

# Anestro posparto en vacas lecheras: tratamientos hormonales. Revisión



## Postpartum Anestrus in Dairy Cows: Hormonal Treatments. A Review

Morales, J.T.<sup>1</sup>; Cavestany, D.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Reducir el intervalo entre partos significa incrementar los ingresos por vaca y por año justificando la aplicación de técnicas de manejo reproductivo para acortar el anestro posparto o prevenir que éste se prolongue. Se habla de inducción del celo cuando se tratan animales en anestro con la finalidad de corregir esa situación. En los sistemas lecheros los tratamientos están basados en hormonas, las cuales aplicadas en el momento adecuado mimetizan los acontecimientos producidos en el ovario normal. Se debe tener en cuenta que en vacas en anestro siempre es necesario el uso de progesterona para estimular el sistema hipotálamo-hipofisario. Luego de esto sí se pueden utilizar las combinaciones de hormonas para llegar a la ovulación (GnRH, Estradiol, Prostaglandinas, eCG). En este trabajo se analizan y discuten los diferentes protocolos existentes para tratar el anestro posparto prolongado.

**Palabras claves:** anestro, inducción del celo, eficiencia

### SUMMARY

Reducing calving interval means increasing income per cow per year thus justifying intervention techniques to shorten prolonged postpartum anestrus through the use of different hormonal protocols. The induction of estrus refers when anestrus animals are treated with finality to correct this situation. In dairy systems treatments are based on hormones which mimic the events of a normal estrus cycle. Anestrus cows always require the use of progesterone to stimulate the hypothalamic-pituitary system. After this, combinations of hormones to reach ovulation (GnRH, Estradiol, prostaglandins, eCG) can be used. In this review we discussed different hormonal treatments for the extended postpartum anestrus.

**Keywords:** anestrus, induction of estrus, reproductive efficiency.

### INTRODUCCIÓN

Para lograr el mayor aprovechamiento del potencial productivo y genético de la hembra lechera es necesario que las vacas queden preñadas lo más pronto posible y que tengan un ternero por año; para esto debe estar preñada en los primeros tres meses luego del parto. Por lo tanto reducir el intervalo entre partos significa incrementar los ingresos por vaca y por año justificando la aplicación de técnicas de manejo reproductivo para llegar a ese fin.

La incidencia de anestro posparto prolongado ha ido en aumento a nivel mundial de 7% (Fagan y Roche, 1986) hasta un 38% (Opsomer y col., 2000; Lucy, 2001; Walsh y col., 2005; Wiltbank y col., 2007).

En Uruguay, trabajos que evalúan protocolos de inducción de celos han obtenido porcentajes de vacas en anestro con porcentajes de preñez que van de un 8% a un 47%, variando no solo entre año sino entre establecimientos (Cavestany, 2000a; Cavestany y col., 2003; de Nava, 2011). Estas incidencias justifican algún tipo de intervención en tratamiento y prevención (de Nava, 2011).

### Eficiencia reproductiva

Una buena eficiencia reproductiva implica lograr el mayor número de animales preñados en el menor tiempo posible (Cavestany, 2000b). El incremento en la producción de leche dado en los últimos años ha provocado cambios tanto fisiológicos como

de manejo en las vacas lecheras; dichos cambios han llevado a una reducción en la fertilidad del rodeo en general (Lucy, 2001), provocando que la eficiencia reproductiva sea cada vez más baja (García Bouissou, 2008; Walsh y col., 2011).

Para medir la eficiencia reproductiva se han desarrollado diferentes índices: los intervalos parto a primer servicio (IPS) y a concepción (IPC), intervalo entre partos (IEP), número de servicios por concepción (SC), porcentaje de detección de celos (%DC), porcentaje de concepción (%C) y porcentaje de preñez (%P) (Lemaire y col., 2012). La duración del anestro posparto puede afectar los índices reproductivos mencionados y por lo tanto estar determinando la eficiencia reproductiva de un tambo (Lucy, 2004; Peter y col., 2009).

### Fisiología del posparto

Para que una hembra pueda volver a quedar preñada deben ocurrir básicamente dos eventos: la involución del útero y la recuperación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O). La involución uterina ocurre normalmente 4 a 5 semanas después del parto Morrow y col., 1969). Algunos autores han encontrado una relación entre una involución uterina retardada y baja fertilidad. Zhang y col. (2010) reportaron que vacas que presentaban una involución uterina más rápida tenían un intervalo parto a primera ovulación (IPO) más corto que vacas que presentaron involución uterina retardada; esto coincide con lo ya encontrado por Kindahl y col. (1992). Melendez y col. (2004) observaron

<sup>1</sup>Doctor en Ciencias Veterinarias (DCV), Unidad de Lechería, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA La Estanzuela CC 39173 Colonia, Uruguay. Correo electrónico: jmorales@inia.org.uy

<sup>2</sup>DV, PhD, Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.

Recibido: 22/5/12 Aprobado: 5/9/12

que vacas con un menor tamaño del cuerno uterino presentaban mayor porcentaje de concepción.

La primera ovulación posparto refleja el reinicio de la actividad ovárica, siendo el retraso en el inicio de la ovulación y manifestación externa de celos un factor asociado a la reducción en el porcentaje de concepción. El IPO en vaca para leche sin restricciones alimenticias tiene una duración de entre 20 a 30 días (Canfield y Butler, 1990; Rajamahendram y Taylor, 1990; Tanaka y col., 2008).

De acuerdo con Macmillan y Day (1987), para desencadenar la secuencia de eventos que llevan al celo es necesario un período de exposición previa de  $P_4$  («priming») que estimula el eje H-H-O (Kyle y col., 1992). Esto se relaciona con el largo período anovulatorio y ciclos cortos que aparecen después de la primera ovulación en el posparto.

### Anestro posparto

El anestro es la ausencia de comportamiento estral en un período de tiempo esperado; es un evento fisiológico normal que tiene un promedio de tiempo, siendo bajo condiciones pastoriles 45 a 60 días (Gatica, 1993; Cavestany y col., 2001).

Actualmente el anestro se clasifica según la dinámica folicular y luteal, en:

**Tipo I:** emerge una onda folicular pero no existe desviación de los folículos; esta condición ocurre en menos del 10% de las vacas de un rodeo (Markusfeld, 1987) y es causada básicamente por una extrema subnutrición (Peter y col., 2009).

**Tipo II:** desviación y crecimiento de los folículos, con o sin folículo dominante (FD), seguido de atresia o regresión. En este caso o existe una baja pulsatilidad de LH o el folículo produce pocas concentraciones de  $E_2$  (Peter y col., 2009).

**Tipo III:** crecimiento y establecimiento de un FD pero éste no ovula, persistiendo en el ovario. Puede ser causado por que el hipotálamo esta insensible al feedback positivo del estradiol o por una respuesta alterada del folículo a las gonadotropinas (Peter y col., 2009).

**Tipo IV:** La vaca tiene ovulación, celo y formación de un cuerpo lúteo con una prolongada fase luteal (el cuerpo lúteo no sufre regresión). Muchas pueden ser las causas para esta condición: distocia, enfermedades en el primer mes de lactación, estrés, ovulación luego del parto (Peter y col., 2009), infecciones uterinas (Mateus y col., 2002) o piometra (Sheldon y col., 2006). Las vacas con este tipo de anestro podrían ser las llamadas «vacas fantasma», las cuales presentan una larga fase luteal (más de 4 semanas) a pesar de que no se detecta ningún embrión al día 30 pos inseminación artificial (IA) (Cavaleri y Macmillan, 2002).

### Factores que prologan el anestro posparto

En vacas para leche los principales factores que afectan el reinicio de la actividad ovárica son: balance energético negativo (BEN), pobre condición corporal (CC), paridad/edad, diferentes enfermedades, alta producción de leche y la estación (Bulman y Lamming, 1978; Markusfeld, 1987; Lucy, 2001; Roche, 2006; Wathes y col., 2007).

### Tratamientos hormonales para acortar el anestro posparto prologando

Los tratamientos de inducción del celo se realizan animales en anestro con la finalidad de: 1) controlar el desarrollo de las ondas foliculares, 2) promover la ovulación y 3) sincronizar el estro y/o la ovulación al final del tratamiento. Éstos tratamientos están dirigidos a aumentar la frecuencia de pulsos de LH y así permitir que el FD madure y ovule pero, como ya lo expresaron Peter y col. (2009), no existe un tratamiento único para el anestro posparto prolongado; se deben tener en cuenta todos los factores, mencionados anteriormente, que lo afectan.

A partir del conocimiento del control neuroendocrino del ciclo estral en las vacas, surgió la utilización de las hormonas que regulan ese ciclo con fines terapéuticos. Generalmente los tipos de anestro que se tratan con hormonas son los de tipo II y III («anestro superficial»), dado que animales en anestro tipo I («anestro profundo»), están generalmente en un BEN por lo tanto tienen pocas chances de respuesta a estos tratamientos (Cavestany, 2010).

Si se tiene en cuenta que vacas en anestro necesitan progesterona o progestágenos para estimular el sistema H-H-O, éstos pueden combinarse con hormonas que induzcan una nueva onda folicular y provoquen la ovulación del FD generado de ella (GnRH, Estradiol, Prostaglandinas, eCG) (Lucy y col., 2004; Cavestany, 2010).

**«Priming» de progesterona:** como se dijo anteriormente la utilización de  $P_4$  es necesaria si se quiere obtener una mejor fertilidad en vacas en anestro (Macmillan y Peterson, 1993). Con la utilización de  $P_4$  se busca imitar la fase luteal corta producida previo al reinicio de la actividad sexual cíclica posparto. La utilización de  $P_4$  mejora los porcentajes de preñez en animales inseminados artificialmente ya que ésta evita la formación de un cuerpo lúteo de vida corta (Breuel y col., 1993), por lo tanto, el cuerpo lúteo de la ovulación precedida por el tratamiento de  $P_4$  tendrá una actividad normal permitiendo el desarrollo y el mantenimiento de la preñez (Wiltbank y col., 2002).

Al cabo del tiempo se han desarrollado diferentes fuentes de  $P_4$  o progestágenos sintéticos: acetato de melengestrol (MGA, oral), su uso ha dado como resultado una baja calidad del oocito ya que se administra por un período muy prolongado de días (Odde, 1990); dispositivos intravaginales [esponjas con acetato de medroxiprogesterona (MAP) y dispositivos de silicona con  $P_4$ ] de diferentes formas y con diferentes concentraciones; soluciones inyectables (soluciones oleosas con diferentes concentraciones de  $P_4$ ).

La utilización de la  $P_4$  o progestágeno se realiza por 5 a 10 días (Diskin y col., 2002; Lucy y col., 2004; Baruselli y col., 2004), junto con alguna hormona (GnRH o estradiol) que produzca el recambio de una onda folicular. A la retirada de los implantes los animales deberán tener un FD con capacidad de ovular. Diskin y col. (2002) al igual que con Rhodes y col. (2003) sugieren que la tasa de éxito de los protocolos con progestágenos o  $P_4$  sola es variable (50% a 70%) ya que depende del intervalo parto a tratamiento y la causa del anestro.

**GnRH:** la GnRH es capaz de inducir la liberación de LH y causar la ovulación o regresión del FD, surgiendo una nueva onda folicular (Lucy y col., 1992). La dosis varía de 8 y 100  $\mu$ g dependiendo del principio activo de los mismos (Macmillan y col., 2003). Vacas que estén en anestro tipo III pueden ovular el FD y por lo tanto el protocolo GnRH - PGF2 $\alpha$  - inducirá el celo (Twagiramungu y col., 1992a, b), pero estas ovulaciones serán poco fértiles ya que ni el FD ovulado ni el cuerpo lúteo son normales, por lo tanto una suplementación con P<sub>4</sub> permitirá fertilidades tan buenas como el protocolo en vacas cíclicas (Twagiramungu y col., 1992a). También la GnRH es usada en tratamientos de ovarios quísticos (Garverick, 1997).

**Estradiol:** desde que Bó y col. (1995) reportaron que la utilización de implantes de progestágenos más 5 mg de estradiol (o sus esteres) producen atresia folicular y resurgimiento de una nueva onda folicular, los E<sub>2</sub> (al igual que la GnRH) se han utilizado en vacas en anestro para lograr un desarrollo sincronizado de la onda folicular, luego de una exposición a la P<sub>4</sub>. El agregar E<sub>2</sub> a los tratamientos con P<sub>4</sub> también permite la manifestación de estro en vacas anestro anovulatorios (Rhodes y col., 2003). Su acción en un ambiente con altas concentraciones de P<sub>4</sub> es reducir la secreción de LH induciendo atresia del FD y surgimiento de una nueva onda folicular, pero en ambientes con baja concentración de P<sub>4</sub> el estradiol induce la liberación de GnRH (por lo tanto de LH) que lleva a la ovulación o luteinización del FD. Los diferentes compuestos de estradiol (benzoato, valerato o cipionato) tienen diferente vida media en sangre aspecto a considerar en los tratamientos; pero sus efectos son similares a los de la GnRH (Lucy y col., 2004).

**Gonadotropina coriónica equina (eCG):** el objetivo de un tratamiento con eCG después de un período de tratamiento con P<sub>4</sub> es el de estimular el desarrollo folicular ovárico y la producción de estradiol (Rhodes y col., 2003). Al administrar a las vacas eCG provoca desarrollo y maduración folicular, ovulación y desarrollo viable del cuerpo lúteo (Duffy y col., 2004);

además produce cuerpos lúteos accesorios que mejorarían el mantenimiento de la preñez (Thatcher y col., 2002). Esta adición de eCG a los protocolos de control de anestro basados en P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> se ha informado como una herramienta útil para mejorar la fertilidad en razas indicas con un alto porcentaje de vacas acíclicas antes de los 60 días posparto (Baruselli y col. 2004), pero en vacas Holando hay menos trabajos publicados.

### Protocolos de inducción de la ovulación

Si se controla la fase folicular junto a la fase luteal se obtiene sincronía del celo y de la ovulación con fertilidad normal (Gregory y col., 2009). La fase luteal es controlada con la P<sub>4</sub>, y el desarrollo folicular e inducción de la ovulación es controlado por el estradiol o la GnRH (Alberio y Butler, 2001); a partir de esta premisa es que los protocolos para el tratamiento del anestro se basan en la combinación de estas hormonas.

**Progesterona y estradiol:** como se vio anteriormente la administración de estradiol al principio de los tratamientos con P<sub>4</sub> produce el desarrollo de una nueva onda folicular; si se quiere sincronizar la ovulación de esa nueva onda (y poder realizar IATF) se puede utilizar una segunda dosis de estradiol (Cavestany, 2010), logrando buenos porcentajes de concepción a la primer inseminación (Rhodes y col., 2003; McDougall, 2001) (Cuadro 1). En general los dispositivos intravaginales son asociados con BE o cipionato de estradiol (CPE).

Básicamente los protocolos de P<sub>4</sub> con estradiol son: día 0 se inserta el dispositivo de P<sub>4</sub> más 1 ó 2 mg de benzoato de estradiol (BE), al día 7 u 8 se retira el dispositivo y a las 24 h del retiro se inyecta 1 mg de BE; la ovulación ocurrirá 40 h después del BE, por lo tanto la inseminación artificial (IA) debería ser 48-52 h luego de la retirada de la P<sub>4</sub>. Al provocar los síntomas de celo, el estradiol permite la opción de realizar la IA luego de la detección de celos entre 1-5 días pos tratamiento o una IATF (Thatcher y col., 2001).

**Cuadro 1.** Resultados reproductivos de tratamientos hormonales para vacas lecheras en anestro. T = tratadas; C = controles.

Referencia	Protocolo (T/C*)	N (T/C)	% Preñez (T/C)
Xu y col. (1997)	8d CIDR + eCG	219/229	39/43 17d pos IA
Hanlon y col. (2000)	6d CIDR + BE	385/376	60/39 <sup>b</sup> 21 días pos IA
Xu y col. (2000)	GnRH+CIDR+PG+BE vs CIDR+BE	602/597	44/26 <sup>b</sup> 6 días pos IA
Darwash y col. (2001)	PG+7d CIDR	90/190	
McDougall (2001)	BE+8d CIDR+BE vs 6d CIDR+BE	602/603	43/35 <sup>a</sup> 14 días pos IA
McDougall y col. (2001)	Ovsynch vs 6d CIDR + BE	96/97	58/68 28 días pos IA
Cavestany y col. (2003)	Ovsynch+ MAP 7d vs Ovsynch	86/81	17,4/3,7 <sup>c</sup>
Gumen y col. (2003)	Ovsynch	33/31	9/3
Ozturk y col. (2010)	PG+GnRH+PG+GnRH vs Ovsynch	25/26	72/23,1 <sup>a</sup>
Cavestany y col. (2011)	GnRH+P4 7d+PG+BE vs GnRH+CIDR 7d + PG+BE	184/193	30,6/31
De Nava (2011)	BE + P <sub>4</sub> , PG+eCG, GnRH vs GnRH + P <sub>4</sub> , PG+eCG, GnRH	343/313	23/21,5

\*C: grupo control.

a: diferencias significativas entre T y C (P < 0,05).

b: diferencias significativas entre T y C (P < 0,001).

c: diferencias significativas entre T y C (P < 0,01).

Modificado de Rhodes y col., 2003.

Los mejores porcentajes de concepción se logran con 7 u 8 días de permanencia de los dispositivos intravaginales (Burke y col., 2001; Rhodes y col., 2003; McDougall y col., 2005) ya que se asegura que el folículo llegue al tamaño adecuado para ovular. Existen varios dispositivos vaginales con concentraciones de progesterona que van desde 0,5 g a 1,9 g pudiendo estos últimos utilizarse más de una vez, si son manejados adecuadamente. Recientemente ha surgido una formulación de progesterona natural en vehículo oleoso para uso parenteral. Algunos trabajos realizados con ésta han arrojado resultados similares a las intravaginales (Cavestany y col., 2011), aunque éstos pueden estar relacionados al nivel de anestro (profundo o superficial).

Con respecto al estradiol, estudios de campo realizados en vacas lecheras de Nueva Zelanda sugirieron que la administración de 2 mg de BE en el momento de la inserción de un dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> en lugar de 1 mg tiende a aumentar el porcentaje de preñez al primer servicio (49,0% vs. 61,7%) (Day y col., 2000), pero estudios realizados en Australia no mostraron diferencias de la fertilidad después del uso de cualquiera de las dosis de BE (Cavalieri y col., 2006), por lo que es así que se utiliza indistintamente 1 a 2 mg para el BE (Macmillan y Rhodes, 1996; Rhodes y col., 2003); 0,5 a 1 mg para el cipionato de estradiol (CE) (Thundathil y col., 1997; Lopes y col. 2000). Para inducir la ovulación, al final del protocolo, el momento de la inyección de estradiol dependerá del tipo: si se utiliza BE se recomienda hacerlo unas 50-55 horas luego de retirados los dispositivos intravaginales (Rhodes y col., 2003), mientras que si se utiliza CPE se recomienda hacerlo al día de retirada ya que al liberarse más tardíamente hará el efecto al mismo tiempo del BE dando como ventaja la reducción del manejo de los animales (Uslenghi y col., 2010). Este protocolo ha resultado efectivo en Australia y Nueva Zelanda al producir celo y ciclos fértiles (70% a 100%), dando como resultados buenos porcentajes de preñez al primer servicio (27% - 62%) y una preñez final de 67% (Rhodes y col., 2003). Se puede remplazar el BE o CPE por GnRH en el protocolo (Duchens y col., 2007).

En general los tratamientos basados en P<sub>4</sub> en animales en anestro dan resultados variables; algunos autores reportan resultados similares a los obtenidos en vacas inseminadas después de un primer estro espontáneo (Hanlon y col., 2000; Day y col., 2000; Xu y Burton, 2000) (Cuadro 1), mientras otros han informado respuestas menores que en vacas ciclando (Cartmill y col., 2001; Macmillan, 2002; Mapletoft y col., 2003). Si se trata a las vacas temprano en la estación reproductiva con dispositivos vaginales se puede lograr un alto porcentaje de concepción (60% a 64%) al primer servicio (Rhodes y col., 2003; Gutierrez y col., 2009); se puede pensar entonces que la inducción de la ovulación aumentaría el porcentaje de vacas preñadas antes de los 100 días posparto (Ross y col., 2004), beneficiando económicamente al productor.

Se debe tener en cuenta que los tratamientos hormonales no pueden acelerar el proceso de recuperación en todos los animales a la vez, por lo tanto es probable que el estado corporal o metabólico de la vaca inmediatamente antes del tratamiento, más que el tratamiento utilizado, contribuya a la fertilidad menor.

**Protocolo Ovsynch:** el Ovsynch (GnRH-PGF2 $\alpha$ -GnRH) ampliamente usado para sincronización de vacas ciclando provoca

ovulación, generalmente sin ocurrencia de celo (Pursley y col., 1995) por esto es que después de este tratamiento se debe hacer IATF. La GnRH provoca que el folículo más grande ovule o regrese, iniciando una nueva onda folicular; 7 días después al aplicar la PGF2 $\alpha$  se provoca luteolisis (del CL formado a partir de la administración de GnRH) y al día 9 la segunda inyección de GnRH induce la ovulación del nuevo folículo; 16 horas después se insemina. Los resultados han sido variables (9% a 37%) (Thatcher y col., 2002; Gumen y col., 2003; Shepard, 2005).

Debido a lo mencionado anteriormente surgió una modificación del Ovsynch el cual tiene el agregado de P<sub>4</sub> y se denomina Cosynch (Figura 1). Agregar una fuente de P<sub>4</sub> durante 7 días junto con la inyección de GnRH mejora los porcentajes de preñez (50%: Cavestany y col., 2000a; 55%: Pursley y col., 2001; 28-34%: López-Gatius y col., 2001) en comparación con vacas en anestro tratadas con el Ovsynch tradicional (Cavestany y col., 2003; Stevenson y col., 2008) (Cuadro 1).

Existe cierta dicotomía de los efectos de la GnRH en la progresión de la onda folicular en los tratamientos de inducción con P<sub>4</sub> (Diskin y col., 2002); siendo cuestionado el uso de la GnRH para sincronizar la emergencia de una onda folicular (Macmillan, 2010); tal vez esta sea la causa de los resultados variables explicados anteriormente. Por esto algunos técnicos se inclinan por la utilización de BE al principio y no GnRH (de Nava, 2011).



Figura 1. Esquema protocolo CIDR – Synch.

**Presynch:** el protocolo Presynch clásico consiste en dos inyecciones de PGF2 $\alpha$ , administradas con un intervalo de 14 días. Esto es seguido, 12 - 14 días más tarde, por la primera administración de GnRH del protocolo Ovsynch. Debido que este protocolo ha sido efectivo en aumentar la fertilidad en vacas cíclicas (Moreira y col., 2001) es que se han realizado modificaciones en él para su uso en vacas en anestro. Chebel y col. (2006) probaron el uso de un dispositivo CIDR durante los 7 días anteriores a la PGF2 $\alpha$  final del protocolo Presynch tradicional, induciendo ciclicidad en las vacas anovulatorias a los 62 días posparto y aumentando ésta de un 30% a 47%, con un porcentaje de concepción de 33% a la primera IA utilizando un protocolo Ovsynch. De todos modos los tratamientos de presincronización más sincronización en vacas en anestro no son efectivos dado que al no haber un cuerpo lúteo, la administración de prostaglandina no tendría sentido. Por otra parte, en nuestras condiciones, el tratamiento propuesto por Chebel resulta excesivamente costoso, aunque la inducción de la ciclicidad en vacas anovulatorias es posible (Wiltbank y col., 2007).

**Doublesynch:** Bello y col. (2006) comprobaron la mejoría de la fertilidad con un protocolo de presincronización con PGF2 $\alpha$  y GnRH (Doublesynch) en vacas cíclicas; siendo estudiada pos-

teriormente vacas en anestro por Ozturk y col. (2010); los autores obtuvieron buen porcentaje de preñez (72%) (Cuadro 1) sugiriendo que el protocolo Doublesynch se puede utilizar para IATF tanto en vacas ciclando como en anestro. Una posible explicación del hecho que vacas sin cuerpo lúteo mejoren su fertilidad con PGF2 $\alpha$  es la dada por diversos autores que demostraron efectos favorables de la PGF2 $\alpha$  en vacas con problemas de ovulación, a partir del aumento de los niveles de LH y las tasas de ovulación, sugiriendo que existe una mejora en la respuesta de la hipófisis a la GnRH luego de un tratamiento con PGF2 $\alpha$  (Randel y col., 1996; Cruz y col., 1997; López-Gatius y col., 2004).

**Heatsynch y P<sub>4</sub>:** sustituir la inyección final de GnRH por CPE o BE (Heatsynch) no compromete el desempeño reproductivo en vacas cíclicas (Thatcher y col., 2002; Stevenson y col., 2004), obteniéndose más vacas en estro y porcentajes de preñez similares al protocolo Ovsynch (Yaniz y col., 2004). En un estudio realizado por Balla y col. (2006) encontraron que el BE es igual de efectivo que la GnRH para inducir el crecimiento de una nueva onda folicular y para sincronizar la ovulación tanto en vacas cíclicas como en anestro.

Si al Heatsynch se le agrega una fuente de P<sub>4</sub> (Figura 2) se obtienen porcentajes de preñez a la primera inseminación mejores que el protocolo CIDR + BE (Xu y col., 2000; Cavestany, 2005; Cavestany y col., 2011) (Cuadro 1).

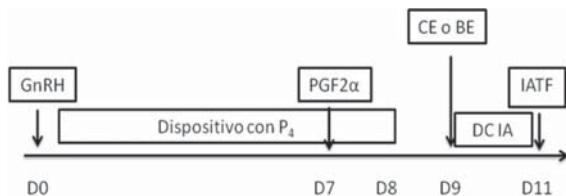


Figura 2. Esquema protocolo Heatsynch + CIDR.

**Protocolos con eCG:** se ha reportado que al combinar P<sub>4</sub> con una inyección de eCG al retiro de la fuente de P<sub>4</sub> se logra aumentar la sincronía y los porcentajes de concepción en la inseminación subsiguiente. Esto se ha probado en el caso de vacas para carne donde se han obtenido porcentajes de concepción del 70% y porcentajes de preñez de 64% en protocolos: P<sub>4</sub> + eCG + PGF2 $\alpha$  (Ross y col., 2004). En rodeos lecheros de Australia se ha evaluado la utilización de CIDR o implantes de norgestomet con eCG demostrando que el intervalo parto a concepción, en comparación con grupos controles no tratados, no es afectado (Rhodes y col., 2003). Sin embargo existen autores que afirman que la utilización de eCG en protocolos de BE-P<sub>4</sub> podría mejorar los porcentajes de preñez en vacas en anestro (Cutaia y col., 2003; Veneranda y col., 2008). Bryan y col. (2010) demostraron que un protocolo Ovsynch + P<sub>4</sub> + eCG disminuye los días abiertos; sin embargo reportes recientes obtuvieron buenos porcentajes de preñez de 20% (Cuadro 1) utilizando protocolos parecidos (de Nava, 2011). Tal vez los resultados dependan de varios factores como ser la edad (Bryan y col., 2010) o la CC (de Nava y Cavestany, 2000; Souza y col., 2009). Probando la eCG como tratamiento de vacas anovulatorias (sin protocolo de

IA) Rostami y col. (2011) inyectaron a los 6 días posparto 500 UI de eCG obteniendo una primera ovulación más temprano, e igual cantidad de ondas foliculares pero en menor tiempo que las vacas no tratadas.

**Protocolos de resincronización:** la combinación de programas para la primera IA con resincronización temprana de las vacas no preñadas permite realizar inseminaciones sistemáticas de los animales vacíos sin necesidad de detectar celos en los retornos alcanzando fertilidades del 55% al 75% y de esta forma mejorar el desempeño reproductivo de las vacas lactando (Chenault y col., 2003). En algunos casos, vacas en anestro que no han respondido al tratamiento inicial de inducción de ovulación responden favorablemente a un segundo tratamiento (McDougall y Loeffler, 2004).

El protocolo que se ha reportado más efectivo es el P<sub>4</sub> más estradiol al inicio y al retiro del implante (Figura 3) (Cavaliere y col., 2006). Diversos autores coinciden que el tratamiento de resincronización en vacas lecheras en anestro con P<sub>4</sub> y BE podría mejorar los porcentajes de preñez al día 28 pos IA pero al final de la temporada reproductiva no se obtienen mejoras en la fertilidad global (McDougall, 2001; Rhodes y col., 2001; Cavestany y col., 2003; Hanlon y col., 2005; McDougall y Compton, 2005) (Cuadro 1), ya que las vacas en anestro responden menos a la resincronización que las vacas ciclando (Cavestany y col., 2003); estos datos concuerdan con lo informado por Cavaliere y col. (2006) que los porcentajes de preñez de las resincronizaciones con P<sub>4</sub> y estradiol son variables (aumentan, disminuyen o no cambian). Una posible explicación a estos resultados es que vacas anovulatorias tendría bajas concentraciones de P<sub>4</sub> luego de la primera inducción de la ovulación llegando al tratamiento de resincronización con menor concentración de P<sub>4</sub> que las vacas ciclando y esto afectaría luego los porcentajes de preñez, siendo la concentración de P<sub>4</sub> antes de la IA un factor relevante más que el tratamiento de resincronización.

Se podría utilizar GnRH mejorando los porcentajes de preñez en vacas no cíclicas (Sterry y col., 2006). Chebel y col., (2003) demostraron que es seguro iniciar un Ovsynch en el día 21 pos IA antes del diagnóstico de preñez. También se ha probado que el agregar una GnRH antes de un Ovsynch en la resincronización mejora los porcentajes de preñez en vacas con ovarios quísticos (Bartolome y col., 2005).

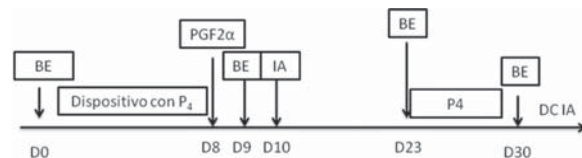


Figura 3. Esquema protocolo de resincronización con P4 y BE.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Debido a los muchos factores e interacciones que afectan el reinicio de la actividad ovárica, el control y la gestión del anestro posparto es complejo. Existen señales y factores no solo ováricos sino que también extra-ováricos que determinan si un

foliculo ovulará o no. Estas señales provienen principalmente de la energía que consume y las reservas que tenga el animal.

Las opciones terapéuticas que se resumieron son alternativas para lograr un intervalo entre partos cercano a los 12 meses en más del 75% de los animales. Las respuestas a los tratamientos

no son uniformes sino que parecería que dependen de los factores mencionados. Para estudiar y evaluar si un protocolo para tratar el anestro es el adecuado, debemos tener en cuenta que el manejo de vacas en anestro es diferente para los sistemas en pastoreo y estabulados, a pesar de que los animales se encuentran en un estatus ovárico similar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberio RH, Butler H. (2001). Sincronización de los celos en hembras receptoras. En: Palma GA. Biotecnología de la reproducción. Balcarce, Ed. Palma GA, pp. 61-77.
2. Balla E, Filippi L, Maraña Peña D, Pincinato D, Peres LC, Cutaia L, Veneranda C, Matínez MF, Bó GA. (2006). Efectos de diferentes protocolos de sincronización de la ovulación con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el desarrollo folicular y las tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia. Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos, Córdoba, Argentina, pp. 1-11.
3. Bartolome JA, Sozzi A, McHale J, Melendez P, Arteché ACM, Silvestre FT, Kelbert D, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. (2005). Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology* 63:1628-1642.
4. Baruselli OS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 82/83:479-486.
5. Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89:3413-3424.
6. Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43:31-40.
7. Breuel KF, Lewis PE, Inskeep EK, Butcher RL. (1993). Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows. *J Reprod Fertil* 97: 205-212.
8. Bryan MA, Bó GA, Heuer C, Emslie FR. (2010). Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronized AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrus dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 22:126-131.
9. Bulman DC, Lamming GE. (1978). Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fertil* 54: 447-458.
10. Burke CR, Mussard ML, Grum DE, Day ML. (2001). Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of estrus and ovulation in cattle with estradiol benzoate. *Anim Reprod Sci* 66:151-160.
11. Canfield RW, Butler WR. (1990). Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol* 7:323-330.
12. Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Lamb GC, Stevenson JS. (2001). Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J Dairy Sci* 84:1051-1059.
13. Cavalieri J, Macmillan KL. (2002). Synchronisation of oestrus and reproductive performance of dairy cows following administration of oestradiol benzoate or GnRH during a synchronised pro-oestrus. *Aust Vet J* 80:486-493.
14. Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shepard RW, Macmillan KL. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65:45-64.
15. Cavestany D. (2000a). Resumen de ensayos sobre eficiencia reproductiva en vacas de leche en producción, factores que la afectan y alternativas de manejo para incrementarla (periodo 1992 a 1997). En: Cavestany D. Reproducción. Serie Técnica n° 116, Uruguay, Ed. INIA La Estanzuela, pp. 1-18.
16. Cavestany D. (2000b). Manejo reproductivo en vacas lecheras. Serie Técnica n° 115. Uruguay, Ed. INIA La Estanzuela, 32 p.
17. Cavestany D, Galina CS, Viñoles C. (2001). Efecto de las características del reinicio de la actividad ovárica posparto en la eficiencia reproductiva de vacas Holstein en pastoreo. *Arch Med Vet* 33:217-226.
18. Cavestany D, Cibils J, Freire A, Sastre A, Stevenson JS. (2003). Evaluation of two different oestrus-synchronisation methods with timed artificial insemination and resynchronisation of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 77:141-155.
19. Cavestany D. (2005). Manejo Reproductivo en Vacas de Leche ¿Producir o no producir? Revista INIA, n° 4. pp. 1-5.
20. Cavestany D. (2010). Inducción de celos e inseminación artificial en vacas de leche en anestro. una nueva aproximación a un viejo problema. *Taurus* 12: 24-34.
21. Cavestany D, Costa G, Martínez Barbitta M. (2011). Comparación entre dos fuentes de progesterona (dispositivo intravaginal o inyectable subcutánea) incluidas en un protocolo de sincronización de ovulaciones en vacas Holando posparto, tratadas en fase folicular o luteal del ciclo estral. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buatría, Paysandú, Uruguay, 258 p.

22. Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Galvao KN, Juchem SO, Thatcher WW. (2003). Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60:1389-1399.
23. Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS. (2006). Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J Dairy Sci* 89:4205-4219.
24. Chenault JR, Boucher JF, Dame KJ, Meyer JA, Wood-Follis SL. (2003). Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J Dairy Sci* 86:2039-2049.
25. Cruz LC, doValle ER, Kesler DJ. (1997). Effect of prostaglandin F2a and gonadotropin releasing hormone induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. *Anim Reprod Sci* 49:135-42.
26. Cutaia L, Tribulo R, Moreno D., Bó GA. (2003). Pregnancy rate in lactating beef cows treated with progesterone-releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 59:216-216.
27. Darwash AO, Lamming GE, Royal MD. (2001). A protocol for initiating oestrus and ovulation early postpartum in dairy cows. *Anim Sci* 72:539-546.
28. Day ML, Burke CR, Taufa VK, Day AM, Macmillan KL. (2000). The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. *J Anim Sci* 78:523-529.
29. de Nava G, Cavestany D. (2000). Efecto de la utilización de dos fuentes de progesterona en el tratamiento del anestro posparto en vacas Holando en producción (resultados preliminares). En: Cavestany D. *Reproducción. Serie Técnica n° 116*. Uruguay, Ed. INIA La Estanzuela, pp. 55-57.
30. de Nava G. (2011). Un manejo reproductivo controlado en tambos del Uruguay. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp.35-43.
31. Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 23:211-228.
32. Duchens M, Meléndez P, Moraga L. (2007). Comparación de dos protocolos de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo en vacas lecheras Holstein con exceso de días vacíos. Séptimo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, pp.252-253.
33. Duffy P, Crowe MA, Boland MP, Roche JF. (2000). Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. *J Reprod Fertil* 118:9-17.
34. Duffy P, Crowe MA, Austin EJ, Mihm M, Boland MP, Roche JF. (2004). The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology* 61:725-734.
35. Fagan JG, Roche JF. (1986). Reproductive activity in postpartum dairy cows based on progesterone concentrations in milk or rectal examination. *Irish Vet J* 40:124-131.
36. García Bouissou R. (2008). Los costos ocultos de la ineficiencia reproductiva. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp.133-135.
37. Garverick HA. (1997). Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80:995-1004.
38. Gatica R. (1993). Causas, incidencia, control y tratamientos de anestro. XXI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp. 1-19.
39. Gregory RM, Melo L, Beskow A, Mattos RC, Jobim MIM, Gregory JW. (2009). Dinâmica follicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, pp.29-35.
40. Gumen AJ, Guenther M, Wiltbank MC. (2003). Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86:3184-3194.
41. Gutierrez JC, Palomares R, González R, Portillo G, Montero-Urdaneta M, Rubio-Guillen J, Hernández-Fonseca HJ, Soto-Belloso E. (2009). Shortening the postpartum anoestrous interval in suckled crossbred dual purpose cows using progestagen intravaginal sponges plus eCG and PGF2a. *Reprod Domest Anim* 44:48-54.
42. Hanlon DW, Wichtel JJ, Xu ZZ, Burton LJ. (2000). The reproductive performance of anoestrous dairy cows following treatment with progesterone and oestradiol prior to the start of mating. *NZ Vet J* 48:136-143.
43. Hanlon DW, Jarratt GM, Davidson PJ, Millar AJ, Douglas VL. (2005). The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anoestrous dairy cows. *Theriogenology* 63:1938-1945.
44. Kindahl H, Odensvik K, Aiumlamai S, Fredriksson G. (1992). Utero-ovarian relationships postpartum period. *Anim Reprod Sci* 28:363-369.
45. Kyle SD, Callahan CJ, Allrich RD. (1992). Effect of progesterone on the expression of estrus at first post partum ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci* 75:1456-1460.
46. Lemaire C, Grela C, De María P, Cavestany D. 2012. Indicadores reproductivos en predios lecheros en Uruguay: Resultados de dos años de evaluación. *Veterinaria (Montevideo)* 48:17-22.
47. Lopes FL, Arnold DR, Williams J, Pancarci SM, Thatcher MJ, Drost M, Thatcher WW. (2000). Use of estradiol cypionate for timed insemination. *J Anim Sci* 78(Suppl.):216.
48. López-Gatius F, Yaniz JL, Santolaria P, Murugavel K, Guijarro R, Calvo E, López-Béjar M. (2004). Reproductive performance of lactating dairy cows treated with

- cloprostenol at the time of insemination. *Theriogenology* 62:677-89.
49. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De la Sota RL, Thatcher WW. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70:3615-3626.
  50. Lucy MC. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci*. 84: 1277-1293.
  51. Lucy MC, McDougall S, Nation DP. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Anim Reprod Sci* 82-83:495-512.
  52. Macmillan KL, Day AM. (1987). Treating the non-cycling cow. *Proc Ruakura Farmers Conf* 39:65-68.
  53. Macmillan KL, Peterson AJ. (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* 33:1-25.
  54. Macmillan KL, Rhodes FM. (1996). Synchrony systems for dairy heifers and cows. *Proc Soc Dairy Cattle Vet NZ Vet Assoc* 13:149-158.
  55. Macmillan KL. (2002). Advances in bovine theriogenology in New Zealand. I. Pregnancy, parturition and the postpartum period. *NZ Vet J* 50 (Suppl.):67-73.
  56. Macmillan KL, Segwagwe BV, Pino CS. (2003). Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim Reprod Sci* 78:327-344.
  57. Macmillan KL. (2010). Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J Reprod Dev* 56:S42-S47.
  58. Mapletoft RJ, Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP. (2003). The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J Anim Sci* 81(E. Suppl. 2):28-36.
  59. Markusfeld O. (1987). Inactive ovaries in high-yielding dairy cows before service: aetiology and effect on conception. *Vet Rec* 121:149-153.
  60. Mateus L, Lopez da Costa L, Bernardo F, Robalo Silva J. (2002). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 37:31-35.
  61. McDougall S. (2001). Reproductive performance of anovulatory anoestrous postpartum dairy cows following treatment with two progesterone and oestradiol benzoate-based protocols, with or without resynchrony. *NZ Vet J* 49:187-194.
  62. McDougall S, Cullum AA, Anniss FM, Rhodes FM. (2001). Treatment of anovulatory anoestrous postpartum dairy cows with a gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), prostaglandin F<sub>2α</sub>, GnRH regimen or with progesterone and oestradiol benzoate. *NZ Vet J* 49:168-172.
  63. McDougall S, Loeffler SH. (2004). Resynchrony of postpartum dairy cows previously treated for anestrus. *Theriogenology* 61:239-253.
  64. McDougall S, Compton C. (2005). Reproductive performance of anestrous dairy cows treated with progesterone and estradiol benzoate. *J Dairy Sci* 88:2388-2400.
  65. McDougall S, Compton CWR, Hanlon DW, Davidson PJ, Sullivan DJ, Gore AH, Anniss FM (2005). Reproductive performance in anestrous dairy cows following treatment with two protocols and two doses of progesterone. *Theriogenology* 63:1529-1548.
  66. Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald LF, Donovan GA. (2004). Uterine involution and fertility of Holstein cows subsequent to early postpartum PGF<sub>2α</sub> treatment for acute puerperal metritis. *J Dairy Sci* 87:3238-3246.
  67. Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84:1646-1659.
  68. Morrow DA, Roberts SJ, McEntee K. (1969). Postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in dairy cattle. II. Involution of uterus and cervix. *Cornell Vet* 59:190-198.
  69. Odde KG. (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci* 68: 817-830.
  70. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. (2000). Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53:841-857.
  71. Ozturk OA, Cirit U, Baran A, Ak K. (2010). Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrous dairy cows. *Theriogenology* 73:568-576.
  72. Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ. (2009). Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 71:1333-1342.
  73. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PG. *Theriogenology* 44:915-923.
  74. Rajamahendram R, Taylor C. (1990). Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim Reprod Sci* 22:171-180.
  75. Randel RD, Lammoglia MA, Lewis AW, Neuendorff DA, Guthrie MJ. (1996). Exogenous PGF<sub>2α</sub> enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology* 45:643-654.
  76. Rhodes FM, McDougall S, Morgan SR, Verkerk GA. (2001). Supplementing treated anoestrous dairy cows with progesterone does not increase conception rates. *NZ Vet J* 49:8-12.
  77. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. (2003). Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci* 86:1876-1918.
  78. Roche JF. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 96:282-296.



79. Ross P, Aller J, Butler H, Callejas S, Albeiro R. (2004). Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology* 62:265-273.
80. Rostami B, Niasari-Naslaji A, Vojgani M, Nikjou D, Amanlou H, Gerami A. (2011). Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 128:100-106.
81. Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 87:905-920.
82. Sheldon M, Claire Wathes D, Dobson H. (2006). The management of bovine reproduction in elite herds. *The Veterinary J* 171:70-78.
83. Shepard RW. (2005). A comparison of performance of the Ovsynch treatment program between cycling and noncycling cows within seasonally-calving dairy herds. *Aust Vet J* 83:751-757.
84. Souza AH, Viechnieski S, Lima F, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72:10-21.
85. Sterry RA, Welle ML, Fricke PM. (2006). Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89:4237-4245.
86. Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC. (2004). Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87:3298-3305.
87. Stevenson JS, Tenhouse DE, Krisher RL, Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR, Pursley JR, Bello NM, Fricke PM, Wiltbank MC, Brusveen DJ, Burkhart M, Youngquist RS, Garverick HA. (2008). Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J Dairy Sci* 91:2901-2915.
88. Tanaka T, Arai M, Ohtani S, Uemura S, Kuroiwa T, Kim S, Kamomae H. (2008). Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 108:134-143.
89. Thatcher WW, Patterson DJ, Moreira I, Pancarci M, Jordan ER. (2001). Current concepts for estrus synchronization and timed insemination. *Proc AABP* 34:95-105.
90. Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JEP. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest Anim Endocrinol* 23:243-254.
91. Thundathil J, Kastelic JP, Mapletoft RJ. (1997). The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. *Can J Vet Res* 61:314-316.
92. Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Dufour JJ. (1992a). Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology* 38:1131-1144.
93. Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Villeneuve P, Dufour JJ. (1992b). Influence of an agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J Anim Sci* 70:1904-1910.
94. Uslenghi G, Chayer R, Callejas S. (2010). Reproducción en vacas. *Rev vet* 21:55-58.
95. Veneranda G, Filippi L, Racca D, Cutaia L, Bó GA. (2008). Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod Fertil Dev* 20:91-91.
96. Walsh R, Walton J, Leslie K, LeBlanc S. (2005). Prevalence and risk factors for postpartum anestrus in dairy cattle. *J Dairy Sci* 90:315-324.
97. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod Sci* 123:127-138.
98. Wathes DC, Bourne N, Cheng Z, Mann GE, Taylor VJ, Coffey MP. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *J Dairy Sci* 90:1310-1325.
99. Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R., (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57:21-52.
100. Wiltbank MC, Gumen A, Lopez H, Sartorio R. (2007). Manejo y tratamiento de vacas de leche no cíclicas o con quistes foliculares. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, pp. 114-130.
101. Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL. (1997). Treatment of postpartum anoestrous dairy cows with progesterone, oestradiol and equine chorionic gonadotrophin. *NZ Vet J* 45:205-207.
102. Xu ZZ, Burton LJ. (2000). Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F2 alpha. *J Dairy Sci* 83:417-476.
103. Xu ZZ, Burton LJ, McDougall S, Jolly PD. (2000). Treatment of Noncyclic Lactating Dairy Cows with Progesterone and Estradiol or with Progesterone, GnRH, Prostaglandin F2 $\alpha$  and Estradiol. *J Dairy Sci* 83:464-470
104. Zhang J, Deng LX, Zhang HL, Hua GH, Zhu Y, Meng XJ, Yang LG. (2010). Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 93:1979-1986.
105. Yaniz JL, Murugavel K, López-Gatius F. (2004). Recent developments in oestrous synchronization of post-partum dairy cows with or without ovarian disorders. *Reprod Domest Anim* 39:86-93.