en el estudio y desarrollo para aumentar la capacidad de actuación en el control reproductivo. A continuación se detallan los más comúnmente empleados.

2.5.5. *Usos combinados*

2.5.5.1. Uso de progesterona combinado con prostaglandinas (PGF2 α):

El uso de prostaglandinas una vez terminado el tratamiento con progesterona permite a los animales entrar en celo antes, ya que estos animales pueden tener un CL sensible a las PGF2 α y por tanto lo hace desaparecer, eliminando su efecto bloqueante, y permitiendo una mejor sincronización de la ovulación (Roche, 1976; Johnson y Spitzer, 2001). La aplicación de PGF2 α a las 48 horas de la retirada del PRID iguala o mejora la fertilidad comparado con la aplicación de PMSG (hormona gonadotropina) (Mialot et al., 1999) o de PGF2 α sola (Ryan et al., 1999). Sin embargo, Roche en 1976 obtuvo resultados contradictorios en novillas.

2.5.5.2. Uso de GnRH al inicio del protocolo de progesterona con PGF2 α :

Para evitar la menor fertilidad debido a la presencia de folículos persistentes, causados probablemente por el uso de progesterona (fase luteal) en tratamientos largos (13 días) y posterior administración de PGF2 α y la aplicación de GnRH, para que entren en estro (Macmillan y Tahtcher, 1991). Xu y Burton en el 2000 añadieron GnRH al aplicar un CIDR, que se mantuvo durante 8 días, administrando PGF2 α un día antes de la retirada de la progesterona, para prevenir la ovulación prematura cuando el tratamiento se inicia después del día 13, con resultados aceptables.

2.5.5.3. Utilización de GnRH en las pautas de sincronización con Prostaglandinas:

En vacas cíclicas, la aplicación de GnRH o agonistas induce la secreción de gónadotrofinas con un pico de LH a las 2-3 horas, alterando el patrón de crecimiento folicular. Una sola dosis de GnRH o de un agonista induce la ovulación o luteinización del folículo dominante mayor de 10 mm (Martínez et al., 1999) y el inicio de una nueva oleada a los 3-4 días del tratamiento a no ser que exista un cuerpo lúteo funcional. Esta nueva oleada se produce gracias a la secreción de FSH.

Los resultados a la GnRH varían según el momento del ciclo. La tasa de ovulación es baja cuando el tratamiento se hace en los primeros días del ciclo ya que los folículos son pequeños y no hay receptores para la LH. Del día 5 al 9, el folículo dominante es sensible a la ovulación (96%). A la mitad del ciclo la tasa de ovulación es de un 54% ya que el primer folículo dominante ha ovulado y se inicia una nueva oleada. Al final del estro, el porcentaje de ovulación depende de si la vaca presenta 2 ó 3 oleadas (Vasconcelos et al., 1997). Para mejorar la sincronización en los tratamientos con PGF2 α , se ha incluido la aplicación de GnRH, la cual provoca la secreción de LH, causando la ovulación y luteinización de los folículos mayores y la sincronía en el reclutamiento de los nuevos folículos. La posterior aplicación de PGF2 α induce la regresión del CL, lo que facilita la maduración del nuevo folículo dominante (Schmitt et al., 1996).

La aplicación de GnRH 6 o 7 días antes de la PGF2 α mejora la sincronización (80%) comparado con la PGF2 α sola (50-60%). Sin embargo, si la GnRH se aplica entre dos tratamientos de PGF2 α , los resultados son mucho peores (Stevenson et al., 2000).

Para sincronizar el momento de la ovulación dentro de un período corto de tiempo que permita la IA sin necesidad de detección de celo, a la pauta de GnRH + PGF2 α , se le añadió una dosis adicional de GnRH a las 32-48 horas del tratamiento con prostaglandinas (Pursley et al., 1995). Esta segunda dosis de GnRH sincroniza la secreción de LH y la ovulación, permitiendo la IA a las 24 horas de la aplicación. Este protocolo se conoce como Ovsynch o protocolo de IA a tiempo fijo. Los folículos preovulatorios en una fase similar y que son susceptibles a la LH previamente inducida por la segunda GnRH, ovulan sincronizadamente. El protocolo Ovsynch se ha modificado recientemente recomendándose la IA a las 16 horas (Pursley et al., 1998), la aplicación de la segunda dosis de GnRH a las 36 horas de la dosis de PG (Nebel y Jobst, 1998) y 50 μ g de GnRH en lugar de 100 μ g (Yamada et al., 2001).

- **Factores que influyen la respuesta al Ovsynch**

Fase del estro en que se inicia el tratamiento. Cuando se empieza en fase metaestro, el folículo es pequeño para ovular y antes de la aplicación de la segunda aplicación de GnRH será atrésico. Por el contrario, si se inicia al final de la fase luteal, el CL puede sufrir una regresión espontánea unos 3 días antes de la dosis de PGF2 α . La mejor respuesta se obtiene al iniciar el tratamiento entre los días 5 y 12 (Moreira et al., 2000), aunque otros autores no encuentran diferencias. Para mejorar la respuesta al Ovsynch, Jordan y colaboradores en el 2002, recomiendan aplicar la primera dosis de GnRH el día 14 después del doble tratamiento con PGF2 α . La ovulación a la primera GnRH es clave para el funcionamiento del Ovsynch.

La respuesta en novillas (54%) es muy inferior que en vacas (85%), se puede explicar por un fallo en la sincronía folicular, puesto que existe una baja respuesta ovulatoria a la primera dosis de GnRH (Pursley et al., 1997).

La alta producción de leche se correlaciona positivamente con una baja fertilidad al Ovsynch, al reducirse la concentración de progesterona por el elevado metabolismo hepático de estos animales (Vasconcelos et al., 1999).

Fase de lactación. El número de gestaciones disminuye en vacas cuyo inicio de tratamiento se inicia entre el día 60 y 75 post- parto comparado con los tratamientos iniciados a partir del día 76 (Prusley et al., 1997). Podría ser debido a un balance energético negativo o condición corporal pobre, lo que coincidiría con los resultados obtenidos por Mattos y colaboradores en el 2001.

2.5.5.4. Uso de progesterona en los protocolos de GnRH y prostaglandinas:

Se ha podido realizar exitosamente la sincronización del celo de vacas con problemas ováricos post- parto combinando protocolos de progesterona con otros de PGF2 α . La aplicación de un PRID 9 días entre el tratamiento de GnRH y PGF2 α , o del Ovsynch, mejoraba los resultados en vacas con folículos persistentes (López-Gatius et al., 2001; López-Gatius et al., 2002). La aplicación de un CIDR entre la GnRH y la PGF2 α de un Ovsynch consigue mejor fertilidad que el Ovsynch solo, pero únicamente en vacas acíclicas (Pursley et al., 2006). Muguravel y colaboradores en el 2003 demostraron que la presincronización con doble aplicación de PGF2 α previa a los programas de sincronización mejora notablemente el índice de gestación en los primeros meses post- parto al reducir el número de vacas con quistes ováricos, endometritis o piometra. La respuesta inicial al Ovsynch en vacas con niveles elevados de progesterona en sangre, fue peor. En contrapartida, usar progesterona entre GnRH y las PGF2 α mejoró los resultados.

2.5.6. Protocolos usados en el trabajo de campo

En las explotaciones a las cuales hemos acudido para valorar la incidencia en la fertilidad de los distintos tratamientos hormonales que se llevan a cabo, hemos constatado que se realizan dos tipos de protocolos de sincronización, así como el uso de tratamientos hormonales para paliar patologías reproductivas concretas y/o puntuales que se dan en las explotaciones. Los protocolos son:

1. GPG (Ovsynch): se administra GnRH (Dalmarelin) en el día 0, a los 7 días PGF2 α (Dalmazin), a los 2 días se administra otra vez GnRH (Dalmarelin) y se insemina al día siguiente.
2. Doble Ovsynch: dos protocolos GPG (ovsynch) separados de una semana.

Hay que mencionar que el uso de estos dos fármacos, a parte de permitir la sincronización, permite tratar múltiples problemas reproductivos, facilitando el trabajo de ganaderos y veterinarios.

El Dalmarelin (Lecirelina) es un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Debido a las diferencias estructurales entre la lecorelina y la GnRH natural, la primera presenta una mayor persistencia en el lugar de los receptores hipofisarios específicos. La acción fisiológica de las gonatropinas consiste en estimular la maduración del folículo e inducir la ovulación y la aparición del cuerpo lúteo en el ovario. Se administra vía intramuscular en casos de:

- Tratamiento de quistes ováricos foliculares: 4 ml
- Inducción a la ovulación en el momento de la inseminación en casos de celos cortos, silentes o prolongados: 2 ml

El Dalmazin es un fármaco hormonal a base de cloprostenol dextrógiro (análogo sintético de la prostaglandina $F2\alpha$). Durante la fase luteinizante del ciclo estral, induce una caída en el número de receptores de hormona luteinizante (LH) en el ovario, lo que conduce a una rápida regresión del cuerpo lúteo y un descenso en los niveles de progesterona. La parte anterior de la glándula pituitaria aumenta los niveles de hormona estimulante del folículo (FSH). Esto permite la maduración de un nuevo folículo, aparición del estro y la ovulación. Se administra exclusivamente por vía intramuscular (2 ml de producto (0.150 mg de principio activo)) en casos de:

- *Inducción al estro (también en vacas que presentan celos débiles o silentes)*: tras determinar la presencia del cuerpo lúteo (6°-18° día del ciclo). Se observa el celo aproximadamente en 48-60 horas. Inseminar 72-96 horas después del tratamiento. Si no se produce celo el tratamiento debe repetirse 11 días después del tratamiento anterior.
- *Sincronización del estro*: administrar dos veces (con un intervalo de 11 días). Inseminar artificialmente 72 y 96 horas después de la segunda inyección.
- *Disfunción del ovario*: una vez determinada la presencia del cuerpo lúteo, administrar e inseminar en el primer celo siguiente al tratamiento. Si no se observa ningún celo, llevar a cabo un examen ginecológico una vez más y repetir la inyección tras un intervalo de 11 días posteriores al primer tratamiento. La inseminación se lleva a cabo 72-96 horas después del tratamiento.
- *Endometritis, piómetra*: administrar 1 dosis. Si es necesario repetir el tratamiento 10 días después. Inseminar 72-96 horas después del tratamiento.
- *Interrupción de la gestación*: administrar durante la primera mitad de gestación.
- *Patología post-puerperal, involución uterina retardada*: administrar 1 dosis y, si está indicado, repetir el tratamiento una o dos veces a la dosis de 1 ml (con 24 horas de intervalo).
- *Terapia combinada de quistes foliculares*: administrar 10-14 días después de la administración de GnRH o HCG, una vez que se observe respuesta positiva en el ovario.

3. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN

El trabajo pretende mostrar la dinámica reproductiva existente en el mundo de la ganadería lechera y cómo los tratamientos hormonales intentan ayudar a la mejora de la rentabilidad de este sector mediante la sincronización del ganado, optimizando así, los índices de fertilidad.

Los objetivos de este trabajo son:

- Realizar una revisión sobre la fisiología hormonal de la reproducción y cuales son las causas de las patologías reproductivas que afectan a la fertilidad del ganado vacuno lechero en general, así como sobre los distintos tratamientos hormonales que existen y cuales de ellos y porqué se utilizan en el ámbito del vacuno lechero.
- Constatar qué protocolos se usan en el campo y la incidencia que tienen respecto a la fertilidad de las explotaciones estudiadas.
- Determinar, mediante la obtención de datos reproductivos de 5 explotaciones lecheras localizadas en el área del Pirineo occidental catalán, si los tratamientos hormonales mejoran o no el índice de fertilidad.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1 Material

La base fundamental de este trabajo se basa en la revisión bibliográfica acerca de la fisiología reproductiva del vacuno lechero así como los métodos capaces de hacerla más eficiente en el campo de la producción. La revisión consta de una búsqueda de artículos usando distintas bases de datos, tales como: Google académico, Web of Science, Refseek, Scielo, Ciencia.science.gov. Para ésta búsqueda nos centramos en palabras claves: fertilidad, prostaglandinas, GnRH, Ovynsch. También nos hemos basado en libros y revistas de ámbito divulgativo en el campo del vacuno lechero. El material aportado en los resultados se obtiene de la acumulación de datos de los controles reproductivos que se llevan a cabo en las explotaciones estudiadas.

4.2 Metodología

La aportación práctica llevada a cabo ha sido acceder y recoger los datos reproductivos de cinco explotaciones dedicadas a la producción lechera pertenecientes a una misma cooperativa situada al norte de la Provincia de Lleida. Éstas se gestionan mediante un programa informático, reproGTV, en el cual se van introduciendo semanal, quincenal o mensualmente (según densidad de la explotación) los datos (estado o tratamiento que se le realiza) de cada una de las vacas de las distintas explotaciones a las cuales se les realiza el control reproductivo. El programa identifica a qué vacas hay que realizar el control (diagnostico ecográfico y/o tratamiento) según sus antecedentes o estado en qué se encuentra el día del control.

Este programa permite tener un global del estado reproductivo de la explotación, así como emitir, según el registro, a qué vacas hay que tratar o diagnosticar en la siguiente visita. Las 5 explotaciones se gestionan médicamente por el mismo equipo de veterinarios, es decir, el protocolo y uso de tratamientos hormonales es el mismo para las 5 explotaciones estudiadas. Hay que decir que las explotaciones se agrupan en una cooperativa junto a una cincuentena más. Estas hormonas se usan tanto para la sincronización, con su protocolo correspondiente, como para tratar los problemas reproductivos puntuales. Los fármacos aplicados respecto a problemas de infertilidad en estas 5 explotaciones son el Dalmarelin y el Dalmazin, aunque existen otros fármacos similares que tienen una capacidad similar a éstos. La metodología a la hora de analizar los datos recogidos a sido difícil, ya que el uso de estos dos tratamientos se usan indistintamente para sincronizar que para paliar fallos puntuales en la reproducción. La diferencia recae en el protocolo, un uso de estos dos tratamientos en la pauta descrita, se usa para sincronizar, mientras que el uso puntual de éstos es para revertir problemas reproductivos eventuales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se puede observar la diferencia en el uso de tratamientos hormonales, uno para paliar fallos reproductivos y/o sincronización con posterior IA. Raramente en una explotación no se emplean tratamientos hormonales para tratar problemas de infertilidad como quistes foliculares, persistencia de cuerpo lúteo, etc.. pero no es raro encontrar explotaciones, y este es el caso, que no usan los tratamientos hormonales de manera sistemática para sincronizar a su rebaño sino que los usan en casos individualizados para procurar la gestación, tras varios intentos fallidos sin sincronización.

Es por eso, que expongo la diferencia individualizada en cada explotación acerca de la fertilidad ante el uso de los dos tipos de tratamiento hormonal para sincronizar y sin tratamiento, buscando mediante la comparación el efecto de estos tratamientos sobre la fertilidad.

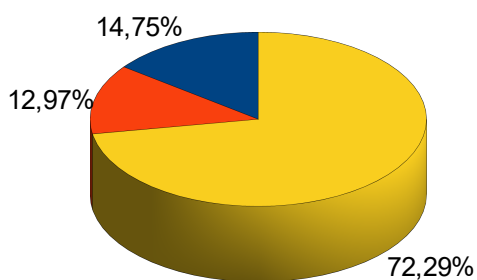
En la siguiente tabla se muestran los resultados, por explotaciones, con el tipo de tratamiento y la muestra sobre el total de datos de los que disponemos. Como se ha descrito anteriormente, el GPG y el Ovsynch son protocolos de sincronización en los que se administra Dalmarelin y Dalmazin en unos tiempos fijados.

Tabla 1. Tipos de tratamientos y número de ejemplares usados en cada uno

	GPG (Ovsynch)	Doble Ovsynch	Sin tratamiento	Total hembras explotación
Explotación 1	37	43	311	391
Explotación 2	31	2	170	203
Explotación 3	31	2	84	117
Explotación 4	55	74	197	326
Explotación 5	28	39	130	197
Hembras totales	182	160	892	1234

Como se puede observar en la tabla, es muy complicado encontrar una explotación libre de tratamiento hormonal puesto que muchas vacas tienen fallos reproductivos por distintos motivos y se hace necesario aplicarles tratamiento para que se queden gestantes o al menos intentarlo.

Gráfico 1. Métodos reproductivos y de sincronización



■ GPG (Ovsynch) ■ Doble Ovsynch ■ Sin tratamiento

En la actualidad, existen muchos tipos de explotaciones, las grandes instalaciones con una densidad de animales muy alta sí implementan la sincronización sistemática, pero en explotaciones más reducidas optan por no tratar a las vacas hasta que éstas dan síntomas de aciclicidad o de infertilidad.

Eso se debe sobre todo al aspecto económico y de mano de obra que implica la sincronización sistemática. En la gráfica 1 se observa el porcentaje de uso de los 3 métodos principales reproductivos encontrados en las 5 explotaciones estudiadas.

Una vez expuesto el cómputo global de las cinco explotaciones hace falta mostrar explotación por explotación el tipo de tratamiento y cómo afectan éstos, al índice de fertilidad. Por eso el uso de tablas para determinar las inseminaciones negativas, hembra inseminada pero no gestante (Inseminación -) y positivas, gestante (Inseminación +) según el tratamiento y el índice de fertilidad, mostrado en porcentaje, que de éstas se extrae.

Tabla 2. Índice de fertilidad de la explotación 1

	Inseminación -	Inseminación +	% fertilidad
sin tratamiento	196	115	36,98
GPG (Ovsynch)	25	12	32,43
Doble Ovsynch	26	17	39,53

Tabla 3. Índice de fertilidad de la explotación 2

	Inseminación -	Inseminación +	% fertilidad
sin tratamiento	96	74	43,53
GPG (Ovsynch)	24	7	22,58
Doble Ovsynch	2	0	0

Tabla 4. Índice de fertilidad de la explotación 3

	Inseminación -	Inseminación +	% fertilidad
sin tratamiento	52	32	38,10
GPG (Ovsynch)	22	9	29,03
Doble Ovsynch	2	0	0

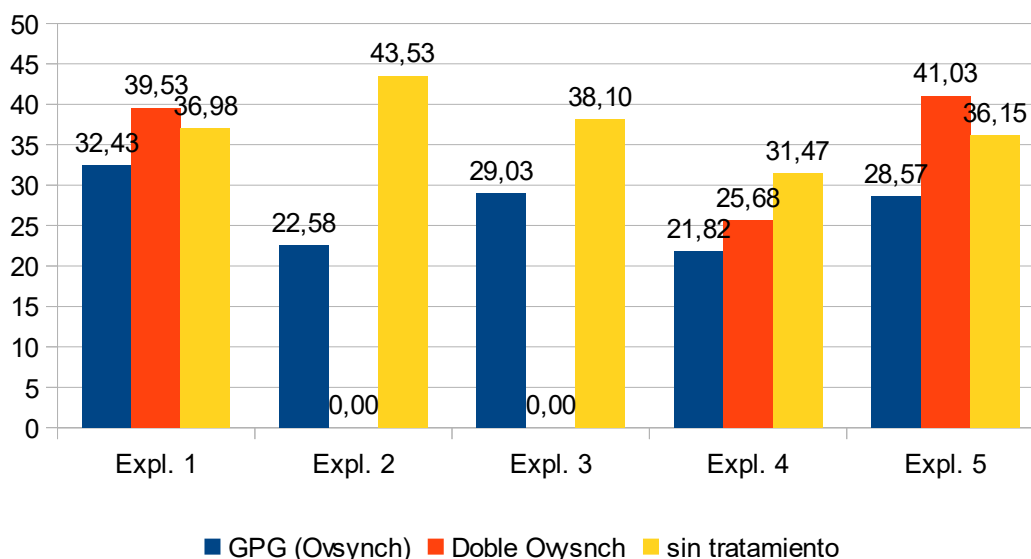
Tabla 5. Índice de fertilidad de la explotación 4

	Inseminación -	Inseminación +	% fertilidad
sin tratamiento	135	62	31,47
GPG (Ovsynch)	43	12	21,82
Doble Ovsynch	55	19	25,68

Tabla 6. Índice de fertilidad de la explotación 5

	Inseminación -	Inseminación +	% fertilidad
sin tratamiento	83	47	36,15
GPG (Ovsynch)	20	8	28,57
Doble Ovsynch	23	16	41,03

Gráfica 2. Porcentaje de fertilidad de los distintos métodos y explotaciones



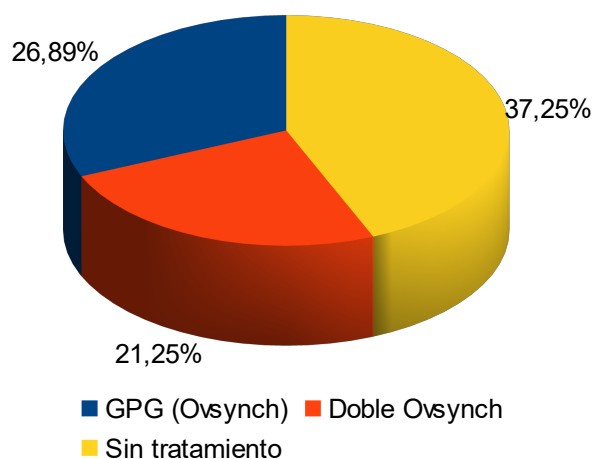
Con estos resultados acerca de la fertilidad según el tratamiento, y para crear un contexto para valorarlas, hay que mencionar que el índice de fertilidad cambia mucho de una explotación a la otra siendo que todas se localizan en una misma área geográfica. Todas las explotaciones pertenecen a una cooperativa que les puede proporcionar el pienso para su alimentación además de que cada una de ellas dispone del forraje necesario, propio o suministrado por terceros. Principalmente son de raza frisona pero las grandes diferencias residen en las instalaciones, tamaño de rebaño o manejo.

El uso de tratamientos hormonales para sincronizar no es equitativo en las diferentes explotaciones, puesto que en muchos casos se opta por no seguir ninguna sincronización sistemática, sino que se administra el tratamiento cuando una vaca no se queda gestante por problemas reproductivos puntuales.

El índice de fertilidad obtenido, sin tratamiento, en todas las explotaciones es el más elevado. Eso puede reflejar varias cosas; la principal es que el tamaño de muestra es mayor aumentando así la probabilidad de quedarse gestante.

Es decir, con un elevado tamaño de muestra para la opción sin tratamiento se aumenta la probabilidad que un mayor número de hembras se queden gestantes, pues existe el 50% de probabilidad (+ vs -) en contraposición a las muestras menos elevadas de las dos opciones restantes, pudiendo alterar el % fertilidad ya que no son equiparables los tamaños de muestra. Otra es la edad, siendo estas las más jóvenes, sin problemas reproductivos causados por la acumulación de ciclos productivos.

También influye mucho la calidad genética de las vacas, es decir, explotaciones que no invierten en semen de mayor calidad para los caracteres genéticos productivos. La habilidad del inseminador o las condiciones externas en el momento de la inseminación participan en gran medida del resultado, ya que en muchas explotaciones son los mismos ganaderos los que inseminan y en otros casos la lleva a cabo el veterinario. Otro de los aspectos a valorar es que las hembras con fallos reproductivos y no se quedan gestantes o aquellas que en sucesiones veces no quedan gestantes pueden necesitar un protocolo diferente al que se aplica para mejorar la fertilidad.



Gráfica 3. Fertilidad media de los tratamientos

El manejo sistematizado o el ambiente (estrés) de las explotaciones en el índice de fertilidad participan también en éste índice. Una lactación prolongada influyen también en la eficiencia reproductiva. El adecuado tiempo entre partos y la alimentación, sobretodo, la condición corporal y el estado sanitario del rebaño, son parámetros que también interfieren en la fertilidad.

Aún omitiendo todo los factores externos podemos extraer que las vacas sin tratamiento hormonal son las más fértiles (37.25%).

En uso del protocolo GPG (Ovsynch), obtenemos una proporción de individuos más homogénea, haciendo el tamaño de muestra más significativa respecto la comparación de resultados entre las distintas explotaciones. La fertilidad media es del 26,89%, obteniendo resultados bastantes dispares entre la que obtiene un mayor índice (32,43%) y la de menos (21,82%). En este método también influyen casi todos los condicionantes anteriormente comentados.

En cuanto al tratamiento a base de dos ciclos de GPG (Doble Ovsynch), su uso no está extendido puesto que es un tratamiento más prolongado y aún poco sistematizado. Aun así, los resultados obtenidos son los más satisfactorios, comparativamente y proporcionalmente, ya que las explotaciones que lo administran obtienen mayor número de inseminaciones positivas. La media asciende a 21,25%, pero tanto en la explotación 1 (39,53%) como en la explotación 5 alcanza el 41,03%, superando la media de sin tratamiento.

6. CONCLUSIONES

El uso de tratamientos hormonales tanto puntuales para tratar patologías reproductivas como su uso generalizado y sistemático para sincronizar todo el rebaño aporta grandes ventajas para una mayor eficiencia reproductiva de las vacas de producción lechera. Pero en términos generales y según he podido leer y observar en las explotaciones, para que exista una rentabilidad productiva global deben existir unas condiciones complementarias óptimas que ayuden a reflejar esa mejora.

Las conclusiones alcanzadas tras la elaboración de este trabajo han sido:

- La revisión bibliográfica nos permite entender y plasmar tanto la fisiología hormonal como las patologías reproductivas, mostrando como estos dos conceptos afectan a la fertilidad. Hemos sintetizado además los protocolos de sincronización más utilizados.
- A nivel de campo realizado hemos determinado la existencia y uso de dos tipos de protocolos de sincronización que se usan habitualmente en las explotaciones estudiadas. Éstos son el GPG (Ovsynch) y Doble Ovsynch.
- No hemos podido determinar el alcance de las mejoras en la fertilidad. Los resultados obtenidos no son significativos ya que no hemos podido comparar de manera individualizada y detallada los cambios que producen estos tratamientos.

Refiriéndonos a la última de nuestras conclusiones me gustaría destacar que los datos recopilados son de carácter general del control reproductivo de las distintas explotaciones, sin tener en cuenta: muestras representativas, edad de los individuos, genética, condición corporal, manejo y ambiente. Para poder determinar significativamente y comparar la incidencia de los tratamientos hormonales en la fertilidad habría que haber estudiado, con un tamaño de muestra homogénea y representativa.

La existencia de tres grupos: uno control (sin tratamiento) y otros dos con el protocolo GPG (OvSynch) y Doble OvSynch respectivamente, con un tamaño de muestra igual y sobretodo en unas condiciones idénticas, tanto intrínsecas como sobretodo extrínsecas al animal, lo hubiera permitido.

Aún no obteniendo resultados significativos, podemos decir que el uso de tratamientos hormonales para la sincronización del vacuno lechero permite al ganadero organizar su explotación más eficientemente, obteniendo mayor coordinación con los veterinarios y con su personal para optimizar la rentabilidad de la explotación puesto que los sistemas informáticos, junto con sistemas de detección de celo (podómetros) y los métodos hormonales permiten predecir en todo momento en qué fase del ciclo reproductivo se encuentra cada vaca de su explotación y por tanto aumentar su rendimiento productivo.

6.1 CONCLUSIONS

The use of both specific hormonal treatments to treat reproductive diseases and their widespread and systematic use to synchronize the entire herd provides great advantages for a greater reproductive efficiency of dairy cows. However, in general terms and as I have been able to read and observe where in farms, for a global productive return to exist, optimal complementary conditions that help reflect that improvement must be allowed.

The conclusions reached after the elaboration of this work have been:

- The literature review allows us to understand and capture both hormonal physiology and reproductive pathologies, showing how these two concepts affect fertility. We have also synthesized the most used synchronization protocols.
- At the field level we have determined the existence and use of two types of synchronization protocols that are commonly used in the farms studied. These are the GPG (OvSynch) and Double OvSynch.
- We have not been able to determine the extent of the improvements in fertility. The results obtained are not significant since we have not been able to compare the changes produced by these treatments individually and in detail.

Referring to the last of our conclusions I would like to emphasize that the data collected are of a general nature of the reproductive control of the different farms, without taking into account: representative samples, age of the individuals, genetics, body condition, management and environment. To be able to significantly determine and compare the incidence of hormonal treatments on fertility, we should have studied, with a homogeneous and representative sample size.

The existence of three groups: one control (no treatment) and two others with the GPG protocol (OvSynch) and Double OvSynch respectively, with an equal sample size and above all in identical conditions, both intrinsic and above all extrinsic to the animal, would have permitted.

Still not obtaining significant results, we can say that the use of hormonal treatments for the synchronization of dairy cattle allows the farmer to organize their exploitation more efficiently, obtaining greater coordination with veterinarians and their staff to optimize the profitability of the operation since the systems computer systems, along with heat detection systems (pedometers) and hormonal methods allow to predict at all times in which stage of the reproductive cycle is each cow of his farm and therefore increase their productive performance.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo ha sido una experiencia gratificante, sobretodo la parte práctica de recogida de datos en las distintas explotaciones, es decir, el trabajo de campo y como la farmacología puede ayudar a un sector muy presionado en el aspecto económico y productivo. Me alegra haber escogido este trabajo por mi cuenta y aportar datos de campo y entender mejor la dinámica de la reproducción en el bovino lechero que es, principalmente, mi objetivo a la hora de integrarme en el mundo laboral.

La parte más tediosa, como podéis adivinar, ha sido la revisión bibliográfica puesto que la mayoría está escrita en inglés, multiplicando exponencialmente el tiempo y esfuerzo realizado, también mencionar que existe mucha información de trabajos realizados por otros estudiantes de todo el mundo que facilita el entender y ordenar un trabajo como éste.

Asumo y expongo que este trabajo se queda corto a la hora de analizar de una manera individualizada la capacidad de los tratamientos hormonales de paliar problemas reproductivos así como, de la mejora en la fertilidad con la sincronización. Hemos intentado mostrar el día a día de las explotaciones lecheras y como los tratamientos hormonales influyen.

Este trabajo tampoco a podido plasmar los diferentes factores que influyen en la capacidad reproductiva del vacuno de leche, puesto que no se incluyen datos acerca de la nutrición, manejo, ambiente, etc. ya que sería un trabajo muy extenso y laborioso.

Soy consciente que puesto que es el primer trabajo de estas características que llevo a cabo en esta carrera y obviamente nos falta metodología para realizar-los. Espero que en su conjunto haya sido ilustrativo e interesante para las personas que lo vayan a leer.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad, N., Townsend, E. C., Dailey, R. A., Inskip, E. K. (1997). Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Animal Reproduction Science*. 49(1),13-28
2. Archbald L. F., Thatcher W. W., (1992). Ovarian follicular dynamics and management of ovarian cysts. *Large Dairy Herd Management*. Van Horn HH, Wilcox CJ, eds. Am Dairy Sci Assoc, Champaign, IL.
3. Bartlett P. C., Ngategize P. K., Kaneene J. B., Kirk J. H., Anderson S. M., Mather E. C., (1986). Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology, and economic impact. *Preventive Veterinary Medicine*. 4(1),15-33
4. B.O.E. Nº 274. REAL DECRETO 2178/2004, de 12 de noviembre del 2004.
5. Brunner, M. A., Donaldson, L. E., Hansel, W. (1969). Exogenous Hormones and Luteal Function in Hysterectomized and Intact Heifers. *Journal of Dairy Science*. 52(11),1849-1954
6. Carrick, M. J., Shelton, J. N., (1967). The synchronization of estrus in cattle with proges- tagen-impregnated intra-vaginal sponges. *The Journal of the Society for reproduction and Fertility*. 14(1),21-32
7. Dziuk, J. K., Cook, P. J., Kaltenbach, C., Niswender, C., (1966). Control of heat in ewes by an implanted progestagen. *J.Anim. Sci*. 25(3), 922.
8. Erb R. E., White M. E., (1981). Incidence rates of cystic follicles in Holstein cows according to 15-day and 30-day intervals. *The Cornell Veterinarian*. 71(3),326.
9. Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Blanchard, T., Reeves, M., (1993). Serum urea Nitrogen and conception rate: the usefulness of Test Information. *Journal od dairy Science*.76(12),3742-3746
10. Fraga Escamilla, Eric. (2000). Pubertad en los animales domésticos. M.V.Z
11. Fricke, P. M., Shaver, Randy D. (2016). Manejando trastornos reproductivos en Vacas Lecheras. *Instituto Babcock. Universidad de Wisconsin*.
12. Garverick, H. Allen (1997). Ovarian Follicular Cysts in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*.80(5), 995-1004.
13. Ginther O. J., Wiltbank M. C., Fricke P. M., Gibbons J. R., Kot K., (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 55(6),1187-1194.

14. Gordon, Ian., (1996). Reproduccion controlada del ganado vacuno y bufalos. Editorial Acribia. *Zaragoza. España*
15. Ham, A., W., Cormack, D. H. (1975). Tratado de histología. *Interamericana*.
16. Hansel, W., Malven, P. V, Black D. L. (1961). Estrous Cycle Regulation in the Bovine. *Journal of animal Scienc.* 20(3), 621-625.
17. <http://docplayer.es/docs-images/26/8757998/images/22-0.png>
18. Jordan, E. R., Schouten, M. J., Quast, J. W., Belschner, A. P., Tomaszewski, M. A., (2002). Comparison of Two Timed Artificial Insemination (TAI) Protocols for Management of First Insemination Postpartum. *Journal of Dairy Science.* 85(4),1002-1008
19. Johnson, S. N., Spitzer, J. C. (2001). Estrus and pregnancy after synchrony with lutalyse in conjunction with Syncro-Mate-B. *Theriogenology.* 55(9), 1787-1795.
20. Kastelic J. P., Pierson R. A., Ginther O. J., (1990). Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology.* 34(3), 487-498.
21. Larson, J. E., Lamb, G.C., Stevenson, J. S., Johnson, S. K., Day, M. L., Geary, T. W., Kesler, D. J., DeJarnette, J. M., Schrick, F. N. and Areseneau, J. D. (2004). Synchronization of estrus in suckled beef cows using GnRH, prostaglandin F2a (PG), and progesterone (CIDR): A multi-location study. *J Anim Sci.* 82(1), 369.
22. López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J., Rutlant, J., López-Béjar, M., (2001). Persistent ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. *Theriogenology.* 56(4),649-659
23. López-Gatius, F., López-Béjar, M., (2002). Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after different GnRH and cloprostenol treatments. *Theriogenology.* 58(7),1337-1348
24. Lucy, M. C, Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L., Thatcher, W. W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of animal science.* 70(11), 3615-3626.
25. Macmillan, K.L., Thatcher, W. W. (1991). Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45(6), 883-889.

26. Macmillan, K. L., Peterson, A. J. (1993). A new intravaginal progesterone releasing device in cattle (CIDR-B) for oestrus synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of anoestrus. *Anim Reprod Sci.* 33(1-4), 1-25.
27. Martínez, M. F., Adams G. P., Bergfelt, D., Kastelic, J. P., Mapletoft, R. J. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Animal Reproduction Sciences.* 57(1), 23-33.
28. Mattos, R., Binelli, M., Thatcher, W. W., Baruselli, P. S., (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology.* 56(9),1451-1463.
29. McDonald, L. E. (1975). Veterinary endocrinology and reproduction. 2nd ed., *Lea and Febiger, Philadelphia.*
30. Mialot, J. P., Laumonnier, G., Ponsart, C., Fauxpoint, H., Barassin, E., Ponter, A. A., & Deletang, F. (1999). Postpartum subestrus in dairy cows: comparison of treatment with prostaglandin F2 α or GnRH+ prostaglandin F2 α + GnRH. *Theriogenology*, 52(5), 901-911.
31. Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C., Lopes, F., Mattos, R., Thatcher, W. W. (2000). Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin: cyclic versus anestrus cows. *J. Dairy Sci.* 83(1), 134.
32. Mugeravel, K., Yániz, J. L., Santolaria, P., López-Béjar, M., López-Gatius, F., (2003). Luteal activity at the onset of a timed insemination protocol affects reproductive outcome in early postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 60(3),583-593.
33. Murphy, M. G., Enright, M. J., Crowe, M. A., McConnell, K., Spicer, L. J., Boland, M. P., Roche, J. F. (1991). Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *Journal of the society for reproduction and fertility.* 92(2), 333-338
34. Nebel, R. L., Jobst, S. M. (1998). Evaluation of Systematic Breeding Programs for Lactating Dairy Cows: A Review. *Jornal of Dairy science.* 81(4), 1169-1174.
35. Odde KG. (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *Journal of Animal Science.* 68(3), 817-830.
36. Pursley, Jr; M.D. Mee; M.C.Wiltbank (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. *Theriogenology.* 44(7),915-923.

37. Pursley, J. R., Kosorok, M. R., Wiltbank, M. C. (1997). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.*80(2),301-306.
38. Pursley, J. R., Silcox, R. W., Wiltbank, M. C. (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*81(8),2139-2144.
39. Pursley, J. R., Stevenson, J. S., Garverick, H. A., Fricke, P. M., Kesler, D. J., Ottobre, J. S., Wiltbank, M.C., (2006). Treatment of Cycling and Noncycling Lactating Dairy Cows with Progesterone During Ovsynch. *Journal of Dairy Science.* 89(7),2567-2578.
40. Roche, J.F. (1974). Synchronization of oestrus and fertility following artificial insemination in heifers given prostaglandin F2 α . *Journal of the society for reproduction and fertility.*37(1), 135-138.
41. Roche, James F. (1976). Control of oestrus in cattle using progesterone coils. *Animal Reproduction Science.*1(2), 145-154.
42. Ryan, M., Roche, J. F., Austin, E. J., O'Rourke, M., Mihim, M., Diskin, M. G. (1999). Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *Journal of reproduction and fertility.*54, 61-71
43. Rosenberg, M., Kaim, M., Herz, Z., Folman, Y. (1990). Comparison of Methods for the Synchronization of Estrous Cycles in Dairy Cows. 1. Effects on Plasma Progesterone and Manifestation of Estrus. *Journal of Dairy Science.* *Journal of dairy science*, 73(10), 2807-2816.
44. Savio, J. D., Thatcher, W. W., Drost, M., Macmillan, K. L., Entwistle K. W. Schmitt, E. J., de la Sota, R. L., Morris, G. R. (1993). New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal Reproduction Science.* 33(1), 27-49.
45. Schmitt, E. J., Diaz, T., Drost, M., & Thatcher, W. W. (1996). Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of animal science*, 74(5), 1084-1091.
46. Senger, P. L. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Second revision edition.
47. Smith, M. W., Stevenson, J. S. (1995). Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F2 alpha and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *Journal of Animal Science.*73(12), 3743-3751.

48. Stevenson, J. S., Thompson, K. E., Forbes, W. L., Lamb, G. C., Grieger, D. M., Corah, L. R. (2000). Synchronizing estrus and(or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet and prostaglandin F with or without timed insemination. *J. Anim. Sci.* 78(7), 1747-1758.
49. Tenhagen, B. A., Drillich, M., & Heuwieser, W. (2000). Synchronization of lactating dairy cows with prostaglandin F₂ α : Insemination on observed oestrus versus timed artificial insemination. *Transboundary and Emerging Diseases*, 47(10), 577-584.
50. Thibault, C., GERARD, M., & Menezo, Y. (1975). Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *Journal of reproduction and fertility*, 45(3), 605-610.
51. Ulberg, L. C., Christian, R. E., & Casida, L. E. (1951). Ovarian response in heifers to progesterone injections. *Journal of Animal Science*, 10(3), 752-759.
52. Van Niekerk, C. H., Belonje, P. C. (1970). Post partum synchronization of the oestrous period of lactating Friesland cows with 6-methyl, 17-acetoxy-progesterone (MAP) and PMSG. II. Observations on ovarian abnormalities. *Journal of the South African Veterinary Medical*. 41, 47-51.
53. Vasconcelos J. L. M., Silcox, R. W., Lacerda, J. A., Pursley, J. R., Wiltbank, M. C. (1997). Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol Reprod*. 56,230
54. Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Rosa, G. J. M, Pursley, J. R., Wiltbank, M. C. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*.52(6), 1067-1078.
55. Wishart, D. F., Young, I. M. (1974). Artificial insemination of progestin (SC21009)-treated cattle at predetermined times. *Veterinary Record*.95(22), 503-508.
56. Yamada, K., Nakao, T., Nakada, K., Matsuda, G., (2001).Influence of GnRH analogue (fertirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. *Animal reproduction science*. 74(1),27-34
57. Xu ZZ, Burton L. J. (2000). Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F₂ alpha. *J Dairy Sci*. 83(3), 471-476.