

EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD DE HEMBRAS *Bos indicus*, DE ACUERDO A LA INTENSIDAD DEL CELO, MANEJADAS EN UN PROGRAMA DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN CONDICIONES DE TRÓPICO

Fertility Assessment of *Bos indicus* Cows According to the Estrus Intensity, in a Fixed Time Artificial Insemination Program Under Tropical Conditions

Liliana Alonso Alanuza¹, Carlos Salvador Galina Hidalgo¹, Martín Maquivar Linfoot², Juan José Romero Zúñiga³, Iván Molina Echeverry¹ y Paula Carvajal Arango¹

¹Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

²Department of Animal Science, The Ohio State University. Columbus, Ohio, USA. ³Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Heredia, Costa Rica. Telefax: (506) 22602155, Apartado postal: 304-3000 Heredia, Costa Rica.

E-mail: jromero@medvet.una.ac.c.r.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la fertilidad obtenida en un hato, según dos tiempos de Inseminación Artificial (IA) a tiempo fijo: 48 y 72 horas, posterior a un programa de sincronización de celos, tomando en cuenta las manifestaciones y la intensidad del estro. Se utilizaron 114 hembras *Bos indicus*, sincronizadas con 2mg de benzoato de estradiol más un implante intravaginal de progesterona (CIDR), que permaneció *in situ* por 9 días. Al retiro del CIDR, los animales fueron divididos en 2 grupos: 61 y 53 hembras, que fueron inseminadas 48 horas y 72 horas postratamiento, respectivamente. Todas fueron observadas continuamente durante 90 horas, con el fin de detectar el comportamiento sexual y clasificarlas, de acuerdo a la intensidad del celo, en dos categorías: alta y baja. Se utilizó la prueba de Ji-cuadrado para la comparación de proporciones. El porcentaje de hembras con manifestación estral fue de 68,4%, sin diferencia entre las categorías alta y baja intensidad (37,7 y 30,7%, respectivamente). El 85,4% de los animales con signos de estro ovuló, diferente de las hembras sin manifestación estral, con 63,8% ($P<0,05$). El porcentaje global de preñez fue 25,4%; el 86,2% de estas gestaciones corresponde al grupo de hembras que manifestaron conducta estral. De acuerdo al momento de IA y la intensidad del estro, los porcentajes de gestaciones para IA a 48 horas fueron 1) alta: 91,6%, 2) baja: 84,6% ($P<0,05$) y 3) sin celo: 25%, por su par-

te, en las hembras inseminadas a las 72 horas los porcentajes fueron: 1) alta: 8,4%, 2) baja: 15,4% y 3) sin celo: 75% ($P<0,05$). Se concluye que las hembras con expresión estral tienen mayor oportunidad de preñarse tras la IA a 48 horas postratamiento hormonal, mientras que en los animales sin manifestación de estros, los mayores porcentajes de gestaciones son a las 72 horas.

Palabras clave: Inseminación artificial, tiempo fijo, preñez, *Bos indicus*, sincronización

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the fertility obtained in a herd, according to two times of fixed time AI: 48 and 72 hours, following an estrus synchronization program, taking into consideration the manifestations and the intensity of estrus. One hundred and fourteen *Bos indicus* females were used; synchronized with 2mg of estradiol benzoate and a progesterone-releasing intravaginal device (PRID), which remained *in situ* for 9 days. After the removal of the PRID, the animals were divided into two groups: 61 and 53 females that were inseminated, respectively, 48 and 72 hours posttreatment. All were continuously observed for 90 hours, with the objective of detecting sexual behavior and classifying them according to heat intensity into two categories: high and low. Chi-square test was used for the comparison of proportions. The percentage of females with estrus manifestation was 68.4%, without difference between high and low intensity categories (37.7 and 30.7%, re-

spectively). Of the animals with signs of estrus, 85.4% ovulated; different from the females without estrus manifestation, with 63.8% ($P < 0.05$). Global pregnancy rate was 25.4%; 86.2% of these gestations correspond to the group of females that manifested estral behavior. According to the moment of AI and the intensity of the estrus, the percentages of pregnancy for AI at 48 hours were 1) high: 91.6%, 2) low: 84.6% ($P < 0.05$) and 3) without estrus: 25%, on the other hand, in females inseminated at 72 hours, the percentages were: 1) high: 8.4%, 2) low: 15.4% and 3) without estrus: 75% ($P < 0.05$). It is concluded that females with estral manifestation are more likely to get pregnant after AI at 48 hours following hormonal treatment, while for animals without estral manifestation, the higher pregnancy percentages are at 72 hours.

Key words: Artificial insemination, fixed time, pregnancy, *Bos indicus*, synchronization

INTRODUCCIÓN

Dentro de las principales causas que provocan baja fertilidad en el ganado bovino (*Bos taurus-indicus*) está la pobre detección del celo [7, 24], que ha sido considerada como la principal responsable del incremento en los días abiertos cuando se implementa un programa de inseminación artificial (IA) [26]. Aunado a esto, la necesidad de utilizar animales *Bos indicus* en ambientes subtropicales o tropicales, puede reducir la eficiencia de la sincronización e IA, comparada con animales *Bos taurus* [10, 14]. Posibles explicaciones a esta diferencia, pueden residir en las fallas al detectar celos, así como el comportamiento característico del ganado cebuino, en que la interrelación entre vacas dominantes y subordinadas juega un papel importante en la manifestación de signos sexuales [18], lo que dificulta la implementación de programas basados en la detección de celos espontáneos.

Para solucionar dicha problemática, se ha empleado el uso de tratamientos sincronizadores de celos con el fin de homogeneizar el periodo de presentación del celo dentro del grupo y, con esto, establecer el tiempo óptimo de IA [19]. Dentro de los protocolos más utilizados, y con el que se han obtenido mejores resultados, están los que emplean dispositivos con progesterona (P_4), estradiol y/o prostaglandina $F_{2\alpha}$ [1, 2]. Desafortunadamente, en ganado cebuino se ha demostrado que, a pesar de realizar una sincronización de celos, éstos tienden a formar grupos de interacción sexual independientemente del tiempo esperado de manifestación del celo [15, 23]. Estas variaciones afectan directamente el momento de la ovulación, el cual es un factor determinante en el éxito de la IA [22], dado que al no poder conocer el momento justo de inicio de las conductas sexuales, la IA puede realizarse a destiempo de acuerdo al periodo de receptividad sexual así como de la ovulación [25]. Asimismo, aunque se ha considerado el inicio del celo como un indicador del momento en el cual se dará la ovulación, esta relación puede ser mucho más variable de lo reportado [12, 27].

Como una alternativa para superar estas deficiencias en la detección del celo, surge la sincronización con IA a tiempo fijo (IATF), en la cual cobra especial importancia el tiempo estimado del momento de ovulación con respecto al tiempo de finalizado el tratamiento hormonal. No obstante, se ha demostrado que los índices de fertilidad logrados con IATF no superan los alcanzados por otros protocolos de IA cuya base es la detección del celo [11, 24]. Asimismo, el hecho de que en ganado cebú sea necesaria la interacción sexual entre hembras, pueden provocar que se retrase, adelante o, incluso, se prolongue el periodo de receptividad sexual ocasionando variación en el tiempo de ovulación independientemente del periodo estimado para dicho evento [15, 23].

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar, en un programa de IATF con dos tiempos de inseminación (48 y 72h), cuando se presentaban los signos de celo para así estimar si el tiempo de inseminación era acorde a la presentación de celo y su intensidad, tomando como parámetro la fertilidad obtenida en el grupo de animales tratados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El experimento se realizó en el módulo de producción de vaquillas perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), situado en Martínez de la Torre, Veracruz (México), ubicado a 20°4' LN y 97°3' LO. La altura sobre el nivel del mar es de 151 m. El clima se clasifica como caliente y húmedo, con lluvias todo el año, sin una estación seca definida [8]. La precipitación pluvial media anual es de 1991 mm³ y la temperatura promedio anual es de 23,7°C, con un rango entre 14 y 35°C [8].

Animales

Se utilizaron 114 hembras multíparas del tipo *Bos indicus*, con números de parto entre 2 y 6, las cuales presentaban una condición corporal promedio de 3,0 de acuerdo a la escala de 1 a 5, donde 1 representa una vaca emaciada y 5 una vaca obesa. El peso promedio de las vacas fue de 405 ± 58,8 kg. A partir de los niveles de progesterona obtenidos de las muestras sanguíneas tomadas previos al inicio del tratamiento hormonal, se determinó que el 77,2% (88/114) se encontraban ciclando al comienzo del protocolo de sincronización. Vacas con niveles de P_4 iguales o mayores a 0,5 ng/mL fueron clasificados con cuerpo lúteo funcional [7].

Los animales se dividieron en dos grupos de 61 y 53 animales. El primer grupo fue inseminado artificialmente a las 48 horas (IA 48h) y el segundo grupo a las 72 horas (IA 72h) post retiro del implante. No hubo diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre los grupos experimentales para las variables de condición corporal, días posparto, patrón racial, número de partos y el porcentaje de animales ciclando al inicio del experimento,

con lo que se redujo el efecto de esas variables sobre el resultado del estudio. Las inseminaciones fueron realizadas por la misma persona en todos los animales de ambos grupos. El semen procedía de 3 toros de una compañía comercial de venta de semen con calidad probada y evaluación antes de su venta, el cual fue previamente analizado para evaluar aspectos de motilidad y morfología espermática, siendo clasificados todos en la categoría de potencial satisfactorio.

Sincronización

Los animales fueron sincronizados mediante un implante intravaginal de progesterona (Eazy-breed CIDR™, con 1,9g de progesterona natural en silicona, Pfizer®, México), que permaneció *in situ* por 9 días. Al momento de la colocación del implante se aplicó una inyección intramuscular de 2 mg. de benzoato de estradiol (Cidirol™).

Detección de conductas de celo

Una vez retirado el implante, las vacas fueron observadas continuamente durante 90 horas con el fin de detectar aquellas que exhibieran comportamiento de celo y registrar las variaciones en su conducta. Esta labor fue realizada por 8 observadores, ubicados en parejas, en turnos de tres horas por período de observación, tal como lo describen Orihuela y col. [17]. Asimismo, se contó el número de montas realizadas durante el período de actividad sexual de cada animal para clasificar a las hembras de acuerdo a la intensidad del celo en dos categorías: 1) alta intensidad (≥ 20 montas) y 2) baja intensidad (1-19 montas).

Evaluación reproductiva

Con el objetivo de calcular el porcentaje del hato que estaba ciclando, se tomaron muestras sanguíneas una semana antes de colocar el implante. Del mismo modo, 11 días posteriores al retiro del progestágeno, se tomó otra muestra para corroborar que hubieran ovulado. Estas muestras fueron analizadas por medio de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida con el fin de detectar valores séricos de progesterona (P4). Niveles de P4 $> 0,5\text{ng/mL}$ indicaban la presencia de un CL funcional [7].

Análisis estadístico

Se calculó, de manera global y para cada grupo, la proporción de animales que mostraron celo, así como el número y variaciones de conductas sexuales. Adicionalmente, se compararon los porcentajes de ovulación y gestación de ambos grupos, por medio de la prueba de Ji cuadrado para muestras independientes [4].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La principal causa de la disminución en la eficiencia reproductiva, medida a través del porcentaje de preñez, ha sido la pobre detección de celos, no solo por la dificultad en determinar su inicio, sino también en su intensidad [6].

En el presente estudio, después de la sincronización estral con progesterona más estrógenos, el porcentaje global de manifestación de celo fue 68,4%, sin diferencia entre las categorías alta y baja intensidad, siendo 37,7 y 30,7%, respectivamente (FIG. 1). Este resultado es similar al obtenido por Díaz y col. [5], quienes encontraron un 61% de animales con actividad sexual después de retirado el implante de progesterona, pero difiere parcialmente del reporte de Porras y col. [20] quienes mencionan que, bajo condiciones de trópico, el uso de progestágenos permite la expresión del estro de hasta un 80% de los animales. Estas discrepancias pueden deberse al comportamiento característico del ganado *Bos indicus*, en el cual, tanto la intensidad como la duración en la manifestación sexual es menor en comparación con ganado europeo [3, 13]. Asimismo, tal como lo reportan Orihuela y col. [17], en el ganado cebú especialmente, el tiempo dedicado a la observación de celos influye directamente en su eficacia. Es probable que la variación en los resultados entre estudios, pueda explicarse en que el tiempo dedicado a la observación de celos haya sido diferente.

El tiempo promedio para el inicio de las manifestaciones de celo fue 43,2 horas posteriores al retiro del implante, sin diferencia entre los grupos de acuerdo a la categoría en las que fueron agrupadas según la intensidad del celo, siendo 39,7 y 47,4 horas para alta y baja intensidad, respectivamente. En promedio, las hembras de alta intensidad iniciaron antes la manifestación de celo; asimismo, alargaron su período de actividad respecto a las vacas de baja intensidad, con 21,7 y 12,7 horas, respectivamente ($P < 0,05$) (FIG. 2).

La existencia de una alta demanda de compañeras de monta, como ocurre con los celos sincronizados, hace que las hembras jerárquicamente inferiores sean eliminadas del grupo sexualmente activo [17], lo que puede contribuir a que algunas hembras se vean inhibidas en su manifestación estral, dando como resultado que la expresión de estos signos sean menos visibles, tanto en duración como en intensidad. Estas condiciones pueden ser responsables de la variabilidad observada en este estudio en cuanto al tiempo de receptividad sexual; así, en hembras clasificadas como de alta intensidad hubo una manifestación de celo por más tiempo en comparación con las de baja intensidad (21,7h y 12,7h, respectivamente). Esto podría deberse a que el ganado *Bos indicus* necesita formar grupos de interacción estral, por lo que al ser las hembras de alta intensidad las que iniciaran la manifestación de celo, tuvieron que alargar su período de receptividad sexual para poder agruparse con el resto de las hembras.

El porcentaje de ovulaciones, según los niveles de P4, en animales con signos manifiestos de estro fue 85,9% (67/78) siendo diferente con respecto a las hembras sin manifestación estral, cuyo porcentaje de ovulación fue 63,8% (23/36) ($P < 0,05$). No hubo diferencia en el porcentaje de ovulación entre las categorías de intensidad estral de las hembras ($P > 0,05$) (FIG. 3).

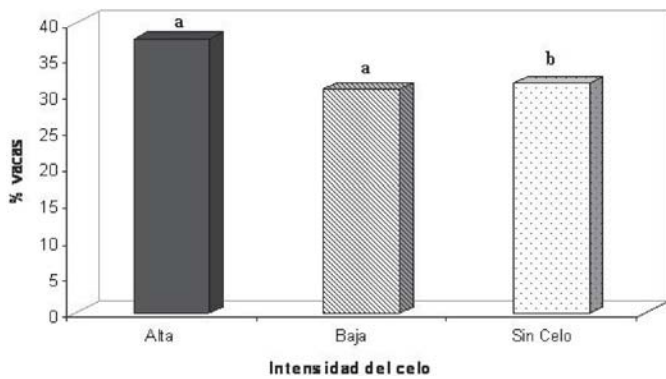


FIGURA 1. PORCENTAJES DE MANIFESTACIÓN DE CELO DE ACUERDO A LA INTENSIDAD (LITERALES DISTINTOS INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA A UNA SIGNIFICANCIA DE 0,05) / PERCENTAGES OF ESTRUS ACCORDING TO INTENSITY (DIFFERENT LETTERS INDICATE STATISTICAL DIFFERENCE AT A SIGNIFICANCE OF 0.05).

Diversos estudios han corroborado que el porcentaje de ovulaciones y, por ende, la fertilidad en un hato, estarán directamente afectadas por la presentación de signos de celo y no tanto por el tratamiento hormonal utilizado o los tiempos fijos de IA aplicados [16, 28]; así, en el presente estudio, del 68,4% de los animales que manifestaron estro, el 85,9% culminaron este evento con la ovulación, lo cual concuerda con estudios que mencionan que alrededor del 80% de las hembras que mostraron estro ovulaban independientemente de la intensidad de este [9]. Asimismo, es importante considerar que a pesar de realizarse observación continua de las manifestaciones estrales, existen vacas que ovulan, pese a no presentar conductas de celo; tal como en el 36,1% de las vacas que no mostraron celo en el presente estudio. Esta sería una de las principales ventajas de la IATF.

El porcentaje final de preñez en el estudio fue 25,4%, correspondiendo el 86,2% de estas gestaciones al grupo de hembras que manifestaron conducta estral. Según la categoría de intensidad en la expresión de celo, los porcentajes de preñez fueron: 1) alta: 27,9%, 2) baja: 37,2 y 3) sin celo: 11,1%. Estos porcentajes fueron diferentes entre hembras con o sin signos manifiestos de estro, pero no entre las categorías de intensidad estral (FIG. 4).

Entre los dos tiempos de IA, en hembras con manifestación de celo, el porcentaje más alto de preñez fue el obtenido tras la inseminación a las 48 horas posteriores al retiro del implante (91,6 y 84,6% para alta y baja intensidad respectivamente) con respecto a las inseminadas a las 72 horas (8,4 y 15,4% alta y baja intensidad, respectivamente). Sin embargo, en las hembras sin expresión estral, esta situación fue diferente, siendo las vacas inseminadas a las 72 horas en las que se obtuvo una mayor tasa de gestación (75%) con respecto al obtenido en las inseminadas a las 48 horas (25%).

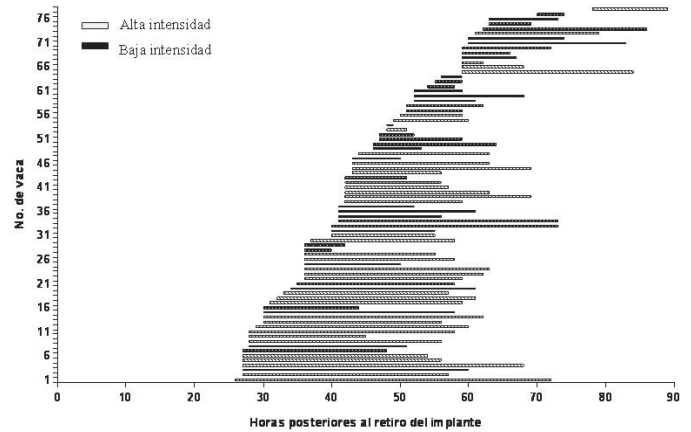


FIGURA 2. CADENAS DE ACTIVIDAD ESTRAL DE ACUERDO AL INICIO Y DURACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL CELO / PATTERN OF ESTROUS ACTIVITY ACCORDING TO THE DURATION OF ESTRUS.

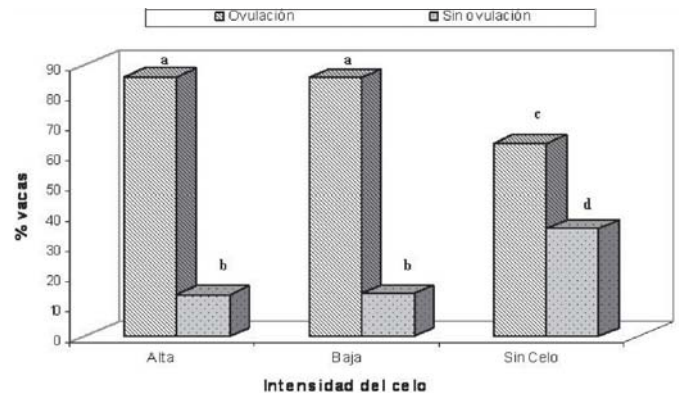


FIGURA 3. PORCENTAJE DE OVULACIÓN DE ACUERDO A LA PRESENTACIÓN E INTENSIDAD DEL CELO (LITERALES DISTINTOS INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA A UNA SIGNIFICANCIA DE 0,05) / OVULATION PERCENTAGE ACCORDING TO THE ONSET OF ESTRUS (DIFFERENT LETTERS INDICATE STATISTICAL DIFFERENCE AT A SIGNIFICANCE OF 0.05).

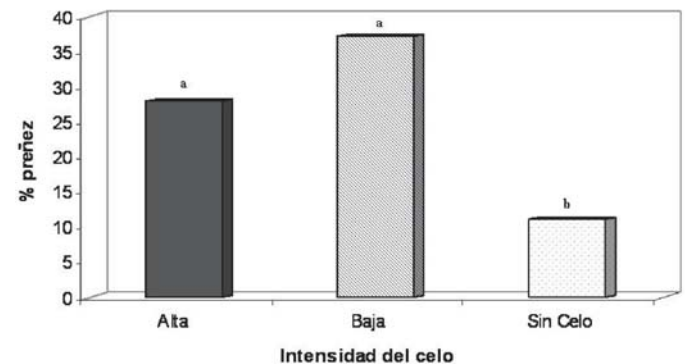


FIGURA 4. PORCENTAJE DE PREÑEZ DE ACUERDO A LA MANIFESTACIÓN DE CELO (LITERALES DISTINTOS INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA A UNA SIGNIFICANCIA DE 0,05) / PERCENTAGE OF PREGNANCY ACCORDING TO ESTRUS (DIFFERENT LETTERS INDICATE STATISTICAL DIFFERENCE AT A SIGNIFICANCE OF 0.05).

El hecho de que la hora promedio de inicio en la manifestación estral haya sido a las 43,2 horas de retirado el implante, pudo haber contribuido a que los porcentajes de preñez en hembras con expresión estral haya sido superior en las IA a las 48h.

En el total de animales, sin tomar en cuenta si presentaron signos de estro, hubo diferencia significativa en los porcentajes de gestación de acuerdo a la intensidad del estro y al momento de IA, siendo muy superiores en las vacas inseminadas a las 48 horas (alta: 91,6%, baja: 84,6%, sin celo: 25%), respecto a las inseminadas a las 72 horas (alta: 8,4%, baja: 15,4%, sin celo: 75%). Para el grupo de animales con expresión estral, la diferencia se dio en los porcentajes de gestación obtenidos tras la IA a las 72 horas, así como en ambos tiempos de inseminación en el grupo de vacas sin manifestación estral ($P < 0,05$) (FIG. 5).

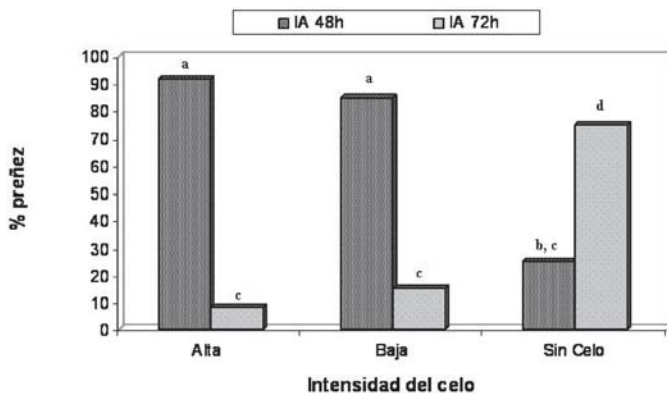


FIGURA 5. PORCENTAJE DE GESTACIÓN DE ACUERDO A LA INTENSIDAD DEL CELO Y HORA DE IA / PERCENTAGE OF PREGNANCY ACCORDING TO ESTRUS INTENSITY AND TIME OF AI.

CONCLUSIONES

A pesar de que en el presente estudio se utilizaron dos modelos de IATF luego de un protocolo tradicional de sincronización (progesterona más estrógenos), se evidencia que hembras con expresión estral tienen mayor oportunidad de quedar preñadas tras la inseminación a las 48 horas de finalizado el tratamiento hormonal, contrario a los animales sin manifestación de estro, en que los mayores porcentajes de gestaciones es a las 72 horas, hallazgo que podría constituirse en un insumo más a la hora de decidir el tiempo de inseminación y el protocolo de sincronización para incrementar la eficiencia reproductiva del hato. Sin embargo, la razón fisiológica de la diferencia observada en esta investigación merece futuros estudios.

AGRADECIMIENTO

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicos (PAPIIT) Programa PAPIIT IN200107, por su apoyo económico para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; TRÍBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos de carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. **Rev. Taurus.** 14: 10-21. 2002a.

[2] BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; TRÍBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos de carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. **Rev. Taurus.** 15: 17-32. 2002b.

[3] BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 78:307-326. 2003.

[4] DANIEL, W. Bioestadística: **Base para el análisis de las ciencias de la salud.** (Prueba de independencia). Limusa-Wiley, México. 588-600 pp. 2005.

[5] DÍAZ, G.S.; GALINA, C.S.; BASURTO, CH.; OCHOA, G.P. Efecto de la progesterona natural con o sin la adición de benzoato de estradiol sobre la presentación de celo, ovulación y gestación en animales tipo *Bos indicus* en el trópico mexicano. **Arch. Med. Vet.** 34: 283-286. 2002.

[6] DRANSFIELD, G.; NEBEL, L.; PERSON, E.; WARNICK, D. Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System. **J. Dairy Sci.** 81:1874-1882. 1998.

[7] GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review on Cattle Reproduction in the Tropics. Part 4. Oestrous Cycles. **Anim. Breed. Abst.** 58:697-707. 1990.

[8] DIAZ, G.S.; GALINA, C.S.; BASURTO, C.H.; OCHOA, G.P. Efecto de la progesterona natural con o sin la adición de benzoato de estradiol sobre la presentación de celo, ovulación y gestación en animales tipo *Bos indicus* en el trópico mexicano. **Arch. Med. Vet.** 34: 283-286. 2002.

[9] GÜMEN, A.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Follicular Size and Response to Ovsynch versus Detection of Estrus in Anovular and Ovular Lactating Dairy Cows. **J. Anim. Sci.** 86:3184-3194. 2003.

[10] HIERS, E.A.; BARTHLE, C.R.; DAHMS, M.K.V.; PORTILLO, G.E.; BRIDGES, G.A.; RAE, D.O.; THATCHER, W.W.; YELICH, J.V. Synchronization of *Bos indicus* x *Bos taurus* cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin $F_{2\alpha}$ in combination with melengestrol acetate. **J. Anim. Sci.** 81:830-835. 2003.

[11] JORDAN, E.R.; SHOUTENT, M.J.; QUAST, J.W.; BLSCHNER, A.P.; TOMASZEWSKI, M.A. Comparison of

- Two Times Artificial Insemination (TAI) Protocols for Management of First Insemination Postpartum. **J. Dairy Sci.** 85:1002-1008. 2002.
- [12] KAIM, M.; BLOCH, A.; WOLFENSON, D.; BRAW-TAL, R.; ROSENBERG, M.; VOET, H.; FOLMAN, Y. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. **J. Dairy Sci.** 86(6):2012-21. 2003.
- [13] LANDAETA-HERNANDEZ, A.J.; YELICH, J.V.; LEMASTER, J.W.; TRAN, T.; FIELDS, M.J.; CHASE, J.R.; C.C.; RAE, D.O.; CHEMNOWETH, P.J. Environmental, genetic and social factors affecting the expression of estrus in beef cows. **Theriogenol.** 57:1357-1370. 2002.
- [14] LEMASTER, J.W.; YELICH, J.V.; KEMPFER, J.R.; FULLENWIDER, J.K.; BARNETT, C.L.; FANNING, M.D.; SELPH, J.F. Effectiveness of GnRH plus prostaglandin F_{2α} for estrus synchronization in cattle of *Bos indicus* breeding. **J. Anim. Sci.** 79:309-316. 2001.
- [15] MAQUIVAR, M.; GALINA, C.S.; ORIHUELA, A. Cows treated with Synchronate B may cluster their sexual behaviour independent of follicular growth at the time of oestrus. **Physiol. and Behav.** 76:199-203. 2002.
- [16] MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 67:221-229. 2001.
- [17] ORIHUELA, A.; GALINA, C.S.; ESCOBAR, F.J.; RIQUELME, E. Estrous behavior following prostaglandin F_{2α} injection in Zebu cattle under continuous observation. **Theriogenol.** 19:795-808. 1983.
- [18] ORIHUELA, A. Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 70:1-16. 2000.
- [19] PEELER, I.D.; NEBEL, R.L.; PEARSON, R.E.; SWECKER, W.S.; GARCIA, A. Pregnancy rates after timed AI of heifers following removal of intravaginal progesterone inserts. **J. Dairy Sci.** (87):2868-2873. 2004.
- [20] PORRAS, A.; GALINA, C. Utilización de progestágenos para la manipulación del ciclo estral bovino. **Vet. Méx.** 23:31-36. 1992.
- [21] PULIDO, A.; ZARCO, L.; GALINA, C.S.; 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.
- [22] ROELOFS, J.B.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; SOEDE, N.M.; KEMP, B. Various behavioural signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenol.** 63:1366-1377. 2005.
- [23] SOLANO, J.; ORIHUELA, A.; GALINA, C.S.; MONTIEL, F. Sexual behaviour of Zebu cattle (*Bos indicus*) following estrous induction by Synchro-Mate B, with or without estrogen injection. **Physiol. and Behav.** 71:503-508. 2000.
- [24] TENHAGEN, B.A.; KUCHENBUCH, S.; HEUWIESER, W. Timing of Ovulation and Fertility with GnRH and Prostaglandin F_{2α}. **Reprod Dom. Anim.** 40: 62-67. 2005.
- [25] VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; KARTHaus, D.; TEVERNE, M.A.M.; MERICS, I.; SZENIC, O. The Relationship between Estrous Behavioural Score and Time of Ovulation in Dairy Cattle. **J. Dairy Sci.** 85:1150-1156. 2002.
- [26] VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenol.** 59:571-584. 2003.
- [27] WALKER, W.L.; NEBEL, R.L.; MCGILLIARD, M.L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** (79): 1555-1561. 1996
- [28] ZARCO, L.; HERNÁNDEZ, J. Momento de ovulación y efecto del intervalo entre el inicio del estro y la inseminación artificial sobre el porcentaje de concepción de vaquillas Holstein. **Vet. Méx.** 27:279-283. 1996.