

COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD OVÁRICA EN NOVILLAS CRUZADAS A PASTOREO

Comparison of Three Methods to Determine Ovarian Activity in Grazing Crossbred Heifers

Pedro Peña¹, Pablo Herrera², Noris Roa³, Beatriz Birbe² Omar Colmenares⁴ y Nelson Martínez¹

¹Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua, Venezuela.

²Estación Experimental La Iguana, Universidad Simón Rodríguez. Santa María de Ipire, estado Guárico, Venezuela.

E-mail: pherrera@mailcity.com, bbirbe@lycos.com

³INIA, Ceniap, Reproducción Animal. Maracay, estado Aragua, Venezuela. E-mail: nroa@inia.gov.ve

⁴Universidad Rómulo Gallegos. San Juan de Los Morros, estado Guárico, Venezuela. E-mail: ocolmena@mailcity.com

RESUMEN

Comparando tres métodos para la determinación de actividad ovárica en novillas a pastoreo en sabanas bien drenadas del estado Guárico, Venezuela, se utilizaron 35 novillas mestizas, con peso y edad de $342,3 \pm 31,6$ kg y $35,87 \pm 3,88$ meses, respectivamente, durante 45 días, correspondientes a dos ciclos estrales, y presencia de actividad cíclica, determinada por radioinmunoanálisis (RIA), mediante concentración de progesterona en plasma sanguíneo (P_4). Se utilizó como método de referencia el doble muestreo semanal de P_4 a intervalos de 3 y 4 días entre muestreos (T_0). Los métodos a evaluar fueron: (T_1) = un muestreo semanal de P_4 ; (T_2) = detección visual de celo (DVC) y (T_3) = Palpación transrectal (PT). Para evaluar los métodos se utilizó como referencia a T_0 , en tabla de doble entrada (2x2) aplicando los estadísticos de J de Youden, valor de Kappa y McNemar (muestras relacionadas). Al evaluar T_1 se obtuvo un 55,9% de sensibilidad con 100% de especificidad. Al evaluar DVC, se encontró un 45,31% de falsos positivos y 27,82% de falsos negativos, con un 52,23% de sensibilidad y 74,18% de especificidad. Evaluando PT, se reportó un 51,85% de falsos positivos y 30,58% de falsos negativos, con sensibilidad del 30,00% y 80,82% de especificidad. T_1 es la metodología que permitió detectar con mayor frecuencia actividad cíclica en novillas púberes. La metodología de la DVC mostró mayor sensibilidad (52,23% vs. 30,00%) para determinar animales activos que PT. Es recomendable combinar metodologías para reducir errores en la detección de actividad cíclica en el campo.

Palabras clave: Actividad cíclica, progesterona, novillas, celo.

ABSTRACT

To compare three methods of cyclic activity determination in heifers grazing in well drained savanna in Guárico state, Venezuela was used 35 crossbred heifers, with 342.3 ± 1.6 kg of weight and 35.87 ± 3.88 months of age, during 45 days. The evaluation was during two estrual cycles, and presence of recurrent activity, determined by radioimmunoassay measuring progesterone concentration in sanguine plasm (P_4), selecting those with values superiors to 3.18 nmol/l in two serial samples. It was used twice a week as reference method sampling from P_4 in intervals of 3 and 4 days among samplings (T_0). The methods to evaluate were: (T_1) = a weekly sampling of P_4 ; (T_2) = visual detection of heat (VDH) carried out twice daily, one hour per period and (T_3) = Transrectal palpation (TP), once a week, during the period of the trial. To evaluate the methods it was used like reference (T_0), in chart of double entrance (2x2) applying the statistical of J of Youden, value of Kappa and McNemar (samples related). When evaluating (T_1) 55.9% of sensibility was obtained with 100% of specificity. When evaluating (VDH), 45.31% was false positive and 27.82% false negative, with 52.23% of sensibility and 74.18% of specificity. Evaluating (TP), 51.85% was reported of false positive and 30.58% false negative, with sensibility of 30.00% and 80.82% of specificity. (T_1) are the methodology that allowed to detect with more frequency recurrent activity in heifers. The methodology of the (VDH) showed bigger sensibility (52.23% vs. 30.00%) to determine active animals than (TP). It is advisable to combine methodologies to reduce errors in detection of recurrent activity at the ranch.

Key words: Recurrent activity, progesterone, heifers, estrus.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales limitantes de la IA son las fallas en la detección de celos [12, 14, 18]. La precisión y la eficiencia en la detección de celos, seguida de una IA oportuna, es el mayor desafío a que se enfrentan muchos de los rebaños bovinos sometidos a este tipo de tecnología [11, 29]. Una baja tasa de detección de celos combinada con una pobre tasa de concepción al primer servicio, son las principales causas de una baja eficiencia reproductiva en muchos rebaños lecheros, de carne y doble propósito [49]. En referencia a explotaciones intensivas, éstas pueden inducir a un mayor estrés limitando la expresión normal del comportamiento sexual dificultando la detección de celos [22, 31].

Existen vacas que ciclan normalmente, pero no son detectadas en celo por problemas en la expresión del mismo (corta duración, signos débiles, o cortos, celos nocturnos y ciclos estrales de duración anómala). Tales problemas suelen ser citados como la principal razón para la obtención de bajas tasas de preñez.

La expresión del celo puede verse afectada por factores como la edad, estado sanitario, clima, aislamiento [1, 8, 22, 31, 43], además de fallas humanas y técnicas, relacionadas con un bajo número de observaciones, chequeos en horas inapropiadas, reducido tiempo de observaciones y fallas de continuidad, particularmente, los fines de semana y durante la noche [41].

Las fallas en la observación, así como en la interpretación de los signos de estros, resultan en pérdidas económicas significativas. Pelissier [33] y De Kruif [7] han estimado que del 3 al 50% de los estros en vacas lecheras no son detectados, atribuyéndose este problema a estros silenciosos; por su parte, Sepúlveda y Rodero [44], señalan que el componente más costoso en la IA, resulta ser la detección de estros, reportándose en EEUU pérdidas por fallas en la detección de estros que superan los 300 millones de dólares al año.

En Venezuela, el principal problema que afecta la reproducción en rebaños mestizos que utilizan la IA es el anestro, el cual está muy relacionado con problemas en la detección del celo [14], utilizándose principalmente la palpación transrectal para inferir el funcionamiento de los ovarios de las novillas y vacas [45] y en menor frecuencia la detección visual de celo. De esta problemática se desprende la necesidad de evaluar algunos métodos de detección de actividad ovárica utilizados en investigación y en rebaños comerciales como son la determinación de P₄, una vez semanal, la detección visual de celo (DVC) y la palpación transrectal (PT), en novillas mestizas pastoreando en sabanas bien drenadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue efectuado en la Estación Experimental "La Iguana", de la Universidad Nacional Experimental Simón Ro-

dríguez, ubicada en el municipio Santa María de Ipire, al Sureste del estado Guárico, entre los paralelos 8° 23' 30" y 8° 28' 30" Latitud Norte y entre los meridianos 65° 28' 37" y 65° 22' 50" Longitud Oeste con una altitud promedio de 100 msnm [26]. Ubicada en el bosque seco tropical, de sabanas bien drenadas ó sabanas de *Trachypogon* [19]. El clima definido con dos períodos muy marcados, uno seco que va desde noviembre a mayo y otro lluvioso de junio a octubre. La precipitación anual oscila entre 1100 y 1400 mm, y temperatura media entre 26°C y 30°C, siendo los meses más calurosos marzo, abril y mayo [26]. Los suelos son pobres en nutrientes, con pH ácido. La vegetación de estas sabanas, está dominada por gramíneas del género *Trachypogon*, y otros géneros como *Andropogon*, *Axonopus*, todas de bajo valor nutritivo, y algunas leguminosas de los géneros *Cassia*, *Eriosema*, *Galactia* y *Stylosantes* [3].

Se utilizaron 35 novillas mestizas Gyr-Simmental, con peso vivo promedio de 342,3 ± 31,6 kg, y 35,87 ± 3,88 meses de edad, condición corporal (CC) promedio de 3,16 ± 0,2 por el método Nird modificado con escala de 1-5 [9], y con valores de progesterona en sangre (RIA), superiores a 3,18 nmoles/L en dos pruebas consecutivas, y con presencia de estructuras ováricas a la palpación transrectal (folículos y cuerpo lúteo), corroborando actividad ovárica. Las novillas bajo pastoreo continuo, tuvieron el mismo manejo sanitario y alimenticio (bloque multinutricional con 30% de proteína y 2-3% de fósforo, con un consumo de 330 g/animal/día). Las mediciones se realizaron durante 45 días consecutivos, lo que representa dos ciclos estrales.

Se evaluó la actividad cíclica utilizando los siguientes métodos: Método de detección visual de celo (DVC), se observó a los animales dos veces por día (método AM-PM), en la mañana de 7:30 a 9:00, y luego en la tarde de 17:00 a 18:30, evaluando la inmovilidad de las novillas ante la monta, como la presencia del celo [4, 14, 20, 38]. Además se observaron los signos secundarios de celo, como intentos de montar a otras hembras, mugidos o bramidos, intranquilidad, mayor movilidad, elevación de la base de la cola, presencia de mucus o limo en la vulva, vulva enrojecida e inflamada [38, 41]. Se realizó palpación transrectal de los ovarios (PT), una vez por semana, coincidiendo con el último muestreo de sangre semanal. En la revisión se detectó la presencia y diferenciación de estructuras anatómicas en ambos ovarios (cuerpo lúteo y folículo). Muestreo sanguíneo para determinar P₄, en la vena yugular dos veces por semana para obtener plasma, luego de la centrifugación. Se muestreó por 45 días lo que corresponde a dos ciclos estrales [5, 35, 37, 40, 47]. La P₄ se determinó por el método de RIA con Kits DPC (FAO/IAEA) fase sólida [34], cuyos valores de coeficiente de variación inter e intra ensayo fueron de 7,7% y 9,69%, respectivamente. Se uniformizaron todos los factores que pudieran influir en el muestreo, haciéndolo a una misma hora en la mañana (8:00 A.M.) los días de muestreo, manteniendo el mismo patrón de recolección, centrifugación, congelación y almacenamiento.

Para el análisis estadístico se definieron los siguientes tratamientos para determinar actividad cíclica:

- T₀: Determinación de P₄ mediante dos muestreo de sangre semanal a novillas púberes (RIA₂) utilizado como referencia.
- T₁: Determinación de P₄ mediante un muestreo de sangre semanal a novillas púberes (RIA₁).
- T₂: Método de detección visual del celo (DVC).
- T₃: Palpación transrectal de ovarios (PT).

Los datos de frecuencia de actividad cíclica determinados a través de DVC, PT y RIA₁, fueron evaluados a través de pruebas no paramétricas (J de Youden, valor de Kappa y la prueba de McNemar). Para esta evaluación se elaboraron tablas de doble entrada (2 × 2), según se puede apreciar en el TABLA I [2]. De esta forma se compararon las metodologías de detección de actividad cíclica por pruebas (DVC, PT y RIA₁) contra la prueba estándar (RIA₂).

Para cada método en evaluación, se calcularon la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, falsos positivos y falsos negativos [2]. Adicionalmente, se determinó la concordancia de cada prueba con RIA₂, a través de los estadísticos J de Youden [2] y el valor de Kappa [23]; en el primer caso, se consideran indicativos de concordancia entre pruebas los valores cercanos a 1 y -1 y en el segundo, la proporción de concordancia entre dos o más pruebas. Finalmente, se utilizó la prueba de McNemar (muestras relacionadas) para determinar la simetría de cada método de diagnóstico, es decir, la distribución de falsos positivos y falsos negativos [2].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Evaluación de dos frecuencias de muestreo en sangre para la determinación de progesterona (P₄)

En la TABLA II se presentan los valores de frecuencia de actividad cíclica obtenidos para T₁ y T₀, observándose que T₁ es capaz de detectar 52 frecuencias positivas de 93 señalados por T₀, lo que corresponde a un 55,91% de sensibilidad. Esto indica una moderada confiabilidad para detectar animales activos de T₁, sin embargo, al hacer referencia al valor predictivo positivo (100%), indica que todas las muestras diagnosticadas positivas son realmente positivas por este método.

En relación con la especificidad, T₁ fue capaz de detectar el total de animales negativos (100%). Se obtuvo un valor predictivo negativo de 38,8%, que relacionado con el 100% de especificidad indicado, sugiere que de la totalidad de los individuos diagnosticados como inactivos por T₁, una elevada proporción fue de falsos negativos (61,2%). Estos falsos negativos son representados por muestras de plasma sanguíneo que resultaron observaciones negativas (P₄ < a 3,18 nmol/L), pero al ser comparados con T₀, resultaron ser muestras positivas (P₄ > a 3,18 nmol/L). En las condiciones de este experimento, esto puede ocurrir por fluctuaciones individuales diarias de las concentraciones de P₄, debido a condición metabólica y nutricional de cada animal al momento del muestreo sanguíneo, que pueden ocasionar una regresión prematura del cuerpo lúteo [39] ó por el tiempo entre muestreos [24].

Los resultados de la comparación de los métodos T₁ vs. T₀ a través de la prueba de concordancia de Youden (J = 0,5591) indicaron una moderada similitud entre ellas, con-

TABLA I
TABLA DE DOBLE ENTRADA (2x2)

		Estándar		Total
		Positivos	negativos	
Prueba	Positivos	A	B	A+B
	Negativos	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	A+B+C+D

A: Son los individuos que fueron detectados positivos (actividad cíclica) con la prueba y el estándar. B: Son los falsos positivos a la prueba y negativos al estándar. C: Son los falsos negativos a la prueba y positivos al estándar. D: Son los individuos que fueron detectados negativos (sin actividad) con la prueba y el estándar.

TABLA II
FRECUENCIAS OBTENIDAS POR LOS MÉTODOS DE T1 (UN MUESTREO SEMANAL) Y T₀ (DOS MUESTREOS SEMANALES)

		RIA 2 (T ₀)		Total
		Positivos	Negativos	
RIA 1(T ₁)	Positivos	52	0	52
	Negativos	41	26	67
Total		93	26	119

firmado por el valor de Kappa (0,357), el cual señaló una concordancia regular. Adicionalmente, los resultados de la prueba de McNemar ($P < 0,01$) señalaron que no existe simetría en la distribución de falsos positivos y falsos negativos para T_1 , es decir, la proporción de falsos negativos fue mayor, en comparación con los falsos positivos (61,2 vs. 0%, respectivamente).

Algunos autores [36, 42, 46] indican que el ciclo estral, en condición normal o no, puede tener un amplio rango de variación que afecta la frecuencia de muestreo. Cuando se utiliza T_1 en animales que presentan ciclos cortos (8-14 días), existe la posibilidad de encontrar dos muestras consecutivas con valores por debajo de 3,18 nmol/L, por lo que podría esperarse que ambas muestras sean tomadas en la misma etapa del ciclo consecutivamente. En el caso de que esto sucediese este animal sería reportado como no cíclico, por el contrario, cuando se utiliza T_0 el intervalo de tiempo entre la toma de una muestra y otra es menor (3-4 días), existiendo una gran probabilidad de obtener, al menos, dos valores consecutivos de progesterona mayores de 3,18 nmol/L, en el ciclo estral, permitiendo de esta manera corroborar la presencia de actividad cíclica.

La frecuencia de muestreo para un determinado análisis depende del tipo de información que se desee obtener. García y col. [13], recomiendan altas frecuencias de muestreos semanales, cuando se desea definir el perfil hormonal del ciclo estral y muestreos con intervalos de 10 días cuando se investiga la proporción de animales gestantes, vacíos con actividad cíclica y vacíos con anestros [37]. Plaizier [34], indica 1-2 muestras por semana, dependiendo de la exactitud requerida y del intervalo esperado entre el parto y la primera ovulación. El RIA de progesterona ha sido utilizado en innumerables trabajos de investigación en América Latina [21, 36].

B. Comparación de la detección visual de celo como indicadores de actividad cíclica

En la TABLA III, se puede apreciar las diferencias en las observaciones positivas y negativas detectadas entre los mé-

todos T_0 y T_2 , observándose que este último fue capaz de detectar el 52,23% (35/67) de las novillas en celo o con actividad cíclica. En este caso los resultados de sensibilidad, señalan que la DVC tiene baja confiabilidad para detectar animales activos, sin embargo, el valor predictivo positivo obtenido (54,68%) fue similar a la sensibilidad, indicando que las observaciones reportadas como positivas, son correctas en todos los casos. Valores comparables han sido reportados en otros estudios [14, 44, 48] con promedios alrededor del 50%.

En relación con la especificidad la DVC fue capaz de detectar 74,18% del total de animales negativos, mientras que su valor predictivo negativo fue de 72,17%, similar a la especificidad indicada, debido a que de la totalidad de los individuos diagnosticados como inactivos por DVC, una proporción fue de falsos negativos (27,82%), correspondiendo a animales sin signos de celo, pero al ser comparados con T_0 presentaron actividad cíclica. Los resultados de la comparación de la DVC (T_2) vs. RIA (T_0) a través de la prueba de concordancia de Youden ($J = 0,2563$) indicaron una baja similitud entre ellas, confirmado por el valor de Kappa (0,266), el cual señaló una concordancia regular. Adicionalmente, los resultados de la prueba de McNemar ($P > 0,05$) señalaron que existe simetría en la distribución de falsos positivos y falsos negativos para DVC (T_2), es decir, la proporción de falsos negativos no fue muy amplia, en comparación con los falsos positivos (27,82 vs. 45,31%, respectivamente).

Al evaluar T_2 , se detectaron diferencias como la presencia de falsos positivos y negativos, que afectan la confiabilidad del método y determinan fallas en actividades de investigación, inseminación artificial u otras que impliquen la determinación de actividad cíclica (TABLA IV).

Los falsos positivos (45,31%) son observaciones de animales que presentaron los signos típicos de celo, pero al analizar los valores de progesterona (P_4) en plasma, se determinó que estos animales no presentaron actividad cíclica. En este caso puede tratarse de animales con celos anovulatorios, folí-

TABLA III
FRECUENCIAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO DE RADIOINMUNOENSAYO (T_0) Y DETECCIÓN VISUAL DE CELO (T_1)

		RIA 2 (T_0)		Total
		Positivos	Negativos	
DVC (T_2)	Positivos	35	29	64
	Negativos	32	83	115
Total	67	112	179	

TABLA IV
PORCENTAJES OBTENIDOS POR LA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN VISUAL DE CELO (T_2)

	Número de observaciones	Porcentaje (%)
Verdaderos positivos	35	54,68
Verdaderos negativos	83	72,17
Falsos positivos	29	45,31
Falsos negativos	32	27,82

culos persistentes, folículos indehiscentes o quistes foliculares. González y Goicochea [15] reportan 9,1% de celos anovulatorios en un estudio con novillas Brahman. Morrow y col. [28] reportan un 14% de celos anovulatorios en novillas Holstein. Nelson y col. [30], indican que los celos anovulatorios son un comportamiento normal durante la pubertad. En el caso de los falsos negativos (27,82%), se trató de animales que no presentaron ningún signo evidente de celo, pero los análisis de P₄ indicaron actividad cíclica.

Los falsos negativos pueden ocurrir por diferentes causas, además de la consideración de la frecuencia y duración de la observación, uno de ellos es la incidencia de ciclos irregulares. Cuando los ciclos son cortos, y afectan cada una de las fases del ciclo, existe menos probabilidad de que el celo sea observado en el campo. McDonald [27], indica que el poco tiempo utilizado por el personal es una de las causas principales por la cual se presentan los celos silentes, agudizándose cuando los animales pastorean libremente, ya que los animales tienden a presentar mayor proporción de celos durante la noche. Otro aspecto que puede inducir a la observación de falsos negativos es la presencia de celos silentes o subestros, los cuales son reportados por varios autores [6, 16, 17, 22, 25].

C. Evaluación de la técnica de palpación transrectal (PT) para determinar actividad cíclica

Al comparar T₃ con T₀, se encontraron 13 observaciones positivas, que representa el 30,00% de las observadas en este tratamiento. Ello implica que T₃ es de baja confiabilidad para detectar animales activos o positivos. Su valor predictivo positivo, fue de un 48,14%, indicando que de la totalidad de los animales detectados como positivos por el método el 48,14% son verdaderos positivos y 51,85% corresponden a falsos positivos (novillas que por palpación presentaron alguna estructura no corroborada por T₀) (TABLA V).

En cuanto a la especificidad, T₃, fue capaz de detectar 80,82% de negativos del total de animales, en contraste al valor predictivo negativo que fue 69,41%, indicando que los diagnósticos de ausencia de cuerpo lúteo o folículos fueron correctos en 69,41% de los casos. Los resultados de la comparación de los métodos RIA (T₀) vs. PT (T₃) a través de la prueba de concordancia de Youden (J = 0,1416) indicaron una baja similitud entre ellas, confirmado por el valor de Kappa (0,152), el cual señala una concordancia leve. Adicionalmente, los resultados de la prueba de McNemar (P > 0,05) señalan que existe simetría en las distribución de falsos positivos y falsos negativos para PT, es decir, la proporción de falsos negativos no fue muy amplia, en comparación con los falsos positivos (30,58 y 51,85% respectivamente).

En la TABLA VI se presentan falsos positivos y falsos negativos correspondientes a la metodología de PT. Los falsos positivos son cuerpos lúteos (CL) diagnosticados por T₃ no corroborados por T₀, lo que confirma que son observaciones negativas. En el caso de los falsos negativos son observaciones donde el diagnóstico señala la ausencia de CL en los ovarios (observación negativa), pero confirmada por T₀, indicando observaciones positivas.

En los resultados se puede observar que la PT presentó más falsos positivos que falsos negativos. Esto suele estar ocurriendo debido a erradas percepciones en la palpación, reportando CL, cuando pueden ser folículos de gran tamaño (mayores de 10 mm), así como también, puede tratarse de quistes ováricos. El reporte errado ha sido reportado por diferentes autores [10, 19, 32], sin embargo el valor reportado por ellos es inferior al encontrado en este ensayo. Se puede inferir que la ocurrencia de falsos positivos (51,85%) utilizando T₃ para evaluar la presencia de CL, en novillas que van a entrar a un programa de inseminación artificial, va a determinar la pérdida de un ciclo estral al no poder ser sincronizado efectiva-

**TABLA V
FRECUENCIAS OBTENIDAS POR LOS MÉTODOS DE PALPACIÓN TRANSRECTAL (T₃) Y RADIOINMUNOENSAYO (T₀)**

		RIA 2 (T ₀)		Total
		Positivos	Negativos	
PT(T ₃)	Positivos	13	14	27
	Negativos	26	59	85
Total	39	73	112	

**TABLA VI
PORCENTAJES OBTENIDOS POR LA METODOLOGÍA DE PALPACIÓN TRANSRECTAL**

	Número de observaciones	Porcentaje (%)
Verdaderos positivos	13	48,14
Verdaderos negativos	59	69,41
Falsos positivos	14	51,85
Falsos negativos	26	30,58

mente, con aumento en los costos y con el riesgo de descartar animales, por considerarlos problemáticos para la IA.

CONCLUSIONES

El uso de un muestreo de sangre por semana para determinar progesterona en plasma, detectó un 55,91% de muestras positivas y mostró una mayor sensibilidad para detectar animales en actividad ovárica, en comparación con la detección visual de celo (52,23%) y la PT (30,00%). Sin embargo, PT detectó el 80,82% de negativos verdaderos, indicando que su uso en conjunto con los otros dos métodos, podría mejorar significativamente la detección de actividad ovárica en novillas mestizas a pastoreo.

AGRADECIMIENTO

Se reconoce y agradece el financiamiento al proyecto Milenium Iguana (USR-FONACIT-Banco Mundial) y al Proyecto RBF 11818/RB de la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBRIGHT, J.; ARAVE, C. **The behavior of cattle**. Edit. CAB. International, Oxon, UK. 320 p. 1997.
- [2] ALTMAN, D., G. **Practical statistics for medical research**. Ed. Chapman & Hall. London-Paris. 611 pp. 1991.
- [3] ARIAS, I.; LÓPEZ, G. Características de los sistemas de producción de la zona de colinas de la Región Oriental de Guárico. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Estación Experimental del Nor-Oriente de Guárico. Valle de la Pascua. Estado Guárico. **Boletín N° 3**. 56 pp. 1979.
- [4] BACA, J.; PEREZ, E.; GALINA, C. Comportamiento reproductivo de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* bajo programas de inseminación artificial a estro sincronizado y natural en condiciones del trópico seco de Costa Rica. **Vet. Méx.** 29 (1): 57-66. 1998.
- [5] BREVEL, K; SPITZER, J; GIMÉNEZ, T.; HENRICKS, D.; GRAY, S. Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol – 17 B and estrone in plasma and serum samples. **Theriogenol.** 30: 613-627. 1988.
- [6] CALDERÓN, R.; VILLA-GODOY, A.; LAGUNES, J. Frecuencia y origen de las elevaciones de progesterona en vaquillas Cebú y Pardo Suizo prepúberes en condiciones tropicales. **Téc. Pec. Méx.** 36 (1): 1-13. 1998.
- [7] DE KRUIF, A. Factors influencing the fertility of a cattle population. **J. Reprod. Fert.** 54:507. 1978.
- [8] ESSLEMONT, R.; BRYANT, M. Oestrus behaviour in a herd of dairy cows. **Vet. Rec.** 99: 253-256. 1976.
- [9] FATTET, I.; JAURENA, G. **El Estado Corporal de las Vacas Lecheras**. Folleto divulgativo. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 8 pp. 1988.
- [10] FERGUSON, J. Diseases Effecting Reproduction in Dairy Herds. University of Pennsylvania. School of Veterinary Medicine. **Center for animal health and productivity**. <http://www.fisapnet.it/REPDIS.html>. 18 p. 2000.
- [11] FOOTE, R. Oestrus detection and oestrus detection aids. **J. Dairy Sci.**, 58: 248-256. 1975.
- [12] GALINA, C.; ARTHUR, G. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrous cycles. **Anim. Breed. abst.** 58. (12). 697- 707. 1990.
- [13] GARCIA, A.; CASTEJÓN, M.; F DE LA CRUZ, J.; GONZÁLEZ, J.; MURILLO, M.; SALIDO, G. **Fisiología Veterinaria**. Mc. Graw-Hill. Interamericana de España: Madrid, España. 840-860 pp. 1995.
- [14] NATERA B., H.N. Comparación de tres métodos para la determinación de actividad cíclica en vacas multíparas pastoreando en condiciones de sabanas bien drenadas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (Tesis de grado). Maracay, Venezuela. 75 pp. 2002.
- [15] GONZÁLEZ-STAGNARO, C.; GOICOCHEA, J. Impacto fisiológico de la determinación de progesterona en relación con la pubertad y el postparto. En: **Seminario Arcall III. Mejora de la eficiencia Reproductiva y de la sanidad del ganado por medio de Radioinmunoanálisis y técnicas conexas**. Maracay, Venezuela. 16 pp. 1987.
- [16] GONZÁLEZ-STAGNARO, C.; SOTO, E.; GOICOCHEA, J.; GONZÁLEZ, R.; SOTO, G. Identificación de los factores causales y control del anestro, principal problema reproductivo en la ganadería mestiza de doble propósito. **Premio Agropecuario Banco Consolidado**. Girarz, Maracaibo. Venezuela. 90 pp. 1988.
- [17] GONZÁLEZ-STAGNARO, C. Fisiología Reproductiva en Vacas Mestizas de Doble Propósito. En: **Ganadería mestiza de doble propósito**. González-Stagnaro, (Eds). Capítulo VIII. Editorial Astro Data S.A. Maracaibo. Venezuela. 153-188 pp. 1992.
- [18] HARDIN, D.; WARNICK, A.; WISE, T.; SCULTZ, R.; FIELDS, M. Artificial insemination of sub-tropical commercial beef cattle following synchronization with cloprostenol (ICI80996):I. Fertility. **Theriogenol.** 14: 249-258. 1980.
- [19] HERRERA, P. Efecto de la suplementación postparto sobre parámetros productivos de vacas doble propósito.

- Universidad Nacional Experimental Simon Rodríguez, Estación Experimental La Iguana, Estado. Guárico. (Trabajo de ascenso). 84 pp. 1996.
- [20] HUNTER, R. H. F. Time of ovulation in indigenous breeds of cattle in the tropics. Experimental methodology for its detection. **Anim. Breed. Abstr.** 54: 533-538. 1986.
- [21] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. (IAEA). **Proceeding of the final research coordination meeting of the FAO/IAEA.** Coordinated research programme on use of RIA and related techniques to identify ways of improving Artificial Insemination programmes for cattle reared under tropical and sub-tropical conditions, Uppsala, 10-14 May. Sweden. 218 p. 1999.
- [22] KING, G. Sexual behaviour in cattle. In: **Studies on the reproductive efficiency of cattle using RIA techniques.** IAEA, Vienna, Austria. 59-71 pp. 1990.
- [23] LANDIS, J. R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometr.** 33: 159-179. 1977.
- [24] NACHREINER, R.F.; OSCHMAN, S.J.; EDQVIST, L.E.; RICHARDS, J.I. Solid-phase radioimmunoassay (RIA) appropriate for use in developing countries. En: **Nuclear and related techniques in animal production and health.** IAEA, Vienna. 653-659 pp. 1986.
- [25] MCDONALD, E. **Reproducción y Endocrinología Veterinaria.** Editorial Interamericana. 4^{ta} Ed. México D.F., México. 294-344. pp. 1991.
- [26] MAI, H.; OGWU, D.; EDUVIE, L.; VOH, A. Detection of oestrus in *Bunaji* cows under field conditions. **Trop. Anim. Health and Prod.** 34(1): 35-47. 2002.
- [27] MATA, D. Suplementación estratégica de bovinos pastoreando sabanas naturales.. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. Diciembre (Tesis Doctoral). 115 pp. 1992.
- [28] MORROW, D.; SWANSON, L.; HALFS, H. Estrous behavior and ovarian activity in peripuberal heifers. **Theriogenol.** 6: 427-435 pp. 1976.
- [29] NEBEL, R.; DRANSFIELD, M.; JOST, S.; BAME, J. Automated electronic systems for the detection of oestrus and timing of IA in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 60-61: 713-723 pp. 2000.
- [30] NELSEN, T.C.; SHORT, R.E.; PHELPS, D.A.; STAIGMILLER, R.B. Nonpuberal estrus and mature cow influences on growth and puberty in heifers. **J. Anim. Sci.** 61: 470-473 pp. 1985.
- [31] ORIHUELA, A. Some factors affecting the behavioural manifestation of estrus in cattle: a review. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 70:713-723. 2000.
- [32] OTT, R. S.; BRETZLAFF, K. N.; y HIXON, J. E. Comparison of palpable corpora lutea with serum progesterone concentrations in cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 188:1417-1420. 1986.
- [33] PELISSIER, C. L. Dairy cattle breeding problems and their consequences. **Theriogenol.** 6:575. 1976.
- [34] PLAIZIER, J. Validation of the FAO/IAEA RIA kit for the measurement of progesterone in skim milk and blood plasma. En: **Improving the productivity of indigenous African Livestock.** IAEA-TECDOC-708, IAEA, Vienna. 151-156 pp. 1993.
- [35] PULIDO, A.; ZARCO, L.; GALINA, C.; MURCIA, C.; FLORES, G.; POSADAS, E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. **Theriogenol.** 35: 965-975. 1991.
- [36] RANDEL, R. Serum progesterone levels during the oestrous cycle in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. En: Interrelationship of endocrine and Physiological events during the estrous cycle in Brahman cattle. **Overton Tech. Rep.** 80:2-8. 1980.
- [37] REED, M.; ROUSSEL, J., SEYBT, S. Repeatability of blood serum progesterone levels in dairy heifers on day of the estrous cycle. **Theriogenol.** Vol. 24:634-646. 1985.
- [38] ROA, N; LINARES, T; DE ROLO, M., TAMASOUKAS, R. Comparación de la técnica de ELISA vs. RIA en la determinación de progesterona plasmática sanguínea de bovinos. **Archiv. Latinoam. de Prod. Anim. (ALPA).** 5(Supl. 1): 412-414. 1997a.
- [39] ROA, N.; LINARES, T.; BARRIOS, D.; RAMÍREZ DE ROLO, M.; TAMASOUKAS, R. Determinación de progesterona plasmática por el método de ELISA en receptoras de embriones bovinos. **Rev. Científ. FCV- LUZ.** VII, (2): 133-138. 1997b.
- [40] ROA, N.; FUENMAYOR, C. Curso básico de inseminación artificial en bovinos. **INIA. Serie D** Nº 1. Maracay, Venezuela. 52 pp. 2001.
- [41] RODRÍGUEZ H. T. Momento óptimo de inseminación artificial en celo natural y sincronizado en bovinos. En: **Reproducción Bovina.** C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girar, Maracaibo-Venezuela. Cap. XVII: 282-297 pp 2001.
- [42] SALISBURY, G.; VAN DEMARK, N.; LODGE J. **Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos.** Editorial Acribia. Zaragoza, España. 53-79 pp. 1978.
- [43] SEPÚLVEDA, N.; RODERO, E. Evaluación de la detección de celo en explotaciones lecheras. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XII(3): 169-174. 2002.

- [44] SEPÚLVEDA, N. Eficiencia reproductiva en vacas lecheras. **Frontera Agríc.** 3: 47-50. 1995.
- [45] DOUGLAS, A. Some common problems in medical research. En: A. Douglas (Ed.) **Practical statistics for medical research.** Chapman & Hall Ed. London, UK. 396-439 pp. 1995.
- [46] SOTO, H.; GONZÁLEZ, B.; GODOY, S.; BELLO, A.; BRETANA A. Palpación transrectal y cuantificación de progesterona sérica en la evaluación de la actividad ovárica de bovinos mestizos explotados en condiciones tropicales. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** X(1): 56-62. 2000.
- [47] TROCÓNIZ, J. Duración del ciclo estral, del celo y momento de ovulación en novillas Brahman. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay. (Trabajo de Ascenso). 52 pp. 1976.
- [48] VAHDAT, F.; HURTGEN, J.; WHITMORE, H.; JOHNSTON, S.; KETELSEN, C. Effect of time and temperature en bovine serum and plasma progesterone concentration. **Theriogenol.** 12:371-374. 1979.
- [49] VAN VLIET, J.; VAN EEDENBURG. Sexual activities and Oestrus detection in lactation Holstein cows. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 50:57-69. 1996.