

Capítulo XLII

Hormonas de la reproducción bovina

Juan Carlos Gutiérrez Añez, MSc

INTRODUCCIÓN

Se ha determinado que bajo condiciones ideales, una vaca tiene el potencial de producir una cría al año o un intervalo entre partos menor o igual a 12 meses. Para poder lograr este índice, las vacas deben concebir antes de los 100 días después del parto (Soto, 1998a). Sin embargo, las vacas en el trópico presentan una alta incidencia de anestro posparto que prolongan los intervalos parto celo y parto concepción, afectándose considerablemente la eficiencia reproductiva (González-Stagnaro *et al.*, 2003).

En la ganadería tropical, la alimentación de los bovinos se fundamenta principalmente en el recurso pastizal, el cual se encuentra sometido a cambios en cuanto a oferta y calidad ya que depende principalmente de la distribución de las lluvias como del manejo y características de los suelos (González-Stagnaro *et al.*, 1988). Durante la época seca, existe una situación más grave, en la cual disminuye considerablemente la oferta y calidad de los forrajes, llegando a ser crítico el aporte de nutrientes para cubrir los requerimientos del animal. Estas deficiencias nutricionales afectan negativamente la función hormonal y la reanudación de la actividad cíclica postparto (Jolly *et al.*, 1995; Roche *et al.*, 2000).

Otra característica de los sistemas doble propósito es el ordeño con apoyo y amantamiento del becerro. Esta condición contribuye marcadamente a retardar la aparición del primer celo postparto debido a la inhibición en la liberación de GnRH y LH por acción de los opioides endógenos, los cuales bloquean el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Wishnant *et al.*, 1986; Williams, 1990). La combinación de las deficiencias nutricionales con la presencia del becerro en los sistemas doble propósito, produce diferentes grados de anestro afectando la productividad y la rentabilidad del negocio ganadero.

Una de las herramientas más utilizada para el control del anestro postparto en climas tropicales ha sido el uso de hormonas; sin embargo, es importante recordar que el uso de los tratamientos hormonales en estos sistemas siempre debe ser secundario a los planes de mejoramiento general, como el manejo, la alimentación y la sanidad.

Por otra parte, es importante señalar que existe una tendencia a nivel mundial, principalmente en los países desarrollados de Europa, de prohibición de muchas de las hormonas utilizadas para manipular la reproducción bovina. Este aspecto debe ser considerado a futuro, si algún día se quiere llegar a satisfacer la demanda de estos mercados, en los cuales la importación de productos del ganado doble propósito posee un gran potencial debido a la producción ecológica de carne y leche a base de forrajes, lo cual es sumamente atractivo para estos países.

En el presente capítulo se consideran algunos aspectos básicos sobre la endocrinología reproductiva de la vaca y se mencionan las principales hormonas endocrinas que participan en la reproducción; aspectos que son necesarios dominar a la hora de implementar cualquier tratamiento hormonal. Finalmente, se mencionan algunas de las aplicaciones que las hormonas tienen en el mejoramiento reproductivo de las ganaderías doble propósito.

ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA. UNA REVISIÓN NECESARIA

Los procesos reproductivos de los mamíferos son regulados por una compleja y solo parcialmente conocida, cascada de actividades combinadas del sistema nervioso central (SNC), cierto número de tejidos secretores, tejidos diana u órgano blanco y diversas hormonas. El SNC recibe información del medio ambiente y del propio animal (señales externas: visuales, auditivas, olfativas, auditivas y táctiles) y la transmite, en la medida que es importante para la reproducción, a las gónadas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Hafez y Hafez, 2002). El hipotálamo y la hipófisis son estructuras que están estrechamente unidas a la parte ventral del cerebro. Ambas estructuras no se comportan solamente como productoras de hormonas, sino también como órganos blanco que crean un sistema de retroalimentación homeostático.

La mayoría de las hormonas regulan su propia tasa de secreción mediante un mecanismo de retroalimentación. En el hipotálamo, las neuronas endocrinas producen, como consecuencia de estímulos del SNC y del control hormonal interno, la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Clarke, 2002). Esta hormona es transportada a través del sistema porta hipotálamo-hipófisiario al lóbulo anterior de la hipófisis, donde estimula la secreción de la hormona folículoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) por las células gonadotrópicas de la hipófisis (Viscarra *et al.*, 1997). La FSH estimula el desarrollo de los folículos ováricos y la LH estimula la síntesis de androstenediona a partir del colesterol (Orisaka *et al.*, 2006). La androstenediona se convierte en testosterona, que se aromatiza en las células de la granulosa del folículo, bajo la influencia de la FSH a 17β estradiol (Roberts y Skinner, 1990).

El estradiol o estrógeno ejerce un efecto de retroalimentación positivo sobre el hipotálamo y la hipófisis aumentando la frecuencia de los pulsos de GnRH. Por encima de un cierto nivel umbral de estrógeno, el hipotálamo responde con una descarga de GnRH, la cual induce una liberación de LH que inicia la ovulación (Garverick y Smith, 1993). El otro efecto principal del estrógeno es la inducción de síntomas de celo. El celo representa los síntomas físicos y de comportamiento que indican al macho que la hembra está en su fase fértil y de aceptación de la monta (Garverick y Smith, 1993).

Las células de la granulosa producen también inhibina, de la cual no se conocen todos sus efectos, aunque recibió su nombre por su efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH por la hipófisis, por lo cual controla el desarrollo folicular (Glister *et al.*, 2006). Tras la ovulación, los restos del folículo se reorganizan en el cuerpo lúteo bajo la influencia de la LH; la cavidad del folículo se llena de vasos sanguíneos, las células aumentan de tamaño y se forma el cuerpo lúteo, el cual se constituye como órgano secretor de progesterona y oxitocina (Schams y Berisha, 2004).

La progesterona es esencial para el ciclo normal de la vaca y es la hormona responsable del mantenimiento de la gestación tras la concepción. Disminuye la descarga pulsátil de GnRH y por ello impide nuevas ovulaciones (Erb *et al.*, 1968); además, prepara el endometrio para la implantación del embrión en desarrollo, inhibe las contracciones de la pared uterina y juega un papel importante en la producción de interferon tau y en el reconocimiento de la gestación (Inskeep, 2004, Spencer *et al.*, 2007).

En caso que el ovocito liberado del folículo durante la ovulación no sea fertilizado, el animal no recibirá la señal de gestación por parte del embrión. Alrededor del día 16° después de la ovulación, el endometrio del útero no gestante liberará prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). La PGF_{2α} es luteolítica, lo que significa que inicia la regresión del cuerpo lúteo. Esto trae como consecuencia que la concentración de la progesterona en la sangre descienda como resultado de la regresión del cuerpo lúteo, desapareciendo el bloqueo ejercido por la progesterona sobre la liberación de la GnRH (Inskeep, 2004). Ello dará lugar al inicio de una nueva fase de desarrollo folicular que finalizará con la formación de un folículo preovulatorio. En condiciones normales, este patrón endocrino se repite hasta que la vaca queda gestante y se reanuda una vez que son dadas las condiciones después del parto.

HORMONAS DE LA REPRODUCCIÓN BOVINA

Sustancias fisiológicas, orgánicas y químicas sintetizadas y secretadas por glándulas endocrinas de la reproducción. Derivan principalmente de cuatro sistemas u órganos principales: núcleos hipotalámicos, lóbulos anterior y posterior de la hipófisis, gónadas (testículo y ovario, incluso tejido intersticial y cuerpo lúteo), útero y placenta.

Las hormonas reproductivas se agrupan según su estructura bioquímica, en glucoproteínas, polipéptidos, esteroides, ácidos grasos y aminas. Según su estructura química se dividen en: Proteínas, hormonas polipeptídicas con un peso molecular de 300 a 70.000 daltons, como la oxitocina, FSH y LH. Esteroides, derivados del colesterol con un peso molecular de 300 a 400 daltons, por ejemplo, testosterona, estrógeno y progesterona. Ácidos grasos, derivados del ácido araquidónico, con un peso molecular alrededor 400 daltons, por ejemplo, prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), y las Aminas, derivados de tirosina o triptófano, como por ejemplo, la melatonina.

Hormonas hipotalámicas

De origen hipotalámico nos interesa la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), decapeptido (10 aminoácidos) con peso molecular de 1183 daltons (Morgan *et al.*, 2006). Se sintetiza y se almacena en el hipotálamo basal medio. La GnRH proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las

señales neurales, se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema portal hipofisario para la liberación de FSH y LH de la hipófisis anterior. La secreción de las hormonas liberadoras hipotalámicas es modulada por los niveles de las hormonas secretadas en los órganos-blancos primarios y secundarios. En el caso del GnRH, el control de la secreción es hecho por las propias gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, como por la progesterona y el estradiol (en la hembra) y la testosterona (en el macho).

Debido al enorme mercado potencial para los tratamientos hormonales y las ventajas económicas de su aplicación, la industria farmacológica además del decapeptido natural ha desarrollado diversos análogos y agonistas (producidos artificialmente) de diversa potencia, como la busarelina sintética. La busarelina es 17 veces más potente que la GnRH natural debido a su menor tasa de degradación y mayor vida-media (mayor duración en circulación). Otro agonista de la GnRH, el fertirelin se obtiene por sustitución de aminoácidos en las posiciones tres, seis y nueve.

La GnRH ofrece soluciones para el control reproductivo del ciclo y en vacas con un definido problema de baja fertilidad, siendo amplia su aplicación clínica en la prevención de la mortalidad embrionaria, inducción de la ovulación en casos de disfunción ovárica y del anestro posparto, en el control del desarrollo folicular y en los programas de sincronización de la ovulación en conjunto con la PGF₂α (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Hormonas adenohipofisarias

El lóbulo anterior de la hipófisis, además de la prolactina que tiene que ver con la fisiología de la lactación, secreta dos hormonas gonadotrópicas, FSH y LH. Ambas son glucoproteínicas con un peso molecular de alrededor 32.000 daltons. Cada una de ellas consiste en dos diferentes subunidades, alfa y beta. La subunidad alfa (α) es común a la FSH y a la LH en una especie determinada, mientras que la subunidad beta (β) es diferente y otorga especificidad a cada gonadotropina.

La secuencia de aminoácidos de las subunidades α de LH y FSH, es igual en todas las especies (92 aminoácidos) pudiendo existir diferencias en el contenido de carbohidratos, mientras que las subunidades β difieren para cada especie, siendo la fracción responsable por las características biológicas e inmunológicas de la hormona. Las subunidades α y β libres no son biológicamente activas; tan solo los dímeros α - β son activos. La cadena β tiene entre 115 y 147 aminoácidos, dependiendo de la gonadotropina y de la especie.

La secreción de las gonadotropinas hipofisarias está bajo control de la GnRH hipotalámica, obedeciendo a una modulación *feedback* negativo por parte de los esteroides gonadales (estrógeno y progesterona en la hembra, testosterona en el macho). La secreción basal de FSH y LH es pulsátil, siendo interrumpida por un pico masivo de LH durante el estro, el cual es disparado por un pico de GnRH, ocasionado por la mayor liberación de 17 β -estradiol durante el proestro (*feedback* positivo).

Los agentes opiáceos exógenos causan disminución, tanto de la frecuencia como de los niveles o de los picos de secreción de LH. Este hecho puede tener importancia cuando se relaciona con el estrés y con la consecuente secreción de opioides endógenos; por ejemplo, durante los primeros días postparto por efecto del amamantamiento sobre la inhibición de la función reproductiva (Williams *et al.*, 1996).

La inhibina, hormona glicoproteica secretada por las células de Sertoli del testículo y por las células de la granulosa del ovario, causa inhibición específica sobre la secreción de FSH de la hipófisis.

Hormona Folículoestimulante (FSH). Promueve el crecimiento y la maduración del folículo ovárico o de Graff en la hembra. Esta no causa la secreción de estrógeno del ovario por sí sola, sino que necesita de la presencia de LH para estimular la producción de estrógeno. En el macho participa, junto con la testosterona, de la espermatogénesis.

Hormona Luteinizante (LH). Glucoproteína compuesta de una subunidad alfa y una beta con un peso molecular de 30.000 daltons y una actividad biológica de 30 minutos. Los niveles tónicos o basales de LH actúan en conjunto con la FSH para inducir la secreción de estrógeno del folículo maduro. LH induce la ovulación y mantiene el cuerpo lúteo; estimula junto con la FSH, la secreción de esteroides, tanto en el ovario (estrógenos en el folículo y progesterona en el cuerpo lúteo) como en el testículo (testosterona en las células de Leydig).

Gonadotropinas placentarias. La placenta de la yegua y de la mujer sintetizan gonadotropinas con características similares a las gonadotropinas hipofisarias. Estas gonadotropinas extra-hipofisarias son la gonadotropina coriónica equina (eCG), antes conocida como gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG). Esas hormonas actúan sobre las células gonadales de la hembra gestante estimulando la biosíntesis de las hormonas esteroidales. Las cadenas de hCG y eCG son mayores en número de aminoácidos al ser comparadas con las gonadotropinas hipofisarias. También poseen mayor contenido de carbohidratos, lo que les confiere vida media más prolongada (Cuadro 1).

Cuadro 1
Contenido de carbohidratos y vida media de las gonadotropinas

Hormona	Peso molecular	Glúcidos (%)	Ácido siálico (%)	Vida media (h)
LH	28.500	16	1-2	0,5
FSH	34.000	30	5	2
hCG	36.700	32	8,5	11
eCG	68.000	48	10,4	26

La eCG es una glicoproteína de vida media larga que tiene en la vaca un efecto similar al de FSH. Esta hormona es un polipéptido producida por las copas endometriales de la placenta de la yegua entre los días 35 y 150 de gestación. Aunque su acción es FSH (folículo estimulante), su actividad biológica es de carácter mixto, mayor efecto FSH y menor efecto LH que ejerce directamente sobre el ovario. La hCG muestra gran similitud con LH, desde el punto de vista estructural y fisiológico.

Hormonas neurohipofisarias

Las hormonas llamadas de la hipófisis posterior (neurohipófisis) difieren de las hormonas adenohipofisarias en que no se originan en la hipófisis, donde únicamente

se almacenan hasta su utilización. Las dos hormonas, oxitocina (secreción de leche y parto) y vasopresina (hormona antidiurética o ADH), se originan en el hipotálamo y son transferidas a la hipófisis posterior siguiendo la vía de los axones del sistema nervioso.

Oxitocina. Sintetizada en el núcleo supraóptico del hipotálamo es transportada por los axones de los nervios hipotalámicos, en pequeñas vesículas rodeadas de una membrana. Además se produce en el cuerpo lúteo. La secreción de oxitocina es estimulada vía neurogénica por el amamantamiento, ordeño, parto, dilatación cervical o vaginal o el estímulo clitoridiano, siendo la acetilcolina el modulador estimulante y la adrenalina y la noradrenalina los agentes inhibidores.

La acción principal de la oxitocina es la secreción de leche mediante contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos mamarios. Además se le atribuye un papel importante en la estimulación de las contracciones uterinas, que facilitan el transporte del espermatozoide en las vías genitales de la vaca. También se secreta durante el parto produciendo las contracciones uterinas necesarias para la expulsión del feto. El término “oxitócico” proviene del griego y significa “parto rápido”. Los estrógenos son necesarios para la acción de la oxitocina, pues estimula la síntesis de receptores para oxitocina; por tanto los estrógenos aumentan la respuesta del útero a la oxitocina. La progesterona, por su parte, inhibe la secreción de oxitocina, lo que explica que durante la gestación la respuesta del útero a la oxitocina está muy reducida.

El cuerpo lúteo también secreta oxitocina, estando involucrada en el proceso de luteólisis en la mayoría de mamíferos. La oxitocina ovárica se secreta sin neurofisina; tiene receptores en el endometrio y su acción estimula la biosíntesis de $\text{PGF}_2\alpha$. La síntesis de los receptores endometriales de oxitocina es estimulada por 17β -estradiol.

La adrenalina, secretada en el estrés, disminuye la bajada del leche al bloquear la acción de la oxitocina al inhibir su secreción en la neurohipófisis y posiblemente, por bloqueo de los receptores de la oxitocina en las células mioepiteliales. La oxitocina no tiene función aparente en el macho, sin embargo parece estar involucrada en el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino.

Hormonas gonadales y del tracto reproductor de la vaca

Estrógeno. Esteroides secretados por la teca interna del folículo ovárico es responsable del comportamiento sexual, características sexuales secundarias y posee un efecto anabólico. Los estrógenos derivan del ciclo-pentano-perhidro-fenantreno, poseen un núcleo esteroide formado de tres anillos con seis carbonos cada uno y un ciclo pentano. Existen diferentes preparados comerciales de estrógenos, que se diferencian en cuanto a su efecto farmacológico principalmente a su vida media o duración. Esta respuesta debe ser considerada cuando se administran en combinación con progestágenos en los programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), ya que la respuesta en la dinámica folicular variará de acuerdo al tipo de estrógeno utilizado, la dosis aplicada y el momento de la aplicación (al comienzo o al fin del tratamiento). Dentro de los diferentes tipos de estrógenos disponibles en el mercado se pueden citar:

- 17 Beta-Estradiol ($17\beta\text{E}$). Estrógeno natural, vida media muy corta (24-36 hrs)
- Benzoato de Estradiol (BE). Se caracteriza por ser de vida media corta (3 días)
- Valerato de Estradiol (VE). Tiene vida media larga, variando entre 7 a 9 días
- Cipionato de Estradiol (ECP®). Posee vida media muy larga, entre 10 a 12 días

Progesterona. Producida en el cuerpo lúteo del ciclo o de la gestación, aunque en algunas especies, se produce también en la placenta y en las glándulas adrenales. Su acción es mantener la gestación en las hembras preñadas (en la vaca casi durante toda la gestación, pues la placenta bovina secreta escasos niveles de progesterona). En una vaca cíclica, su acción principal es regular la duración del ciclo gracias a su efecto inhibidor del celo y de la ovulación. La progesterona natural tiene una vida media muy corta, apenas entre 3-4 minutos, lo que implica la necesidad de utilizar altas dosis. Una alternativa es imitar la fase luteal del ciclo, utilizando progestágenos o análogos de la progesterona, los cuales requieren dosis menores, sin producir efectos secundarios.

Prostaglandina F2 alpha ($\text{PGF}_2\alpha$). Los prostanoides son metabolitos obtenidos del ácido araquidónico a través de la vía metabólica conocida como ciclooxigenasa. Uno de ellos es la $\text{PGF}_2\alpha$, sustancia con actividad marcada sobre el control del ciclo estral. Estructuralmente es un ácido graso insaturado compuesto por 20 átomos de carbono. Contiene un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales. La $\text{PGF}_2\alpha$ se produce en el endometrio, siendo transportada por un mecanismo de contracorriente desde la vena uterina hasta la arteria ovárica, ejerciendo su acción específica o luteolisis sobre el cuerpo lúteo del ovario. También provoca contracciones uterinas favoreciendo el transporte de espermatozoides y el parto.

Se han producido análogos de $\text{PGF}_2\alpha$ natural o análogos sintéticos (tiaprost, cloprostenol, fenprostaleno), responsables de inducir la luteolisis hacia el final del diestro o durante la gestación (Adams, 2001). El cloprostenol es un análogo sintético de la $\text{PGF}_2\alpha$, que posee isomería óptica D y L, de los cuales, el isómero D es 3 a 4 veces más potente que el L porque tiene mayor afinidad por el receptor; provoca una rápida regresión del cuerpo lúteo, al mismo tiempo que estimula la musculatura uterina y la relajación del cérvix. La $\text{PGF}_2\alpha$ también se comercializa como sal de trometamina (Dinoprost). La única actividad útil que desarrolla la $\text{PGF}_2\alpha$ o sus análogos es la de inducir una luteolisis prematura y en consecuencia, una caída de los niveles de progesterona; al desaparecer el feed back negativo se reanuda una secuencia de eventos hormonales y ováricos que deben culminar en un celo ovulatorio.

PRINCIPALES APLICACIONES DE LA TERAPIA HORMONAL EN EL MEJORAMIENTO REPRODUCTIVO DE LAS GANADERÍAS MESTIZAS DE DOBLE PROPÓSITO

Son muchas las aplicaciones que tiene la terapia hormonal en el mejoramiento reproductivo de los rebaños de doble propósito. A continuación se presenta algunas de esas aplicaciones con las mayores implicaciones prácticas en estas ganaderías.

SINCRONIZACIÓN DEL CELO Y LA OVULACIÓN

Numerosos protocolos hormonales han sido evaluados en Venezuela y otros países para la sincronización del celo y la ovulación (Hernández *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 1998b; Geary *et al.*, 1998; De Ondiz *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005). Los mismos incluyen el uso de estrógenos, progesterona y progestágenos, prostaglandina F_{2α}, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), gonadotropina coriónica equina (eCG) o combinaciones de éstas.

Sincronización del celo con PGF_{2α}. Al momento de su administración se debe considerar que para poder ejercer su acción requiere de la presencia de un cuerpo lúteo funcional. La PGF_{2α} permite la sincronización del celo más no la de la ovulación. Es difícil predecir exactamente el momento de la ovulación después de su administración por lo que la inseminación o el servicio debe ser a celo detectado y no bajo el esquema de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

El tiempo que transcurre desde su inyección hasta el inicio del celo suele fluctuar entre 2 y 5 días y depende en cierta medida del estado de desarrollo del cuerpo lúteo, pero principalmente de la dinámica folicular o tamaño del folículo al momento del tratamiento. Por ejemplo, si al momento de colocar la PGF_{2α} se encuentra presente un folículo preovulatorio no atrésico, la expresión del celo y la ovulación se dará en menos de 48 horas; mientras que si se encuentra en etapa de desviación hacia la dominancia, éste requerirá del tiempo necesario para su desarrollo final y maduración; por lo tanto la expresión del celo puede variar entre 48 a 96 horas. Si la vaca se encuentra en etapa de reclutamiento de una nueva onda folicular, el tiempo para la expresión del celo puede demorar hasta 120 horas.

Sincronización del celo y la ovulación con progestágenos. La utilización de dispositivos intravaginales o subcutáneos para la administración de progestágenos representa un método sencillo y efectivo. La hormona presente en estos dispositivos es liberada en forma lenta y progresiva siendo absorbida por los tejidos adyacentes, pasando al torrente circulatorio y bloqueando el estro y la ovulación (Soto, 2001).

Estos productos actúan como un cuerpo lúteo exógeno, que igualmente inhibe la secreción de gonadotropinas y por lo tanto, el desarrollo folicular. Al retirar los tratamientos, cesa el bloqueo progesterónico sobre el hipotálamo, desencadenando la liberación de gonadotropinas y el inicio de un ciclo normal, ovulatorio y potencialmente fértil; la respuesta es válida, incluso en etapas tempranas del postparto lo que permite acortar los intervalos de anestro postparto en vacas doble propósito (Gutiérrez *et al.*, 2008), tanto en vacas multíparas como en las de primer parto (Gutiérrez *et al.*, 2006c).

Dentro de los dispositivos utilizados para el control del estro y disponibles en el mercado están los de colocación intravaginal como el CIDR® (Controlled Internal Drug Release, Pfizer) y las esponjas intravaginales de poliuretano (Pregnaheat-E®, Viateca). El primero es un dispositivo en forma de T, con un cordón de nylon revestido con un silástico no irritante, impregnado con 1,9 gr de progesterona sin estradiol; las esponjas Pregnaheat-E® están impregnadas con 250 mg de Acetato de Medroxi-progesterona (MAP; 6 α-methyl-17 α-acetoxy-pregne-4ene3-20dione). El tratamiento incluye una inyección de 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) al momento de colo-

car la esponja, más una posterior inyección de 1,0 mg de BE 24 horas después de retirado el dispositivo para inducir la oleada preovulatoria de LH.

Los tratamientos con progestágenos que incluyen estrógenos en el protocolo, permiten la sincronización de la ovulación y el establecimiento de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ganaderías doble propósito, con tasa de preñez similar a la obtenida al celo detectado. Esa respuesta permite prescindir de la detección del celo, que representa la principal limitante para el éxito de la IA (Gutiérrez *et al.*, 2006a).

El benzoato de estradiol, un estrógeno de vida media corta, al ser colocado el día 0 conjuntamente con el progestágeno, produce la atresia del folículo dominante y el reinicio de una nueva onda folicular 3 a 4 días de una manera bien sincronizada y regularidad en el efecto. Al retirar el dispositivo 7 a 8 días después todos los animales tendrán un folículo dominante, de buen tamaño, apto para responder a la inducción ovulatoria, la cual puede ser sincronizada mediante una dosis baja de estrógeno alrededor de 62 hr después del retiro del dispositivo (Gutiérrez *et al.*, 2006b). Existen otros análogos como los implantes sub-cutáneos auriculares del progestágeno Norgestomet (Crestar, Intervet) con 3 mg de Norgestomet más una solución inyectable que contiene 3 mg de Norgestomet + 5 mg de Valerato de Estradiol (VE), que es administrada el día de colocado el implante.

La asociación de VE + Norgestomet es capaz de inducir la atresia de todos los folículos presentes; no obstante, la emergencia de la nueva onda folicular ocurre más tardíamente y con mayor variación (comparada con el BE), debido a que el VE al poseer una vida media larga tiene una mayor duración del efecto. En vacas, la emergencia folicular ocurre de 4 a 6 días después del inicio del programa, mientras que en novillas donde la metabolización es más lenta, la emergencia ocurrirá 5 a 7 días después del inicio (Colazo *et al.*, 2005). Los animales cuya emergencia de la nueva onda se atrase más de 6 días, dispondrán de un tiempo menor para el crecimiento folicular después de retirado el dispositivo (9-10 días) o el diámetro del folículo dominante será menor que el indicado para una respuesta adecuada de inducción ovulatoria (Bo *et al.*, 1994). Al no haber la ovulación o al no ser sincrónica entre un animal y otro, el establecimiento de programas IATF (sin detección de celo) traerá como consecuencia una disminución en la fertilidad y en el éxito del programa. Por esa razón, se debe evitar la colocación de estrógenos de vida media larga como el valerato y cipionato de estradiol al inicio de los programas de sincronización con progestágenos.

Sincronización de la ovulación con GnRH y PGF₂α (Protocolo Ovsynch). El protocolo Ovsynch consiste en aplicar una dosis de 100 μg de GnRH el día 0, seguida de 25 mg de PGF₂α siete días más tarde; 48 horas después se administra una segunda dosis de GnRH, inseminándose de preferencia 24 después de la última inyección de GnRH en vacas mestizas *Bos taurus* x *Bos indicus* debido a que se alcanzan mejores índices de preñez que a las 16 horas (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Este protocolo se fundamenta en que la primera inyección de GnRH induce la liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH), favoreciendo la ovulación, luteinización o atresia de un folículo dominante e iniciando una nueva onda de crecimiento folicular (Diskin *et al.*, 2002). Siete días más tarde, la PGF₂α inyectada por vía intramuscular debe causar la regresión de todos los CL o folículos luteinizados. Si un CL resultó de la inyección inicial de GnRH, el in-

tervalo de 7 días usualmente provee suficiente tiempo para que el CL madure y sea sensible a la $\text{PGF}_2\alpha$ (Thatcher *et al.*, 1998). Una segunda inyección de GnRH 48 horas más tarde debería provocar la liberación de LH y la ovulación de un folículo dominante (Pursley *et al.*, 1995).

El protocolo Ovsynch ha sido utilizado con éxito en vacas doble propósito en anestro y buena condición corporal, al reportarse una tasa de preñez del 42% en vacas con IATF 24 horas después de la última inyección de GnRH (Gutiérrez *et al.*, 2005). Aunque el fundamento del método Ovsynch es inseminar a tiempo fijo todas las vacas, algunas de ellas exhibieron un celo prematuro antes de finalizar el tratamiento hormonal mostrando una fertilidad normal (Gutiérrez *et al.*, 2005). Inseminar estas vacas con celo prematuro además de permitir aumentar el número de vacas que resultan preñadas debido al tratamiento hormonal, permite una reducción en el costo de la preñez, si se toma en cuenta que las vacas detectadas en celo no reciben la subsiguiente inyección hormonal, disminuyendo el costo del tratamiento (Dejarnette *et al.*, 2001).

Prevención de la ovulación atrasada (tratamiento al momento del servicio)

El estrés se encuentra dentro de los problemas que se consideran que afecta la reproducción en la ganadería doble propósito. El estrés de cualquier tipo conlleva a la producción de cortisol, el cual puede interferir con el pico preovulatorio de LH, retrasando o impidiendo la ovulación. Las vacas doble propósito tienen la fertilidad comprometida debido a muchos factores; dentro de ellos, el estrés calórico juega un papel muy importante al ocasionar anestro verdadero (ausencia de la función ovárica), acortamiento del período de receptividad al macho (estros de corta duración), estros de poca o nula manifestación (falsos anestro) y una tasa elevada de mortalidad embrionaria en las épocas y zonas más calurosas (Pino y Goicochea, 2002).

En vacas repetidoras, se ha observado un atraso en la descarga de LH, lo que ocasiona alteraciones del celo y ovulación, a la vez que la fertilidad puede bajar (Singh *et al.*, 2005). Por esa razón, la GnRH y la hCG se han utilizado al primer servicio para estimular la descarga preovulatoria endógena de LH y la ovulación, siempre que su atraso o la disociación celo-ovulación sea causal del problema. Además, las asincronías hormonales durante el estro, relacionadas con la presencia de concentraciones sub-basales de progesterona en el plasma (P_4), producen un retraso en la ovulación e interfieren con la fertilidad de las vacas repetidoras (Gustafsson *et al.*, 1986).

El efecto beneficioso de la GnRH se produce siempre que exista un folículo maduro y se atribuye a que induce un pico preovulatorio de LH, lo que favorece una mayor precisión en el momento de la ovulación. El tratamiento debe coincidir con la inseminación y se recomienda una dosis reducida de 250 μg . La vía de administración más habitual es por inyección intramuscular, la cual es suficiente para originar concentraciones máximas de gonadotropinas en solo 90 minutos (González-Stagnaro y Gutiérrez, 2007). En este sentido, la GnRH el día de la inseminación mejora las posibilidades de una fertilidad exitosa en 6% al primer servicio y 7% en vacas repetidoras, induciendo la ovulación y la luteinización; sin embargo, un meta-análisis de los resultados señala incrementos de 12,5 y 22,5%, respectivamente. Se ha observado una correlación negativa en los análisis; cuanto más baja es la fertilidad en el rebaño tratado, más elevada será la tasa de incremento. Además, la GnRH post-tratamiento ha mos-

trado ser particularmente efectiva en condiciones de estrés térmico o pobre condición corporal (González-Stagnaro, 2007).

Prevención de la mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria precoz (MEP) que ocurre normalmente antes del día 25 post-servicio es uno de los principales causales de los servicios repetidos. Casi el 25% de los embriones bovinos se pierden en las tres primeras semanas de vida, conforme se acerca el momento del reconocimiento maternal y de la descarga de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (días 16-18 del ciclo). Es posible que la mayoría de esas pérdidas se deban a una luteolisis prematura que afecta la secreción de progesterona de un cuerpo lúteo viable, vital para el mantenimiento de la gestación (González-Stagnaro, 2007).

Administración de GnRH entre los días 11-13 después del servicio. Un tratamiento con $10 \mu\text{g}$ de GnRH entre los días 11-13 después de la IA parece prevenir la MEP, mejorando la tasa de supervivencia embrionaria en 11,6% entre la sexta y novena semana (72,5 vs 60,9% en testigos), lo mismo sucede al segundo servicio (85,1 vs 69,5%), asociándose con los menores niveles séricos de progesterona y largos intervalos entre celos (MacMillan *et al.*, 1986). Sin embargo, hay trabajos en donde la respuesta no ha sido satisfactoria al compararla con el grupo control, por lo que los resultados son poco concluyentes (Szenci *et al.*, 2006). De cualquier forma, la GnRH prolongaría la vida del cuerpo lúteo proporcionando el tiempo suficiente para que el embrión pueda desarrollarse y producir la bTP-1, una proteína anti-luteolítica que reconocería y mantendría la gestación en vacas. La bTP-1 favorecería la acción de un mecanismo inhibitorio de la sintetasa prostaglandina del embrión que bloquearía la descarga de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Thatcher y col., 1989). Para ello, la GnRH debería administrarse coincidiendo con el momento del reconocimiento de la gestación, 11-13 días después de la IA.

Administración de hCG al 5-7 día post IA. Hacia el día 5 del ciclo estrual, las células de la granulosa del folículo dominante de la primera onda folicular contienen receptores de LH, permitiendo que la hCG induzca la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo accesorio. Por esa razón, la administración de hCG 5-7 días después de la IA tiene el potencial de incrementar la secreción de progesterona durante la preñez temprana (Binelli *et al.*, 2001); su efecto positivo reside en la formación de cuerpos lúteos accesorios, lo que resulta en concentraciones elevadas de progesterona y en favorecer el ambiente uterino durante el reconocimiento materno de la gestación (Thatcher *et al.*, 1998).

La administración de 3,300 UI im de hCG el día 5 post-IA en vacas de alta producción indujo la formación de cuerpos lúteos accesorios, aumentó las concentraciones plasmáticas de progesterona y mejoró la fertilidad cuando se evaluó los días 28, 45 y 90 post-tratamiento (Santos *et al.*, 2001), especialmente en vacas que perdían CC al mes siguiente de la IA.

Suplementación con progesterona después del servicio. Las bajas concentraciones de progesterona en las fases tempranas del ciclo, producen fallas en el mantenimiento de la preñez (Green y col., 2005; Spencer *et al.*, 2007). Los embriones que se desarrollan en un ambiente con concentraciones adecuadas de progesterona produ-

cen grandes cantidades de interferón τ au, que es la señal embrionaria para el mantenimiento de la gestación y factor antiluteolítico en las vacas. Esto favorece la implantación y la preñez (Mann y Lamming, 2001; Mann *et al.*, 2006).

En un trabajo reciente en vacas lecheras que fueron suplementadas con una fuente externa de P_4 , mediante la colocación de un dispositivo intravaginal entre los días 3 y 10 después del servicio; la tasa de preñez fue superior en las vacas tratadas al ser comparadas con el grupo control (48% *vs* 35 %, respectivamente). Así mismo, el efecto fue más pronunciado en las vacas de primer y segundo parto (33% *vs* 51%, respectivamente) (Larson y col., 2007).

CONCLUSIONES

El uso de hormonas no sólo requiere de una adecuada comprensión de la fisiología y endocrinología reproductiva de la vaca; esta debe ir acompañado del manejo de aspectos básicos de farmacodinamia y farmacocinética hormonal; además del conocimiento de aspectos simples, pero que pueden ser la clave en el éxito o el fracaso del uso de una determinada hormona; como el conocer que principio activo es, cual es la vía de administración más indicada, dosis, conservación y manejo, etc., estas consideraciones permitirán el uso racional y apropiado de las hormonas.

Por otra parte, son muchas las aplicaciones e implicaciones prácticas que los tratamientos hormonales tienen en el mejoramiento reproductivo de los rebaños doble propósito. Sin embargo, su aplicación está supeditada a la implementación de un acorde programa de control y manejo de la reproducción. El primer paso en estos programas dirigido a la prevención y tratamiento de los problemas reproductivos, debe ser la adopción de cambios en el manejo general del rebaño; como por ejemplo, la alimentación y sanidad. Si estos cambios se manejan en forma óptima, los tratamientos hormonales no serán necesarios, por lo menos en gran parte del rebaño (≥ 75 %); en ese sentido la utilización de hormonas debe ser siempre secundaria a los planes de manejo y cuidado de los animales.

LITERATURA CITADA

- Adams H. 2001 Prostaglandins, related factors, and cytokines Section 4. Chap 21st pp 420-432 En: Adams HR Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th Edition. Iowa State University Press/Ames.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol 17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41:1555-1569.
- Binelli M, Thatcher W, Mattos R, Baruselli P. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56:1451-1463.
- Colazo M, Martínez GMF, Small JA, Kastelic JP, Burnley CA, Ward DR, Mapletoft RJ. 2005. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology* 63:1454-1468.
- Clarke IJ. 2002. Two decades of measuring GnRH secretion. *Reprod Suppl.* 59:1-13.

- Dejarnette JM, Salverson RR, Marshall CE. 2001. Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF 2α . *Anim Reprod Sci.* 67:27-35.
- De Ondiz A, Perea F, Cruz R, Portillo G, Soto E. 2002. Evaluación ultrasonográfica del crecimiento del folículo ovulatorio en vacas anestrícas mestizas cebú post-tratamiento con Norgestomet y eCG. *Arch Latinoam Prod Anim* 10:20-24.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Dom Anim Endocr* 23:211-228.
- Erb RE, Estergreen VL, Gomes WR, Plotka ED, Frost OL. 1968. Progesterone levels in corpora lutea and progesterone in ovarian venous and jugular vein blood plasma of the pregnant bovine. *J Dairy Sci* 51:401-410.
- Garverick HA, Smith MF. 1993. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9:223-247.
- Geary T, Whittier J, Downing E, Lefever D, Silcox R, Holland M, Nett T, Niswender G. 1998. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncromate-B® or the Ovsynch protocol. *J Anim Sci* 76:1523-1527.
- González-Stagnaro, C. 2007. Hormonoterapia en la clínica bovina. En: *Tratamientos hormonales en la reproducción animal. Cuadernos Científicos Girar 2. D González (ed). Ediciones Astro Data, S. A. Maracaibo-Venezuela* 2:25-42.
- González-Stagnaro C, Gutiérrez JC. 2007. Esquemas de tratamientos hormonales. En: *Tratamientos hormonales en la reproducción animal. Cuadernos Científicos Girar 2. D. González (ed). Fundación Girar. Ediciones Astro Data, SA. Maracaibo-Venezuela* 2: 43-60.
- González-Stagnaro C, Soto-Belloso E, Goicochea-Llaque J, González-Fernández R, Soto-Castillo G. 1988. Identificación de los factores causales y control del anestro, principal problema reproductivo en la ganadería de doble propósito. Premio Agropecuario Banco Consolidado. 99pp.
- González-Stagnaro C, Palomares R, Perea F. 2003. Control del ciclo en vacas y novillas en el medio tropical. En: *Bovis (Sincronización del celo para la inseminación artificial en ganado extensivo)* 115:3-67.
- Gustafsson H, Larsson K, Kindahl H, Madej A. 1986. Sequential endocrine changes and behaviour during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Anim Reprod Sci* 19:261-273.
- Gutiérrez JC, González R, Palomares R, Soto E. 2006a. Fertilidad de vacas mestizas de doble propósito tratadas con un progestágeno intravaginal más eCG en programas de inseminación artificial a tiempo fijo. III Jornadas Nacionales de Investigación en Reproducción Animal (JONIRA). Marzo, 6 al 9. Barquisimeto-Venezuela.
- Gutiérrez JC, Boscán JC, Montero M, Palomares R, Sandoval J Portillo G. 2006b. Dinámica folicular de vacas mestizas en anestro tratadas con un progestágeno intravaginal más eCG. III Jornadas Nacionales de Investigación en Reproducción Animal (JONIRA). Marzo 6 al 9. Barquisimeto-Venezuela.
- Gutiérrez JC, Palomares R, Aranguren J, González R, Portillo G, Soto E. 2006c. Efecto de los días postparto, predominio racial, número de partos y época del año sobre la respuesta reproductiva de vacas mestizas en anestro tratadas con un progestágeno intravaginal más eCG y PGF 2 . *Rev Cient FCV-LUZ XVI*.

- Gutiérrez JC, Palomares R, Sandoval J, De Ondiz A, Portillo G, Soto E. 2005. Uso del protocolo Ovsynch en el control del anestro postparto en vacas mestizas de doble propósito. *Rev Cient FCV-LUZ* 15:7-13.
- Gutiérrez JC, Palomares R, González R, Portillo G, Montero M, Rubio J, Hernández H, Soto E. 2008. Shortening Anoestrous Interval In Crossbred Dual Purpose Cows Using Progestagen Intravaginal Sponges plus eCG and PGF_{2α}. *Reprod Dom Anim* (In Press).
- Glister C, Groome NP, Knight PG. 2006. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *J Endocrinol* 188:215-225.
- Green MP, Hunter MG, Mann GE. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 88:179-89.
- Hafez ES, Hafez EB. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma ed. Mc Graw Hill. 33-60.
- Hernández H, Soto E, Villamediana P, Cruz R, Aranguren J, Castejón O. 1995. Evaluación de tratamientos del anestro postparto en vacas mestizas, factores que lo afectan. *Rev Cient FCV- LUZ*. 5:47-53.
- Inskeep K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci*. 82 (E-Suppl): E24-39.
- Jolly P, McDougall S, Fitzpatrick L, Macmillan K, Entwistle K. 1995. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. *J Reprod Fertil Suppl*. 49:477-492.
- Larson S, Butler WR, Bruce Currie W. 2007. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 102:172-179.
- Macmillan KL, Taufa VK, Day AM. 1986. Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (buserelin) in cattle III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Anim Reprod Sci* 11:1-10.
- Mann GE, Fray MD, Lamming GE. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J*. 171:500-3.
- Mann GE, Lamming GE. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121:175-180.
- Morgan K, Sellar R, Pawson AJ, Millar RP. 2006. Bovine and ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-II ligand precursors and type II GnRH receptor genes are functionally inactivated. *Endocrinology* 147:5041-5051.
- Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S, Yoshida Y, Kotsuji F. 2006. Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. *Biol Reprod* 75:734-740.
- Pino D, Goicochea J. 2002. Efecto del medio tropical sobre la salud y la actividad reproductiva en la ganadería de doble propósito. En: *Avances en la Ganadería de Doble Propósito*. C. González-Stagnaro, E. Soto Belloso, L. Ramírez Iglesia (eds). Fundación Girarz. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. XXIV:355-370.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 44:915-923.

- Rensis F, Scaramuzzi R. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 60:1139-1151.
- Roberts AJ, Skinner MK. 1990. Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell-granulosa cell interactions. *Endocrinology* 127:2918-2929.
- Roche J, Mackey D, Diskin M. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci.* 60-61:703-712.
- Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121:745-751.
- Santos JE, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci* 79:2881-2894.
- Singh B, Saravia F, Båge R, Rodríguez-Martínez H. 2005. Pregnancy Rates in Repeat-breeder Heifers Following Multiple Artificial Inseminations during Spontaneous Oestrus. *Acta Vet Scand* 46:1-12.
- Soto, E. 2001. Mejora reproductiva mediante el control hormonal de la actividad ovárica postparto en vacas mestizas de doble propósito. En: *Reproducción Bovina*. C González-Stagnaro (ed). Fundación Girarz. Maracaibo-Venezuela 20:325-331.
- Soto E, Portillo G, Soto G. 1998a. Avances en el manejo reproductivo de la vaca problema en ganadería de doble propósito. En: *Mejora de la ganadería mestiza de doble propósito*. C. González, E. Soto, N. Madrid (eds). Fundación Girarz. Edic Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela XXII:427-442.
- Soto E, González R, Portillo G, Ramírez L. 1998b. Uso de los dispositivos intravaginales CIDR para el tratamiento del anestro en vacas mestizas doble propósito. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 8:84-86.
- Schams D, Berisha B. 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. *Reprod Domest Anim* 39:241-251.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev.* 19:65-78.
- Szenci O, Takács E, Sulon J, De Sousa NM, Beckers JF. 2006. Evaluation of GnRH treatment 12 days after AI in the reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 66:1811-1815.
- Thatcher W, Moreira F, Staples C, Risco C, Díaz T, Ambrose D, Adams A. 1998. Fisiología y endocrinología de la reproducción para mejorar la eficiencia reproductiva en el ganado bovino. En: *Mejora de la ganadería mestiza de doble propósito*. C. González-Stagnaro, N. Madrid-Bury y E. Soto-Belloso (eds). Edic Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. XXIII. 443-480.
- Thatcher WW, Hansen PJ, Gross TS, Helmer SD, Plante C, Bazer FW. 1989. Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil Suppl.*; 37:91-99.
- Viscarrá JA, Wettemann RP, Braden TD, Turzillo AM, Nett TM. 1997. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology* 138:594-601.

Whisnant C, Kiser T, Thompson F, Barb C. 1986. Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. *J Anim Sci* 63:1445-1448.

Williams GL. 1990. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: A review. *J Anim Sci* 68:831-852.

Williams G, Gasai O, Guzman G, Stanko R. 1996. Mechanisms regulating suckling mediated anovulation in the cow. *Anim Reprod Sci* 42:289-297.