

EFFECTO DE LA OVULACIÓN DEL FOLÍCULO DOMINANTE DEL DÍA 7 Y 13 DEL CICLO ESTRUAL CON PGF_{2α} SOBRE LAS TASAS REPRODUCTIVAS EN VACAS

Luis Champa O.¹, Víctor Leyva V.², Luis Mendoza Y.¹, José Camacho S.³
y Milder Ayón S.⁴

ABSTRACT

The effect of inducing ovulation of the dominant follicle on days 7 and 13 of the estrous cycle with PGF_{2α} analogous (dinoprost) on cow reproduction rates

PGF_{2α} analogous (dinoprost) was administered (30 mg i.m.) to 14 postpartum cows on days 7 (PGD7) and 13 (PGD13) of the estrous cycle (day of heat = 0) in order to induce growth and ovulation of the dominant follicles during the first and second follicular waves, as well as to study the effect on heat onset, timing and pregnancy rate. Immediately after PGF_{2α} administration, a "heat mount detector" (HMD) was placed at the base of the tail of each animal. A control group of 14 cows, which did not receive the PGF_{2α}, provided comparative pre-treatment and pregnancy rate data. Visual heat detection was conducted at 3 hour intervals between 6:00 and 00:00; and recorded by HMD between 00:00 and 6:00 am. Heat incidence was greater during daylight hours (81% prior to treatment $p < 0.05$ and 88% after $p < 0.01$) than during the night. Although heat frequency was similar for PGD7 (85.7%) and PGD13 (78.6%), it occurred earlier ($p < 0.01$) and with greater regularity in PGD7 (53.2 ± 6.9 hours) than in PGD13 (74.6 ± 22.9 hours). These results were not affected by calving season. Half the of cows ($n=7$) in each group failed to return to heat by day 25 post A.I., indicating possible gestation, but pregnancy rate subsequently diminished due to embryo mortality, most notably in PGD13. These results indicate that PGF_{2α} induced regression of the corpus luteum on day 7 of the estrous cycle and subsequent stimulation (erhile rising progesterone levels) of growth and ovulation of the dominant follicle of the first follicular wave, produced earlies onset and reduced variability of heat between the cows tested.

Key words: Follicular waves, dominant follicle, estrus, prostaglandin.

RESUMEN

Se formaron dos grupos de vacas primíparas cada uno, y que parieron entre setiembre y diciembre para recibir 30 mg i.m. de PGF_{2α} análoga (dinoprost), el día 7 (PGD7) y 13 (PGD13) del ciclo estrual (día del celo = 0) para inducir el crecimiento y ovulación del folículo dominante de la primera y segunda onda folicular y estudiar sus efectos sobre la incidencia de celo, intervalo tratamiento-celo y tasa de preñez. Tras la aplicación de PGF_{2α} se colocó un parche detector de celo (PDC) detrás de la base de la cola. Un grupo control (14 animales) recibió 0 mg de PGF_{2α} y se usó para comparar la incidencia y distribución de celo durante el día, el intervalo parto-celo y la tasa de preñez. El control de celos fue cada 3 horas entre 06:00 y 24:00 horas. Los celos entre 00:00 y 06:00 horas fueron detectados con el PDC. La mayoría de celos ocurrieron durante las horas de luz (antes del tratamiento, 81%, después del tratamiento, 88%) que durante la noche ($p < 0.05$

¹ Práctica privada

² Laboratorio de Reproducción- FMV-UNMSM

³ Laboratorio de Producción Agropecuaria - FMV - UNMSM

⁴ Laboratorio de Fisiología - FMV - UNMSM

y $p < 0.01$, respectivamente). No hubo diferencia en la incidencia de celo entre PGD7 (85.7%) y PGD13 (78.6%) pero éste ocurrió más tempranamente ($p < 0.01$) y con menor variabilidad en PGD7 (53.2 ± 6.9 horas) que en PGD13 (74.6 ± 22.9 horas), no encontrándose influencia del mes de parición. La tasa de no retorno antes de los 25 días (posible gestación) fue similar (50%) en los tres grupos, más el porcentaje de preñez fue reducido por la mortalidad embrionaria, especialmente en PGD13. Estos resultados sugieren que la inducción del crecimiento y ovulación del folículo dominante de la primera onda folicular (expuesto a niveles crecientes de progesterona) por destrucción del cuerpo lúteo con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 7, determinó la ocurrencia más temprana de celo y con menor variabilidad entre vacas.

Palabras clave: Ondas foliculares, folículo dominante, celo, prostaglandina.

INTRODUCCIÓN

Una de las mayores limitaciones en la eficiencia reproductiva en bovinos lecheros es la detección de celo a destiempo, comprometiéndose el intervalo inseminación artificial-ovulación (Rajamahendran *et al.*, 1988; Heuwieser *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la dinámica folicular ocurre en ondas, con el desarrollo de un folículo dominante que se ha señalado como posible responsable de la variabilidad en la sincronización de celo así como de la ocurrencia de la ovulación (Savio *et al.*, 1988; Ginther *et al.*, 1989). En base a estos conceptos se han desarrollado varios protocolos dirigidos a mejorar la eficiencia reproductiva. Deaver *et al.*, (1986), aplicando $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 6 del ciclo estrual en ovejas obtuvo una ocurrencia de celo y ovulación más tempranamente y con menor variabilidad, atribuyendo este hecho a una rápida pérdida del efecto inhibitorio de los niveles crecientes de progesterona.

En bovinos son escasos los estudios comparativos de los efectos de la inducción de la ovulación del folículo dominante de la primera y segunda onda folicular. De allí que en el presente experimento se buscó evaluar el efecto de inducir el crecimiento y ovulación del folículo dominante de la primera y segunda onda folicular aplicando $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los días 7 y 13 del ciclo estrual, respectivamente, sobre la variabilidad en la incidencia de celo, el intervalo tratamiento celo y la tasa de preñez. Asimismo, se hizo una evaluación del momento del día en que se presentaban las diferentes fases del celo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Establo Lechero Piamonte S.A.C., ubicado a la altura del Km 3.5 de la carretera a Huaran-gal, en el distrito de Carabayllo, Lima-Perú.

Manejo

Se seleccionaron 42 vacas de primer parto de la raza Holstein, cuyos partos ocurrieron entre los meses de setiembre y diciembre de 1999; 39 vacas tuvieron edades entre 24 y 25 meses; 2 vacas tuvieron 28 meses y una tuvo 35 meses, todas bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación (chala más concentrado).

Hormonas y detectores de celo

Se usó un análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dinoprost) para inducir la regresión del cuerpo lúteo formado a partir de la ovulación del folículo dominante del ciclo estrual post-parto seleccionado para el experimento. Se recurrió al uso de parches detectores de celo como complemento en la detección de celo. Estos parches contienen un colorante que aflora por presión externa y los tiñe, indicando que la vaca fue montada.

Diseño experimental

El diseño experimental se expone en la Figura 1.

El día en que se detectó el celo (post-parto o post-tratamiento) fue considerado como día 0 del ciclo estrual. Para la forma-

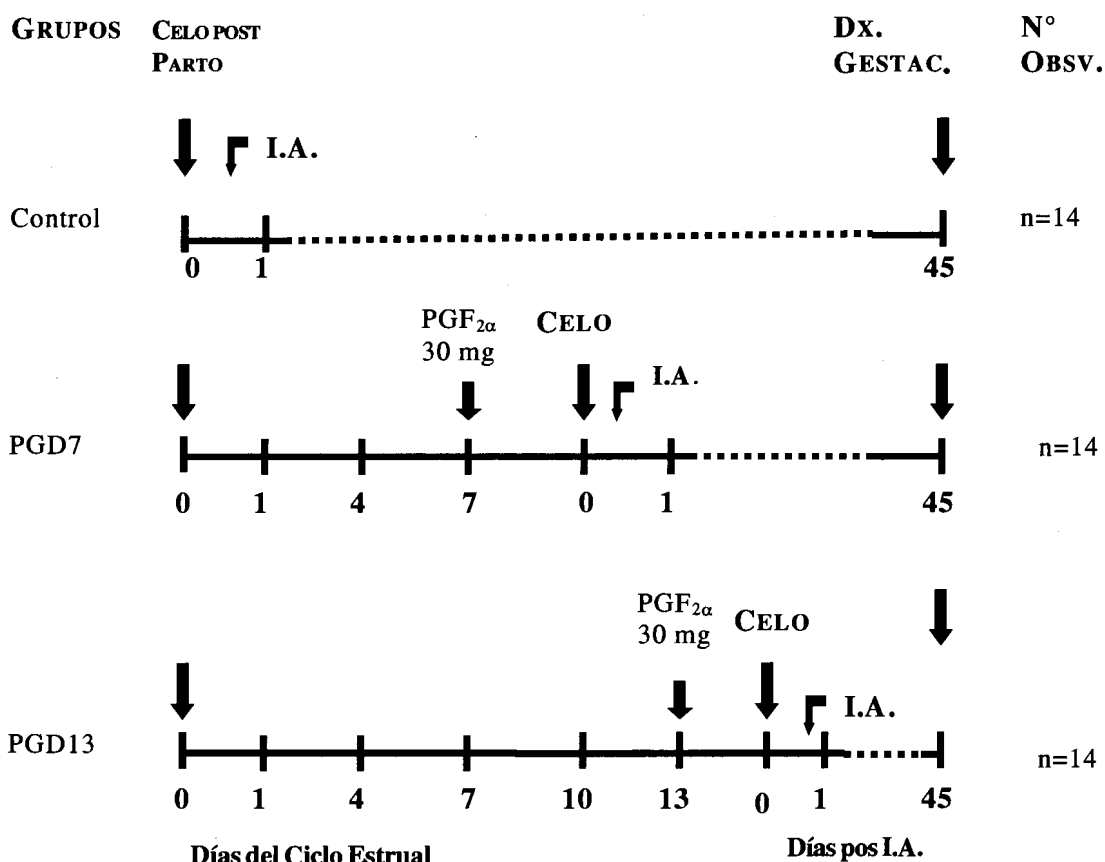


Figura 1. Diseño experimental

ción de los grupos se respetó la política de manejo post-parto del estable así como la práctica de la inseminación artificial en vacas en celo desde los 45 días post-parto y el análisis de estos resultados fue considerado dentro de la fase del pre-tratamiento. La fase de post-tratamiento fue establecida después de la administración de 30 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$

análoga i.m. a cada vaca de PGD7 en el día 7, y a cada vaca de PGD13, en el día 13. Los animales de control recibieron 0 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A todos los animales se les colocó un parche detector de celo inmediatamente después del tratamiento. La distribución de las vacas en los grupos experimentales según el mes de parición se muestra en la Figura 2.

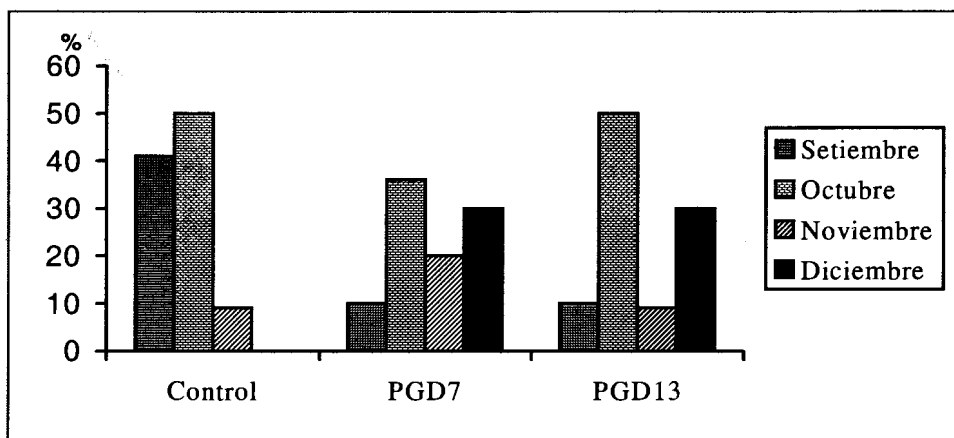


Figura 2. Distribución porcentual de los animales por mes de parición.

Detección de celo e inseminación artificial.

La observación de celo se realizó cada 3 horas desde 06:00 hasta 12:00 h. Los celos ocurridos entre 00:00 y 06:00 h. fueron detectados con los parches detectores de celo. La detección de celo se realizó en base a los siguientes eventos clínicos típicos del comportamiento sexual de las vacas descritos por varios autores (Boyd, 1984 y Lake, 1987, citados por Lehrer *et al.*, 1992):

Inicio del celo: Cambios conductuales como mugidos, desplazamientos continuos, estado de alerta, etc.

Inicio del "celo franco": Momento en que la vaca en celo intenta montar a sus compañeras.

"Celo franco": Cuando el animal en celo se deja montar.

La inseminación artificial fue realizada por el médico veterinario del establo a las 6.38 ± 4.49 horas después de detectado el celo.

Diagnóstico de preñez

Se realizó por palpación rectal entre los 45 y 63 días post-servicio.

Análisis estadísticos

Se empleó la tabla de contingencia de Chi cuadrado (χ^2) para evaluar la diferencia en la incidencia de celo, retorno de celo, la tasa de preñez y mortalidad embrionaria. El test de ANOVA fue utilizado para evaluar la diferencia en el intervalo parto-celo e intervalo tratamiento-celo.

Resultados

Se encontró que el 81% de los celos post-parto (antes del tratamiento) fueron detectados durante las horas luz del día ($p < 0.01$) y una menor proporción (19%) durante la noche. Similares resultados se obtuvo con el porcentaje de celos observados después del tratamiento (luz del día: 88%; noche: 12%) y no fueron influenciados por el tratamiento en diferentes días del ciclo.

Antes del tratamiento, el intervalo parto-primer celo de todas las vacas fue 52.12 ± 20.4 días y no hubo diferencia significativa entre los intervalos en relación a los meses de parición ($p > 0.05$); sin embargo, hubo una menor variabilidad entre las vacas paridas entre los meses de noviembre y diciembre, en comparación a las paridas entre setiembre y octubre (Cuadro 1). La mayoría de los

Cuadro 1. Intervalo tratamiento-celo (horas, $\bar{X} \pm DE$) en relación al mes de parición de las vacas tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 7 (PGD7) y 13 (PGD 13) del ciclo estrual

Mes de parto	PGD7	PGD13
Setiembre	$56.33 \pm 0.46^{a**}$	65.83 ± 42.89^b
Octubre	50.13 ± 4.65^a	77.13 ± 19.21^b
Noviembre	61.50 ± 14.14^a	107.15^*
Diciembre	51.62 ± 4.28^a	65.19 ± 14.44^b
Promedio	53.24 ± 6.92^a	74.56 ± 22.91^b

* Sólo hubo una vaca en PGD13

** Promedios con letras diferentes entre columnas son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

celos detectados durante el día, tanto en el pre como en el post-tratamiento, se detectaron entre 06:00 a 09:00 y 15:45 a 18:45 horas.

Después del tratamiento se observó que el porcentaje de celo en las vacas tratadas con PGF_{2α} en el día 7 del ciclo (PGD7=85.7%) no fue significativamente diferente de aquellas tratadas en el día 13 (PGD13=78.6%); sin embargo el celo ocurrió significativamente ($p<0.01$) más temprano y con menor variabilidad entre vacas, en el grupo PGD7 (53.24 ± 6.92) que en el grupo PGD13 (74.56 ± 22.91) después del tratamiento y este efecto entre grupos se mantuvo dentro de cada mes de parición.

La tasa de no retorno en celo antes de los 25 días post I.A. (posible gestación) fue similar (50%) entre los 3 grupos (Cuadro 2). No obstante, el retorno de celo después de los 25 días fue notorio, aunque sin diferencias significativas entre grupos (57%, 40% y 100% para Control, PGD7 y PGD13, respectivamente). La tasa de preñez fue de 33%, 30% y 0% en Control, PGD7 y PGD13, respectivamente. No se encontró diferencias entre animales no detectados en celo y entre aquellos con celo sucio después del tratamiento con PGF_{2α}. Se detectó 14.3% de quistes ováricos en las vacas Control y 0% en las vacas de PGD7 y de PGD13.

Cuadro 2. Comportamiento reproductivo de animales no tratados (Control) y tratados (PGD7 y PGD13=).

	Control	PGD7	PGD13
Vacas inseminadas	14	10	8
Vacas que no retornaron en celo antes de los 25 días	7 ^a	5 ^a	4 ^a
Vacas que retornaron en celo antes del dx. preñez	3 ^b	0 ^b	1 ^b
Vacas que retornaron en celo después del dx. Preñez	0 ^b	2 ^b	3 ^b
Vacas preñadas	4 ^a (33%)	3 ^a (30%)	0 ^a (0%)
No celo post-tratamiento	0	2 ^a (14.3%)	3 ^a (21.4%)
Celo sucio post-tratamiento	0	2 ^a (14.3%)	3 ^a (21.4%)
Quistes ováricos	2(14.3%)	0	0

Valores con letras iguales entre columnas no son significativamente diferentes.

* Una vaca control y otra de PGD7 vinieron en celo a los 23 y 11 días post-servicio, respectivamente y no se consideraron en el cálculo.

** No fueron inseminadas.

() Número de vacas preñadas o con alteraciones luego del tratamiento.

DISCUSIÓN

La observación de celos cada 3 horas permitió detectar a todas las hembras que exhibieron celo, siendo remota la probabilidad de no haber detectado en celo a 2 vacas de PGD7 y a 3 de PGD13, toda vez que se recurrió al uso de parches detectores de celo, por lo que se afirma que la eficiencia en la

detección de celo en el presente trabajo fue cercana al 100%, superior al rango de 38-51% reportado por Evaristo (1999) en aquellos establos que realizaban 4 a 5 observaciones al día. Se señala que, aparte de la deficiencia en la interpretación de los signos de celo, una de las causas de la deficiencia en la detección de los celos es la ocurrencia de un alto porcentaje de los celos por la no-

che (Cabrera, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo más del 80% de los celos se presentaron durante las horas luz del día, hallazgo compatible con lo encontrado por Calderón y Ortega (citado por Leyva, 1970) y con un 81,25% en bovinos de altura. (Leyva, 1970)

Del total de vacas que manifestaron celo franco en las horas luz del día, más del 80% fue detectado entre 06:00 a 09:45 y entre 15:45 y 18:50 horas. Estos resultados sugieren que el uso adecuado de un sistema de observación de celos reduciría los riesgos de fallas en la de detección de las vacas en celo. La incidencia de celo del 85.7% en PGD7 es similar al 80% obtenido por Godfrey *et al.* (1989) entre vacas y vaquillas tratadas con PGF_{2α} el día 8, pero mayor al 67% reportado por Savio *et al.* (1990b) en vaquillas tratadas el día 7 del ciclo. Es probable que el efecto de edad y número de parto sea el responsable de esta diferencia (Godfrey *et al.*, 1989).

Los resultados del presente estudio y de aquellos reportados en ovejas sugieren que la ocurrencia de celo es más tardía cuando la PGF_{2α} induce la regresión del cuerpo lúteo en estados avanzados de su desarrollo. En el día 7 del ciclo, el folículo dominante de la primera onda folicular y el cuerpo lúteo se encuentran en fase de crecimiento, próximos a alcanzar su máximo desarrollo (Ginther *et al.*, 1989); se observa asimismo un patrón similar en la secreción y actividad inhibitoria de la progesterona, mientras que en el día 13 el cuerpo lúteo se halla en su máximo desarrollo y secreta los niveles más altos de progesterona (Kastelic *et al.*, 1990; Alila y Dowd, 1991), ejerciendo su máximo efecto inhibitorio limitando el crecimiento del folículo dominante de la segunda onda folicular (Knopf *et al.*, 1989), el cual emerge entre los días 9 y 10 del ciclo estrual (Ginther *et al.*, 1989). La diferencia entre el menor efecto inhibitorio de la progesterona en el día 7 y el máximo en el día 13 del ciclo sobre el crecimiento folicular guarda relación con la inhibición de la secreción pulsá-

til de LH, menor hacia el día 7 y mayor hacia el día 13, lo que determinaría que el retorno pulsátil de la LH tras la aplicación de la PGF_{2α} en PGD7 ocurra más rápidamente que en PGD13, con una mayor producción de estrógenos por parte del folículo a ovular, lo que a su vez estimularía la ocurrencia del pico preovulatorio de LH, desencadenándose el proceso ovulatorio. Esto explicaría en parte la diferencia en la ocurrencia de celo temprano o tardío cuando el efecto inhibitorio de la progesterona es eliminado por inducción de la regresión del cuerpo lúteo con PGF_{2α} análoga.

El intervalo parto-celo fue de 52.12 ± 20.4 días, que es mayor al reportado por De La Torre (1973) en un hato experimental de Lima (29.66 ± 1.43). Esta diferencia podría atribuirse a que De La Torre hizo una evaluación de los intervalos parto-celo acontecidos a lo largo de dos años, sin hacer diferencias según la edad, el número de partos, ni razas, mientras que en el presente trabajo se empleó sólo vacas primíparas de la raza Holstein paridas entre setiembre y diciembre; además, no hubo influencia de la estación según el mes de parición, efecto que sí fue encontrado por Flores (1998) y Evaristo (1999).

Relacionando los resultados del diagnóstico de preñez entre los 45 y 63 días pos-I.A. y el porcentaje de no retorno antes de los 25 días post-servicio, se pudo observar un descenso marcado en el probable mantenimiento de la gestación, sobretudo en PGD13 (0%). La mortalidad embrionaria se reporta con frecuencia en vacas servidas después del parto (Zavy, 1994) y es probable que la mortalidad embrionaria haya sido el responsable de esta reducción.

El estrés de calor es señalado como uno de los responsables de la baja tasa de preñez (Badinga *et al.*, 1993; Zavy, 1994) y es probable que en el presente estudio este efecto se haya magnificado por el balance energético negativo del puerperio, que es señalado como un factor que afecta la fer-

tilidad en vacas lecheras (Beam y Butler, 1997). Recientes estudios encontraron que el estrés de calor, por mecanismos aún no bien entendidos, afecta el desarrollo folicular y por ende limita la producción de 17 β -estradiol, lo que compromete el proceso luteolítico y finalmente hay una fase luteal prolongada (Wolfenson *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1997). En base a estos resultados se puede inferir que el cuerpo lúteo formado a partir de un folículo estresado por el calor, luego que el oocito fue fertilizado, procederá a un desarrollo funcional y estructural anormal, comprometiendo más adelante la viabilidad del embrión.

El efecto del estrés de calor sobre la mortalidad embrionaria está bien documentado (Zavy, 1994) y ello ocurre en estadios tempranos del desarrollo embrionario (alrededor de los días 7 y 10), antes del periodo de reconocimiento maternal de la preñez (King y Thatcher, 1993); por tanto, se interfiere con la señal embrionaria para la permanencia del cuerpo lúteo y la preñez, y existe fuerte evidencia de que esto ocurrió en el presente estudio, sobretodo en PGD7 y PGD13, desde que la mayoría de vacas que retornaron en celo lo hicieron después de los 46 días post-servicio, entre los meses calurosos de enero y febrero.

Los resultados de quistes ováricos concuerdan con lo reportado por Savio *et al.* (1990a). Es probable que en las vacas que no presentaron celo post-tratamiento el cuerpo lúteo haya persistido. El número similar de animales con celo sucio (endometritis) luego del tratamiento en PGD7 y PGD13 contrasta con la ausencia de esta alteración en Control. Sin embargo al presente no existe evidencia del efecto de la prostaglandina sobre la incidencia de endometritis.

Se concluye que la aplicación de PGF_{2a} en el día 7 del ciclo estrual induce la ocurrencia de celo más tempranamente y con menor variabilidad que la aplicación de esta

hormona en el día 13, no observándose influencia del mes de parición.

LITERATURA CITADA

1. **Alila H.W. y J.P. Dowd. 1991.** The control of corpus luteum function. In Oxford Review of Reproductive Biology. Ed. Milligan S.R., Oxford University Press. England. p. 203-237.
2. **Badinga L.; W. Thatcher; T. Diaz; M. Drost y D. Wolfenson. 1993.** Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. Theriogenology 39:797-810.
3. **Beam S. y W. Buttler. 1997.** Energy balance and ovarian follicle development prior to the first postpartum ovulation in dairy cows receiving three levels of dietary fat. Biol. Reprod. 56:133-142.
4. **Cabrera D. 1998.** Momento de inseminación artificial y actividad ovárica post- servicio mediante determinación de progesterona en leche en la cuenca lechera de Lima. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. p. 83.
5. **Deaver D.R., N.J. Stilley, R.A. Dailley, E. K. Inskeep y P.E. Lewis. 1986.** Concentration of ovarian and pituitary hormones following prostaglandin F_{2a} - induced luteal regression in ewes varies with day of estrus cycle at treatment. J. Anim. Sci. 62: 422 - 427.
6. **De La Torre M. 1973.** Primer celo post-parto e involución uterina de bovinos lecheros en un hato experimental. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. p. 54.
7. **Evaristo, R. 1999.** Factores que afectan el intervalo parto-primer servicio en vacas lecheras de crianza intensiva. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. p. 59.

8. **Flores, M. 1998.** Efecto de la época de parto sobre el intervalo parto primer servicio y campaña láctea en vacas lecheras de la cuenca lechera de Lima. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. p. 68.
9. **Ginther, O.J., J. P. Kastelic y L. Knopf. 1989.** Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20:187-200
10. **Godfrey R. W., M. J. Guthrie, D. A. Neuendorff y R. D. Randel. 1989.** Evaluation of luteolysis and estrous synchronization by a prostaglandin analog (luprostiol) in Brahman cows and heifers. *J. Anim. Sci.* 67:2067-2074.
11. **Heuwieser, W., P. Ottenacu, A. Lednor y R. Foote. 1997.** Evaluation of different protocols of prostaglandin synchronization to improve reproductive performance in dairy herds with low estrus detection efficiency. *J. Dairy Sci.* 80 (11): 2766-2774.
12. **Kastelic J. P., D. R. Bergfelt y Ginther O. J. 1990.** Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33(6):1269-1278.
13. **King, G.J. y Thatcher C. 1993.** Pregnancy. In : *Reproduction in domesticated animals*. 2nd ed. p. 229-270. Ed. G.J. King. Elsevier Publishing Co. London.
14. **Knopf, L., J. P. Kastelic, E. Schallenberger y O. J. Ginther. 1989.** Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two waves hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endocrinol.* 6(2):111-119.
15. **Lehrer, A. R., G. Lewis y E. Aizinbud. 1992.** Oestrus detection in cattle: recent developments. *Anim. Reprod. Sci.* 28:351-361.
16. **Leyva, V. 1970.** Largo del ciclo estrual, duración de celo y tiempo de ovulación en bovinos criados en la altura. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. p. 36
17. **Rajamahendran, R., J. Robinson, S. Desbottes y J. Walton. 1988.** Temporal relationship among estrous, body temperature, milk yield, progesterone and luteinizing hormone levels and ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 31 (6): 1173-1180.
18. **Savio, J. D., L. Keenan, M. P. Boland y J. Roche. 1988.** Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.* 83: 663-671.
19. **Savio, J., M. Boland, N. Hynes y J. Roche. 1990a.** Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 88:560-579.
20. **Savio J., M. Boland, N. Hynes, M. Mattiacci y J. Roche. 1990b.** Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7. *Theriogenology* 33 (3):677-688.
21. **Wilson, S., R. Marion, J. Spain, D. Spiers, D. Keisler y M. Lucy. 1997.** Effects of controled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81: 2124-2131.
22. **Wolfenson, D., W. W. Thatcher, L. Badinga J. Savio, R. Meidan, B. Lew. R. Braw y A. Berman. 1995.** Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 52:1106-1113.
23. **Zavy M.T. 1994.** Embryonic mortality in cattle. In : *Embryonic mortality in domestic species*. 1st Ed. p. 99-139. Ed. Mitchell Zavy y Rodney Geisert. CRC Press Co. England.