

**INDUCCIÓN HORMONAL CONSECUTIVA DE LA LACTANCIA Y
FUNCIONES MATEMÁTICAS PARA CURVAS DE LACTANCIAS
INDUCIDAS EN VACAS HOLSTEIN**

EDGAR SEPÚLVEDA GONZÁLEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Unidad Laguna

Subdirección de Postgrado



Torreón, Coahuila, México

Junio del 2013.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Unidad Laguna

Subdirección De Postgrado

**INDUCCIÓN HORMONAL CONSECUTIVA DE LA LACTANCIA Y FUNCIONES
MATEMÁTICAS PARA CURVAS DE LACTANCIAS INDUCIDAS EN VACAS
HOLSTEIN**

TESIS

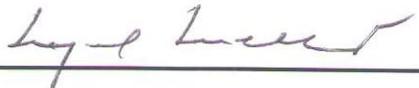
EDGAR SEPÚLVEDA GONZÁLEZ

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

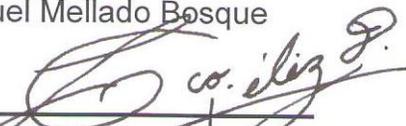
Comité particular de asesoría:

Director



Dr. Miguel Mellado Bosque

Asesor



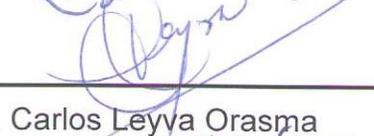
Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras

Asesor



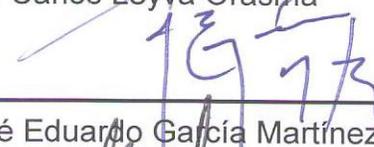
Dra. Ma. De Los Angeles De Santiago Miramontes

Asesor

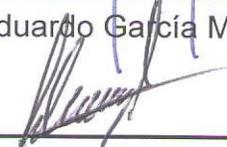


Dr. Carlos Leyva Orasma

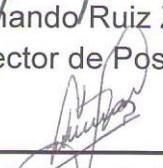
Asesor



Dr. José Eduardo García Martínez



Dr. Fernando Ruiz Zarate
Sub-director de Postgrado



Dr. Pedro Antonio Robles Trillo
Jefe del Departamento de Postgrado U.L.

Torreón, Coahuila, México

Junio del 2013

DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis lo dedico a mi hija María Clara Sepúlveda Moreno, a mi esposa Clara María Moreno Valdez y a mis padres Rodolfo Sepúlveda Chapa y Lydia González Campos, por haberme brindado un hogar lleno de amor, comprensión, enseñanzas, valores, paciencia, apoyo y confianza.

A Dios, a mi familia, hermanos y amigos, por acompañarme en los momentos más importantes y por haberme brindado su apoyo incondicional, cariño y comprensión a cada momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, mi “ALMA TERRA MATER”, ya que me brindó la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado, proporcionándome las herramientas necesarias para ello durante mi estancia en esta institución. A Dios porque en realidad fue Él quien me permitió cumplir con mis objetivos dándome salud, rodeándome de gente buena, capaz y cobijándome con su manto a cada momento de mi vida.

Agradezco especialmente a mi asesor principal: Dr. Miguel Mellado Bosque, por haberme brindado su apoyo, su experiencia y su conocimiento mostrado una

extraordinaria dedicación y compromiso para realizar este trabajo. También al Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras quien siempre fue pieza clave para mi aprendizaje, desarrollo de habilidades de investigación, además de un gran apoyo en todo momento, brindándome siempre su confianza y amistad. A la Dra. María De Los Ángeles de Santiago Miramontes, quien siempre mostró una gran disposición y por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia, en un marco de confianza, afecto y amistad, siendo fundamentales para concretar este trabajo. Al Dr. Carlos Leyva Orasma y al Dr. José Eduardo García Martínez, quienes fueron parte muy importante en mi formación académica y personal dentro de la institución. Agradezco al CONACyT, por haberme brindado su apoyo mediante su programa de becas.

INDICE

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2. HIPÓTESIS	5
3. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA GLANDULA MAMARIA.....	6
4.2. DESARROLLO DE LA GLANDULA MAMARIA.....	7
4.3. MAMOGENESIS	8
4.4. LACTOGENESIS Y GALACTOPOIESIS	9
4.5. IRRIGACIÓN DE LA GLANDULA MAMARIA	11
4.6. INVOLUCIÓN DE LA GLANDULA MAMARIA.....	12
4.7. INDUCCIÓN ARTIFICIAL A LA LACTANCIA	13
4.8. METODOS DE INDUCCIÓN	16
4.9. HORMONAS QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE ..	18
4.9.1. Estrógeno.....	19
4.9.2. Progesterona.....	20
4.9.3. Prolactina	21

4.9.4 Hormona Del Crecimiento	22
4.9.5. Glucocorticoides	23
4.9.6 Oxitocina	23
4.9.7. Lactogeno Placentario.....	24
4.9.8. Factores De Crecimiento.....	24
5. UTILIZACIÓN DE SEMEN SEXADO EN INSEMINACION ARTIFICIAL	25
6. MANUSCRITOS.....	32
6.1. Estudio I	32
6.2. Estudio II	49
7. LITERATURA CITADA.....	65

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Tabla 1. Milk traits of pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation during two consecutive lactation periods (n= 19).43

Figura 1. Estudio 1. Lactation curve for pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin throughout a 12-month lactation. Dots are monthly average milk yield of 334 cows. Among a variety of models tested, the Hoerl, Wood (shown) and Dhanoa models showed the better adjustment. R^2_{adj} =adjusted R^2 by the number of parameters in each model. AICC= Akaike information criterion.....44

Figura 2. Estudio 1. Lactation curve for pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin throughout a 18-month lactation. Dots are monthly average milk yield of 164 cows. Among a variety of models tested, an exponential model with five parameters showed the better adjustment. R^2_{adj} =adjusted R^2 by the number of parameters in each model. AICC= Akaike information criterion.....45

Figura 3. Estudio 1. Lactation curve for pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin throughout a 29-month lactation. Dots are monthly average milk yield of 22 cows. Among a variety of models tested, the rational model showed the better adjustment. R^2_{adj} =adjusted R^2 by the number of parameters in each model. AICC= Akaike information criterion.....46

Figura 1. Estudio 2. Seasonal variation in pregnancy per artificial insemination (P/AI) in Holstein heifers inseminated either with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. Dots and diamond are monthly P/AI means. Within months $*=P<0.05$, $**=P<0.01$59

Figura 2. Estudio 2. Seasonal variation in pregnancy per artificial insemination (P/AI) in high-milk yielding Holstein cows inseminated either with sex-sorted or conventional semen in a hot arid environment. Dots and diamond are monthly P/AI means. Within months $*=P<0.05$, $**=P<0.01$60

1. INTRODUCCIÓN

En la Región Noreste de México se encuentra ubicada la cuenca lechera más importante del País, dicho lugar es conocido como Región Lagunera, la cual está conformada por municipios de los Estados de Coahuila y Durango. El sector pecuario representó en 2011 una producción anual de aproximadamente 11 mil millones de pesos, tan solo en la Región Lagunera de ambos Estados, produciendo en ese año 2,272,220 mil toneladas de leche (SIAP, 2012). El sistema de explotación de leche es altamente especializado, siendo las vacas sujetas a una dieta que les permita lograr producciones de leche muy elevadas, con ordeñas tres veces por día y altas persistencias, lo cual se traduce en lactancias prolongadas (>400 días) en una alta proporción de las vacas.

Sin embargo, dicho sector se enfrenta a una diversidad de factores que impactan de manera negativa su actividad, estos factores van desde precios elevados de los insumos, disponibilidad y costo de alimentos, factores climáticos adversos, problemas sanitarios, etc. Debido a lo extenuante que puede considerarse la explotación del ganado lechero y la relación que guarda con las condiciones climáticas de extremo calor imperantes en la región, se han observado diferentes problemas derivados de ello, como problemas reproductivos, disminución en la producción de leche, disminución del contenido de sólidos de la leche en los meses más calurosos del año, enfermedades metabólicas y pódales, etc.

El efecto del estrés térmico sobre el ganado lechero deriva en un mayor número de vacas repetidoras, es decir, animales que requieren de un alto número (>5) de inseminaciones para lograr la gestación, disminución en la tasa de preñez, mortalidad embrionaria, etc. En una explotación especializada, las vacas que han sufrido de problemas reproductivos recurrentes o que no han logrado llegar satisfactoriamente al parto son desechadas, vendiéndose para abasto, lo que significa la consecuente pérdida de un animal con un alto potencial genético para producción de leche, y por ende, una pérdida económica importante. Además, uno de los factores que representa un gran costo para la actividad, es el abastecimiento de animales de remplazo en el hato, siendo este generado en los establos o importado de diferentes lugares como: Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos y Canadá.

La importación de animales de remplazo conlleva diferentes aspectos a analizar, como el posible riesgo sanitario derivado de la introducción de enfermedades exóticas al País, la adaptación de los animales a un clima muy diferente al de su lugar de origen, elevados costos de traslado, etc. Se considera que una alternativa para contrarrestar dichos problemas sería la inducción hormonal a la lactancia, permitiendo así evitar pérdidas involuntarias por desecho y obtener producciones considerables de leche de vacas que de una forma convencional se habrían desechado, desperdiciando su potencial genético y elevando los costos de producción. Las vacas inducidas a la lactancia pueden sostener producciones elevadas y sostenidas, cercanas a las de vacas en producción de manera natural (Macrina, *et al.*, 2011, Mellado *et al.*, 2011).

En los hatos lecheros, los problemas reproductivos parece ser una de las principales causas de desecho involuntario, lo que conduce a pérdidas productivas y económicas ya que estos problemas reducen el número de vacas de ordeño y, en consecuencia, afecta la producción de leche / ha / año. Por lo tanto, la inducción artificial a la lactancia es una de las herramientas para reducir la tasa de desecho involuntario, así como las pérdidas genéticas (Corradi, 2010).

Por otra parte, las condiciones climáticas extremas en la región Lagunera han dado lugar a que se dependa fuertemente de animales de reemplazo de lugares cercanos, e incluso se importan animales del extranjero. Lo anterior causa fuertes pérdidas económicas para los productores por los altos costos de los animales de reemplazo. Una forma de solucionar este problema es evitar o reducir la importación de becerras y producirlas en cantidades suficientes en los establos lecheros, esto a través del uso de semen sexado. Con esta tecnología el 90% de las crías nacidas son hembras (Seidel *et al.*, 1999; Mellado *et al.*, 2011), lo cual, aparte de aportar abundantes hembras para el establo, se disminuye la incidencia de distocia.

El uso de semen sexado es una tecnología que ha demostrado producir una mayor proporción de terneras de semen convencional (DeJarnette *et al.*, 2009). Debido a que las terneras son más valiosas que los terneros machos, el uso de semen sexado es económicamente atractivo, aunque la inseminación con semen sexado reduce la fertilidad (DeJarnette *et al.*, 2009), particularmente en vacas multíparas. La decisión de usar semen sexado debe ser de carácter económico

sobre la base de un análisis cuidadoso de los gastos de balance entre los costos adicionales (el semen sexado es más costoso que el convencional) y los ingresos potenciales.

Además del aumento del costo de semen sexado, la disminución del riesgo por concepción (CR) impide que algunos productores adopten esta tecnología. El riesgo por concepción disminuye de un 12 a 20% en comparación con el semen convencional. Debido a esta característica indeseable, el semen sexado ha sido utilizado principalmente y se recomienda su uso sólo en vaquillas (Seidel, 1999; 2007). Se desconoce el impacto de las condiciones climáticas sobre las tasas de preñez que pueden lograrse en las diferentes épocas del año. Por lo anterior, se consideró pertinente estudiar, también, el efecto de la época del año sobre la tasa de preñez con semen sexado.

2. OBJETIVOS

Comparar la producción láctea de vacas que fueron inducidas hormonalmente a la lactancia de manera consecutiva, entre su primer y segunda lactancia.

Determinar el modelo matemático más apropiado para su utilización en curvas de lactancias inducidas.

Determinar el efecto del mes de inseminación sobre la eficiencia en la reproducción en vacas y vaquillas inseminadas con semen sexado o semen convencional, sujetas a estrés térmico.

3. HIPOTESIS

La cantidad de leche producida durante la segunda lactancia inducida es similar a la obtenida durante la primera inducción hormonal a la lactancia.

Existen modelos matemáticos capaces de describir de manera satisfactoria curvas de lactancias de 12 meses o mayores.

Las tasas de preñez de las vacas Holstein sujetas a estrés térmico son diferentes en vacas y vaquillas inseminadas con semen sexado o semen convencional.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es una glándula epitelial exocrina, exclusiva de los mamíferos, que está extraordinariamente bien adaptada, cuantitativamente y cualitativamente, a las necesidades de crecimiento y a la conducta de cada especie. Tiene gran parecido histológico con otras glándulas epiteliales como las salivares y sudoríparas. La secreción de leche se describe habitualmente como la actividad de una fábrica celular (el lactocito) que se transforma en producto (la leche). El proceso se controla integralmente por sistemas hormonales autocrinos y neuroendocrinos. Su desarrollo se produce principalmente durante la gestación y el inicio de la lactación, involucionando muy rápidamente después del secado (Caja *et al.*, 2002; Rowson *et al.*, 2012).

Las glándulas mamarias son glándulas exocrinas cuya función es la transferencia de nutrientes de la vaca al ternero. En el caso de los bovinos la ubre consiste de 4 glándulas mamarias, las cuales se mantienen independientes una de otra, comprendiendo las siguientes estructuras anatómicas: 1) Una estructura externa formada por un aparato suspensorio, 2) una estructura interna que consta de un estroma (armazón de tejido conectivo) y un parénquima (parte epitelial y secretora) que por lo general, cuando se encuentra en reposo, presenta una coloración gris amarillenta o ámbar y cuando está en producción mantiene una

coloración rosa pálido, y por último, 3) los conductos, vasos sanguíneos y nervios (Reece, 2005).

4.2. DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

El desarrollo de la glándula mamaria se inicia en el feto en todas las especies mamíferas. En el feto bovino, desde el ectodermo, las líneas mamarias son visibles desde el día 35 (Meyer *et al.*, 2006a). Alrededor del tercer mes se forman los canales mamarios y los conductos excretorios y luego se forman los alvéolos. El sistema excretorio es completado al final del segundo trimestre de la vida fetal (Meyer *et al.*, 2006b). Durante el primer estadio postnatal, el proceso de crecimiento es a una tasa igual que el resto del cuerpo (crecimiento isométrico). Al comienzo del tercer mes la glándula mamaria comienza a crecer de 2 a 4 veces más rápido que el resto del cuerpo hasta la pubertad (crecimiento alométrico; Meyer *et al.*, 2005). Previo a la pubertad el tejido mamario es influenciado por factores de crecimiento y hormonas (Glauber, 2007).

En la edad adulta el ciclo de la lactación puede dividirse en periodos consecutivos: mamogénesis, lactogénesis, galactopoyesis e involución. Cada una de estas fases es determinada por un estricto control hormonal. En este proceso son tres categorías de hormonas las que están involucradas: 1) hormonas reproductivas (estrógenos, progesterona, lactógeno, placentaria, prolactina y oxitocina) actúan directamente sobre la glándula mamaria. 2) Hormonas del

metabolismo (hormona del crecimiento, corticosteroides, tiroides, insulina) que funcionan en distintas partes del cuerpo y a menudo tienen efecto sobre la glándula, y 3) hormonas de producción local que incluyen la hormona de crecimiento, prolactina, paratiroidea peptídica (PTHrp) y leptina (recientemente descrita, como una hormona con síntesis en el tejido adiposo pero también en la glándula mamaria), la PTHrp se expresa en células del epitelio mamario durante la lactación (Glauber, 2007).

4.3. MAMOGÉNESIS

Se cree que en los bovinos el desarrollo de las células secretoras se detiene al momento del parto. Es por lo anterior que el potencial de producción de leche depende en gran medida del crecimiento mamario durante la pubertad y el periodo previo al parto. El crecimiento durante la pubertad es menor que en el periodo previo al parto, sin embargo se considera que el crecimiento de la ubre en este periodo es determinante para una buena lactancia (Johnsson, 1988; Troccon y Petit, 1989; Waldo *et al.*, 1989).

Las Hormonas del metabolismo, factores de crecimiento y la prolactina son necesarias para el desarrollo de la glándula mamaria, especialmente las hormonas sexuales esteroideas. Durante la gestación, la proliferación del epitelio mamario es dependiente de estrógenos y progesterona. Los receptores específicos para esas hormonas se expresan en niveles muy bajos durante la mamogénesis o

lactogénesis. Los estrógenos también estimulan la secreción de IGF-I (Factor crecimiento de la insulina) a partir de las células del estroma de la glándula mamaria y causa el crecimiento de células epiteliales. La mamogénesis no se lleva a cabo en ausencia de prolactina y hormona de crecimiento (Glauber, 2007).

Las hormonas esteroidales requieren prolactina y hormona de crecimiento para la actividad mamogénica (Forsyth, 1986). En especies de laboratorio, se ha demostrado que inyecciones de prolactina promueven el buen desarrollo del sistema lóbulo-alveolar mamario (Sejrsen, 1994). Los efectos del estrógeno y la progesterona sobre la mamogénesis fueron evaluados extensivamente en los intentos para la inducción a la lactancia en vacas no gestantes, principalmente en los años 70s (Akers, 2006). Independientemente de la aplicación de técnicas moleculares de la biología de la glándula mamaria, se ha establecido que la prolactina y los glucocorticoides son estimuladores primarios de la diferenciación de células mamarias (Akers, 2006).

4.4. LACTOGÉNESIS Y GALACTOPOIESIS

La producción de leche es controlada por las hormonas lactogénicas prolactina y hormona del crecimiento (HC) durante la lactogénesis y lactopoiesis. La prolactina y la HC son esenciales para la transición de tejido a glándula mamaria lactante a través del dominio de HC sobre la prolactina durante la galactopoiesis en rumiantes a diferencia de humanos. En el mantenimiento de la

producción lechera o galactopoiesis, la prolactina (PRL) en la vaca lechera es de gran importancia. La acción de la prolactina es a través del epitelio mamario en forma directa o factores de transcripción, semejante a la HC que actúa en forma directa en la glándula o indirectamente con producción de IGF-I local o producida en el hígado. Las células mamarias bovinas presentan receptores IGF-I y II, receptores de insulina y proteínas de unión IGF (Glauber, 2007 Meyer *et al.*, 2006).

La lactogénesis conlleva 2 procesos: el primero de ellos consiste en estructuras limitadas y el otro es la diferenciación funcional del epitelio secretor durante el periodo inmediato del parto con el inicio abundante de síntesis y secreción de leche durante la lactancia (Collier *et al.*, 1975; Baldwin *et al.*, 1994; Akers, 2006; Norgaard *et al.*, 2008). Alteraciones en la actividad de las hormonas, o factores de crecimiento que modifiquen la glándula mamaria en las fases antes mencionadas, repercuten en la producción de leche (Akers, 2006; Finucane *et al.*, 2008). El proceso de la galactopoiesis y lactogénesis se ha inducido con tratamientos hormonales, tanto en bovinos (Mellado *et al.*, 2006) como en ovinos y caprinos (Mellado *et al.*, 1996; Salama *et al.*, 2007).

4.5. IRRIGACIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA

En general, las glándulas mamarias de un mismo lado reciben sangre de la arteria pudenda externa del lado correspondiente y sólo una pequeña parte de cada glándula recibe irrigación complementaria de la arteria pudenda interna. La arteria pudenda externa presenta dos gruesas ramas en la glándula mamaria conocidas como la arteria mamaria craneal y la arteria mamaria caudal, cuando atraviesa el anillo inguinal (Frandsen, 2009).

El parénquima mamario y su red de capilares se desarrollan en paralelo y comparativamente en una tasa más lenta desde la preñez. El desarrollo de conductos y bifurcaciones del parénquima mamario madura con el crecimiento mamario. El volumen sanguíneo se expande en el animal preñado y alrededor del 15% de la producción cardiaca está directamente relacionada con la unión placentario-fetal hasta el final de la gestación. Al momento del parto la mayoría del flujo es redireccionado del útero hacia la glándula mamaria. Un flujo sanguíneo adecuado de la glándula es esencial para la producción de leche, proporcionando los precursores necesarios en la síntesis de los componentes lácteos (Glauber, 2007).

Asimismo, otros órganos como el tracto gastrointestinal y el hígado, también usan parte de ese elevado volumen sanguíneo. La producción de CO₂ directamente se correlaciona con el flujo sanguíneo mamario. Aunque el flujo

sanguíneo mamario aumenta sustancialmente al parto, el completo desarrollo de la red capilar y actividad metabólica, a juzgar por la actividad de la anhidrasa carbónica en el endotelio capilar, no se alcanza hasta varios días después del parto en la cabra. El flujo sanguíneo de la glándula mamaria se correlaciona con la producción de leche y disminuye luego del pico de lactancia cuando comienza a declinar la producción (Glauber, 2007).

4.6. INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Involución se refiere a la regresión gradual de la glándula mamaria después de cumplir su función durante la lactación fisiológica. El curso de eventos durante este estadio es importante dado que tiene impacto sobre la futura lactancia. Igual que en otros periodos de la lactancia, está bajo control endocrino (Li *et al.*, 1997). Experimentos In vitro indican que la pérdida de células epiteliales por apoptosis está relacionado con la disminución de nivel de prolactina, hormona de crecimiento e IGF-I. La HC normalmente estimula la síntesis de IGF-I y optimiza la acción de la prolactina por supresión de la acción de IGFBP-5 (IGF unión proteica 5), el cual es un inhibidor de la acción del IGF-1. En roedores, la disminución del nivel de prolactina puede ser considerado como el principal signo para controlar la muerte celular durante la involución (Glauber, 2007).

Otro factor inhibidor de lactancia ha sido propuesto como partícipe en la reducción de la síntesis de leche durante el cese de la lactación e involución (Wilde *et al.*, 1997). Las vacas en lactancia son usualmente secadas entre 8-9

semanas antes del parto programado. El periodo “seco” es de suma importancia, hay vacas actualmente que se secan con producciones de 30 litros o más. Existe información respecto al estrés metabólico asociado con manejo del secado y su relación con los problemas sanitarios alrededor del parto y la etapa de transición (Glauber, 2007).

4.7. INDUCCIÓN ARTIFICIAL A LA LACTANCIA

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las hormonas juegan un papel importante en la función y desarrollo de la glándula mamaria, además se ha examinado el papel de los estrógenos como estimulantes de la mamogénesis en vacas lecheras, mostrando que los estrógenos estimulan el crecimiento del ducto mamario, y en combinación con la progesterona estimula el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula mamaria (Tucker, 2000). Los estrógenos también están involucrados en la iniciación de la lactogénesis, iniciando la lactación en dos formas. Causando la liberación de prolactina de la glándula pituitaria anterior hacia el torrente sanguíneo, y aumentando el número de receptores a la prolactina en las células de la glándula mamaria (Nagasawa, 1969; Sheth, 1978; Tucker, 2000).

Smith y Schanbacher, (1973,1974) reportaron que la inducción a la lactancia en vaquillas y vacas, mediante la aplicación de 17- β estradiol y progesterona dos veces por día durante siete días, daba resultados exitosos. Narendran *et al.* (1974) describieron que la leche producida bajo este

procedimiento no fue diferente a la leche producida de manera natural, además las glándulas mamarias no mostraron anomalías. Smith y Ferguson (1970) y Smith et al. (1971) reportaron que la aplicación de 17- β estradiol combinada con progesterona por 7 días pueden provocar la formación de calostro en vacas secas, vacías y en becerras.

En la década de los 70's, se observó que la producción de leche de vacas inducidas hormonalmente a la lactancia fue de un 70% con respecto a su lactancia anterior (Smith, 1973). La producción de leche de vacas y novillas inducidas hormonalmente a la lactancia es variable y menor a la observada en los animales después del parto (Smith, 1974; Magliaro *et al*, 2004; Macrina *et al*, 2011). Macrina, *et al*. (2011), observó que las vaquillas que han sido inducidas a la lactancia a los 15 meses de edad, no muestran un desempeño más eficiente comparado con las lactancias de vaquillas criadas de manera natural, además observaron picos de producción de entre 17 a 31 kg. de leche por día. Sin embargo, la aplicación de somatotropina bovina iniciando a los 25 días en leche en vaquillas inducidas hormonalmente a la lactancia de 15 o más meses de edad provocó un aumento de 14.7% en la producción de leche en comparación con animales no tratados (Macrina *et al.*, 2011).

El rendimiento en la producción de leche está relacionado directamente con la frecuencia en el ordeño, por lo tanto un aumento en dicha frecuencia al comienzo de la lactancia, aumenta tanto la producción como la persistencia en vacas lecheras (Hale *et al.*, 2003; Norgaard *et al.*, 2005; Wall y McFadden, 2007). La reducción en la frecuencia de ordeño presenta un efecto contrario al mencionado anteriormente (Erdman y Varner, 1995; O'Brien *et al.*, 2002). La lactancia temprana es una de las etapas más difíciles y demandantes en las vacas lecheras, debido a los cambios metabólicos que sufren y a las demandas de nutrimentos para producción de leche (Coffey *et al.*, 2004).

El número de células epiteliales mamarias y su actividad secretora determinan la duración de la curva de lactancia. Dependiendo de las razas, un incremento en la actividad de las células secretoras mamarias provoca un incremento en la producción de leche al pico de lactancia. Por el contrario, una disminución de dichas células reduce la producción de leche después del pico de lactancia (Capuco, 2003). Como ha sido descrito por Capuco *et al.* (2001), la producción de leche está en función del número de células epiteliales mamarias y su actividad secretora, proponiendo bajo este principio, que la pérdida de éstas células después del pico de lactancia, provocan una disminución de producción de leche, afectando así la persistencia en la producción.

4.8. METODOS DE INDUCCIÓN

La inducción hormonal de la lactancia se remonta a 1928, cuando Stricker y Greuter (1928) encontraron que la glándula pituitaria anterior actuaba sobre la lactogénesis. La primera inducción exitosa de lactancia en cabras mediante sustancias de la adenohipófisis se informó por Evans (1933). Los requerimientos hormonales para provocar la lactogénesis en el ganado vacuno fueron revisados por Meites (1961) y por Erb (1977). Haciendo hincapié en la necesidad de la aplicación de una dosis de estrógeno apoyando lo descrito por Turner *et al.* (1959, 1956, 1963, 1955, 1961, 1962).

Smith y Schanbacher (1971, 1973, 1974) introdujeron un método con mayor éxito que el estrógeno solo, una combinación de estrógeno y progesterona. La ventaja es que el estrógeno y la progesterona son necesarios para crear una sinergia con las hormonas adenohipofisarias en el crecimiento de estructuras lóbulo-alveolares de la glándula. El estrógeno puede permanecer lo suficientemente alto como para estimular la liberación de prolactina pituitaria (Meiters, 1961), que se considera esencial para iniciar la lactancia (Erb, 1977).

Smith y Schanbacher (1974) aplicaron inyecciones subcutáneas de estradiol 17- β (60 mg/600 kg de peso por día) y progesterona (150 mg/600 kg de peso corporal) durante 7 días, este tratamiento indujo la lactancia en novillas Holstein. Skrzeczkowski *et al.* (1979) aplicaron inyecciones de estradiol 17- β y

progesterona en una proporción de 1: 2.5 durante 7 días, con lo cual iniciaron exitosamente la lactancia en 10 vacas Holstein tratadas. Estudios realizados por Deshmukh *et al.* (1992), indican también que usando 0.1mg de estradiol y 0.25 mg de progesterona/kg, subcutáneamente por 7 días, y posteriormente una aplicación de una sola inyección intramuscular de 20 mg de dexametazona los días 18,19 y 20, además de una inyección de reserpina (5 mg) los días 8, 10, 12 y 14, se obtuvo una buena inducción a la lactancia.

En un estudio realizado por Magliaro *et al.* (2004), se evaluó la eficacia de la bST para incrementar la producción de leche en vacas inducidas a la lactancia con estrógeno y progesterona. Se utilizaron 28 vacas Holstein, las cuales fueron inducidas a la lactancia con 17- β -estradiol (0.075mg/kg de peso por día) y progesterona (0.25 mg/kg/día) por 7 días) empezando la lactancia el día 18. El día 37 de la lactancia se separaron aleatoriamente en 2 grupos: El grupo control sin somatotropina y el tratado con somatotropina iniciando su aplicación el día 70 de la lactancia. Las vacas tratadas con bST produjeron más leche (28.4 kg/día) que las vacas testigo (24.1 kg/día).

Mellado *et al.* (2006) compararon la producción de leche y rendimiento reproductivo en vacas lecheras pluríparas, cuya lactancia era inducida con tratamiento hormonal o seguido de un parto natural. Usando 179 vacas altas productoras de leche en un establo lechero grande, en un entorno árido caliente en el norte de México, donde la somatotropina fue usada rutinariamente en todas

las vacas. La inducción láctea en 98 vacas que fracasaron de quedar gestantes se trataron con 500 mg de bST en los días 1, 8 y 21. Desde el día 2 al 8, las vacas se trataron con cipionato de estradiol (0.30 mg/kg de peso vivo por día) y progesterona (0.28 mg/kg/día). Desde el día 9 al 15 se aplicó sólo cipionato de estradiol. No se administró nada los días 19 al 21. La lactancia fue inducida exitosamente en las 98 vacas sometidas al tratamiento hormonal. Todas las vacas recibieron 500 mg de bST cada 14 días a lo largo de la lactancia desde 63 ± 7 días después de haber empezado la lactancia. Las vacas inducidas a la lactancia produjeron menos leche a los 305 días de lactación ($9,599 \pm$ kg) que el grupo control ($12,302 \pm 124$ kg).

4.9. HORMONAS QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE

Las hormonas tiroideas son importantes reguladores de la función de la glándula mamaria. En ausencia de ellas, el crecimiento y la diferenciación del epitelio mamario se reducen (Vonderhaar, 1979). En vacas lecheras, la administración de tiroxina aumenta la producción láctea en un 27% (Hindery, 1965), la producción de lactosa en un 25% y el porcentaje de grasa en un 42% (Davis, 1988). Las hormonas tiroideas son afectadas por la aplicación de somatotropina bovina (bST) a vacas lecheras en producción, de tal forma que se mantiene el estado eutiroideo de la glándula mamaria en presencia de un estado hipotiroideo sistémico, lo que demuestra la capacidad de la rbST para establecer

una prioridad metabólica para la glándula mamaria (Capuco, 1989; Kahl, 1995; Capuco, 2001).

Las hormonas esteroideas sexuales actúan a través de sus receptores intracelulares específicos, se unen a ellos e inician la respuesta biológica permitiendo el desarrollo del tracto genital y determinando su estado morfofuncional. Los receptores son regulados por las hormonas (Spencer y Bazer, 1995; Kimmins y Mac Laren, 2001 y Robinson et al., 2001)

4.9.1. Estrógeno

Induce en la glándula mamaria depósitos de grasa, desarrollo de estroma y crecimiento de un importante sistema de conductos. Los lobulillos y los alveolos de la glándula mamaria se desarrollan en menor grado, pero son la progesterona y la prolactina, las que estimulan el crecimiento y función de estas estructuras (Tucker, 2000). Estudios *in vitro* mostraron que la combinación de estrógeno, prolactina y hormona del crecimiento estimulan el crecimiento mamario (Rivera, 1964). Tucker (2000) postuló que los factores de crecimiento secretados a partir de tejidos extra mamarios en suero pueden actuar a través de un mecanismo endocrino para regular los efectos mamogénicos del estrógeno. Además, factores de crecimiento secretados localmente a partir de tejido mamario pueden mediar, a través de un mecanismo paracrino o autocrino, los efectos del estrógeno en la mamogénesis (Dembinski, 1987).

4.9.2. Progesterona

Estimula el desarrollo final de los lobulillos y alveolos de la glándula mamaria, haciendo que las células alveolares proliferen, aumenten de volumen y adopten carácter secretor, sin embargo, esta no provoca en realidad la secreción de la leche por los alveolos, pues esta sólo ocurre después que la glándula mamaria preparada es estimulada secundariamente por la prolactina (Narendran *et al.*, 1974; Tucker, 2000). Una disminución en la secreción de progesterona antes del parto en el ganado, se presenta simultáneamente con el inicio de la secreción de grandes cantidades de leche, lo que sugiere una correlación de la progesterona en la supresión de la lactogénesis (Smith, 1973).

Se ha observado que la progesterona bloquea la lactogénesis de diferentes maneras, una de ellas es suprimiendo la capacidad de la prolactina para aumentar el número de receptores de prolactina en la glándula mamaria (Djiane, 1977). Por otro lado, la progesterona bloquea los receptores de glucocorticoides en el tejido mamario, que a su vez suprimen la actividad lactogénica de los glucocorticoides (Collier, 1978). La progesterona induce la síntesis de DNA en las terminaciones finales a lo largo de las paredes del conducto mamario, donde los receptores de la progesterona se localizan, aumentando el número de los mismos (Tucker, 2000).

4.9.3. Prolactina

Como su nombre lo indica, la prolactina (PRL) es la hormona más importante para el control de la lactancia. Esta hormona se sabe que es mamogénica y lactogénica en mamíferos, tanto no rumiantes como rumiantes (Shams *et al.*, 1984; Lacasse, 2011; Looor *et al.*, 2013). La prolactina es esencial para la mamogénesis y la diferenciación de la glándula mamaria durante la gestación. Recientemente se descubrió que la prolactina indirectamente estimuló la ramificación lateral y terminal en ratones nulíparas mientras que indirectamente aumenta el desarrollo del lóbulo alveolar en el epitelio mamario durante la gestación (Tucker, 2000). Recientemente se demostró que esta hormona controla la liberación de leptina, del tejido adiposo mamario, siendo esta quien regula la distribución de nutrientes en el tejido mamario (Feuermann *et al.*, 2006).

Se ha observado un incremento en la secreción de prolactina pocas horas antes del parto en el ganado, disminuyendo notablemente la producción de leche si se bloquea este incremento de prolactina mediante la aplicación de bromocriptina e invirtiéndose el efecto aplicando prolactina exógena (Tucker, 2000).

4.9.4. Hormona del crecimiento

En los estudios iniciales sobre la aplicación de la hormona de crecimiento, se observó un incremento en el crecimiento del conducto mamario en ratas hipofisectomizadas, adrenalectomizadas y ovariectomizadas, después, se demostraría en vaquillas un aumento en la masa mamaria del parénquima y el número total de células mamarias mediante la utilización exógena de la hormona de crecimiento (Tucker, 2000). La acción principal de la hormona del crecimiento es la homeorresis, esto es, la utilización de energía de reserva del cuerpo para ser utilizada por la glándula mamaria (Bauman, 1992). La hormona del crecimiento es la principal hormona galactopoiética en ganado productor de leche (Bauman y Eppard, 1985; Forsyth, 1986).

No se sabe con certeza si la hormona del crecimiento tiene una acción directa sobre el tejido mamario (Akers, 1985), aunque un estudio demostró la presencia de receptores en las membranas de las células secretoras de la glándula mamaria (Sinowatz *et al.*, 2000). También se ha postulado que la acción mamogénica y galactopoiética de la hormona del crecimiento se produce a través de acciones paracrinas y endocrinas del factor parecido a la insulina-1 (Flint y Knight, 1997).

4.9.5. Glucocorticoides

El cortisol es el glucocorticoide endógeno predominante en el ganado cuya principal función en la glándula mamaria es causar la diferenciación del sistema lóbulo-alveolar. El cortisol está dirigido al retículo endoplásmico y aparato de Golgi, esta diferenciación inducida por glucocorticoides fue esencial para permitir a la prolactina inducir la síntesis posterior de proteínas de la leche (Mills, 1970). Los glucocorticoides se unen a receptores específicos en el tejido mamario (Loor *et al.*, 2013).

4.9.6. Oxitocina

La eyección de la leche es un reflejo neuroendocrino, la oxitocina es liberada de la hipófisis en respuesta a la estimulación táctil del pezón, esto provoca que las células mioepiteliales que rodean los alvéolos se contraigan, forzando la leche almacenada en los alvéolos hacia los conductos mamarios y glándula (Lefcourt y Akers, 1983). La oxitocina provoca el efecto de “bajado” de la leche y mantiene la secreción láctea por el estímulo producido durante el ordeño que libera prolactina, hormona adrenocorticotropica y oxitocina. La liberación de la oxitocina es más abundante cuando la vaca es mamada por su becerro que cuando es ordeñada por máquina de ordeña (Akers y Lefcourt, 1984; Lupoli *et al.*, 2001).

4.9.7. Lactógeno placentario

Además de producir estrógenos y progesterona, la placenta produce lactógeno placentario, hormona homóloga, inmunológica y estructuralmente a la prolactina y a la hormona del crecimiento. Se ha encontrado evidencia de que el lactógeno placentario es mamogénico (Schams *et al.*, 1984; Byatt *et al.*, 1992), y se cree que esta hormona hace sinergia con las hormonas de la pituitaria anterior y el ovario para el desarrollo de la glándula mamaria durante la preñez. La placenta es una fuente importante de hormonas mamogénicas. En cabras existe una correlación positiva entre el desarrollo de la glándula mamaria y el número y peso de las placentas (Hayden *et al.*, 1979).

4.9.8. Factores de Crecimiento

Existen algunos factores de crecimiento relacionados con el desarrollo y diferenciación del tejido mamario. Dichos factores son: factor de crecimiento de la epidermis, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento y transformación y factor de crecimiento semejante a la insulina. Estos factores de crecimiento pueden ser producidos localmente en la glándula mamaria por lo que su acción es autocrina o paracrina. Los factores de crecimiento pueden también originarse en otros tejidos por lo que pueden actuar en forma endocrina (Oka *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 2003; Akers, 2006).

SEGUNDO TEMA DE ESTUDIO

5. UTILIZACION DE SEMEN SEXADO EN INSEMINACION ARTIFICIAL

El sexado del semen es una técnica reproductiva que permite incrementar la eficiencia de los programas reproductivos en las explotaciones lecheras (Weigel, 2004). Se han considerado algunas ventajas prácticas mediante la utilización de semen sexado, como la reducción en el número de vacas utilizadas para los exámenes de progenie, y la oportunidad de utilizar más y genéticamente mejores vacas para la producción de reemplazos (Hohenboken, 1999; Seidel, 2002).

Seidel, et al. (1999), Seidel y Schenk,(2002), Seidel, (2003) y Dejarnette et al. (2009) informaron que se había logrado obtener alrededor del 90% de crías hembras mediante la separación de de espermatozoides X de Y. En algunos estudios realizados por Seidel y Schenk (2002) en vacas Holstein y Jersey, se observó una disminución en las tasas de concepción en vacas inseminadas mediante la utilización de semen sexado, reportando tasas de preñez de 31 a 42% en comparación con el semen convencional donde obtuvieron valores de 43 a 62% en las tasas de preñez, en otro estudio observaron tasas de preñez de 21 a 35% para el semen sexado mientras que el semen convencional arrojó valores de un 58%.

Seidel *et al.* (1999) reportaron una reducción de alrededor de 10% en la tasa de preñez por inseminación artificial en vaquillas inseminadas con semen sexado en comparación con aquellas inseminadas con semen convencional. Estudios posteriores demostraron que la tasa de preñez por inseminación artificial con semen sexado es de un 70 a 80%, comparado con el semen convencional (Bodmer, *et al.*, 2005; Borchersen y Peacock, 2009; DeJarnette, *et al.*, 2009). Una de las posibles razones de esta disminución de la tasa de preñez es la reducción del número de espermatozoides por dosis de semen, aunque también es probable que se produzca un daño durante el proceso de tinción de los espermatozoides, la identificación y separación de éstos (Schenk y Seidel, 2007).

En un estudio de Norman *et al.* (2010) se monitoreó el desempeño de vacas y vaquillas Holstein inseminadas con semen sexado en los Estados Unidos (1.3 millones de inseminaciones) y en vacas (10.8 millones de inseminaciones). Se monitoreó de acuerdo al año de las inseminaciones, el número de partos, el número de servicios, la región, el tamaño de hato y la producción lechera por hato. En el 2008, las inseminaciones con semen sexado, fueron del 80.5% y del 68.6% para primeros servicios en vaquillas y vacas, respectivamente. En vacas, el 63.1% del semen sexado durante el 2008 se utilizó en vacas de primer parto. El efecto del empleo del semen sexado en la tasa de concepción, el sexo de la cría, las distocias y los natimortos también fueron evaluadas tanto en vaquillas como en vacas. La tasa de concepción promedio para vaquillas fue del 56% con semen

convencional y del 39% con semen sexado, correspondiendo las tasas de concepción para vacas del 30 y del 25%, respectivamente.

Para los nacimientos de inseminaciones con semen sexado, el 90% fueron hembras. Las distocias y los natimortos fueron más frecuentes en vaquillas (6 y 10.4%, respectivamente, con semen convencional; y el 4.3 y 11.3%, respectivamente con el semen sexado). Los partos distócicos disminuyeron en un 28% en vaquillas y en un 64% en vacas con el uso de semen sexado. Los natimortos fueron más prevalentes en nacimientos gemelares, excepto para vaquillas inseminadas con semen sexado. Los natimortos de crías machos de vaquillas fueron más frecuentes de inseminaciones con semen sexado (15.6%) comparado con los convencionales (10.8%). Esta diferencia no fue observada en vacas, ya que la frecuencia de natimortos de crías machos en partos simples disminuyó (2.6 contra un 3.6%). Estos datos indican que la frecuencia en general de natimortos se ve reducida con el empleo del semen sexado en vacas, pero no en vaquillas.

El objetivo de un estudio de Marini y Galassi (2011) fue estudiar la relación entre la duración del período transcurrido entre la detección del celo y la inseminación con semen sexado y el porcentaje de preñez en vaquillas Holstein y, en caso de existir, si dicha relación es afectada por el toro. Se evaluó información recolectada durante el año 2009 sobre 607 períodos celos–servicios

correspondientes a 607 vaquillas Holstein. Para los servicios efectuados durante el período analizado se utilizó semen de cinco toros. Se registraron observaciones de celos e inseminaciones durante cuatro veces por día. Las vaquillas se categorizaron de acuerdo al lapso transcurrido (horas) entre la detección del celo y su inseminación, en cuatro grupos: 9:00 a 10:59, 11:00 a 12:59, 13:00 a 14:59 y 15:00 a 17:00 horas. No hubo diferencias entre los distintos grupos y el porcentaje de preñez. Por otro lado, el efecto toro provocó diferencias significativas en el porcentaje de preñez. Estos autores concluyeron que en las inseminaciones efectuadas entre los lapsos estudiados después de la iniciación del celo no se producen repercusiones negativas sobre el porcentaje de preñez, pero sí con el tipo de toro utilizado.

En un estudio en Argentina se utilizaron ovocitos obtenidos a partir de ovarios de vacas sacrificadas en el rastro y diferentes dosis de semen sexado y convencional proveniente de dos toros Holstein (Medina *et al.*, 2002). La concentración de semen utilizada fue de 1 o 2×10^6 espermatozoides para semen sexado y 1×10^6 espermatozoides para semen convencional. La tasa de fertilización obtenida con semen sexado, aún con la mayor dosis utilizada, fue menor que con el semen convencional: toro A, 31% versus 77,3% y toro B, 52% versus 78,5%, respectivamente. El desarrollo embrionario con semen sexado fue más bajo que con semen convencional, independientemente del toro y de la concentración espermática utilizada.

En otro trabajo, Palma *et al.* (2007) usaron semen sexado de 6 toros Holstein para estudiar su eficiencia en un programa de producción *in vitro* de embriones y comparar la ultraestructura de estos embriones con la de aquéllos producidos con semen convencional. Los ovocitos (n: 1852) provenientes de animales de rastro fueron divididos en 6 grupos y fecundados con semen sexado de 6 toros Holstein o con semen convencional (n: 330 ovocitos) de un toro control. Las tasas de división y desarrollo a blastocistos fueron determinadas a los 2 y 7 días post-inseminación, respectivamente. Cuando se utilizó semen sexado, se observó una frecuencia significativamente alta de sesiones contaminadas. La cantidad de ovocitos fecundados en cada gota fue significativamente más baja con semen sexado. La tasa de división celular con el semen sexado fue muy variable; con algunos toros se obtuvieron tasas que no difirieron del grupo control, mientras que con otros las diferencias fueron significativas.

En un trabajo realizado por Hayakawa *et al.* (2009) con vacas incluidas en programas comerciales de transferencia embrionaria, se efectuaron tres ensayos utilizando diferentes esquemas de inseminación y dosis de semen sexado. En el primer ensayo utilizaron vaquillas que fueron inseminadas con semen sexado y convencional 12 y 24 horas luego de haber sido detectadas en celo, utilizando 5×10^6 espermatozoides en cada inseminación. Los porcentajes de ovocitos fecundados y de embriones transferibles fueron similares para semen sexado y

convencional, no obstante, el número de embriones transferibles fue menor para semen sexado.

En un experimento de Kurykin et al. (2007) se evaluó la utilización del semen sexado en un programa de IATF que incluyó 209 vaquillas Holstein, la sincronización de la ovulación se efectuó mediante dos dosis de PGF2 α separadas por 14 días. La inseminación se realizó a las 80–82 h post–2da dosis de PGF2 α utilizándose una dosis de 2×10^6 espermatozoides, proveniente de toros Holstein. El semen fue depositado en diferentes sitios: el cuerpo del útero, la mitad de uno de los cuernos uterinos, o cerca de la unión útero–tubárica. Para determinar el cuerno donde depositar el semen se utilizó la ultrasonografía, con el objetivo de detectar la presencia de un folículo preovulatorio. En el momento de la inseminación, las vaquillas fueron clasificadas según la intensidad del celo, el cual podía ser fuerte o débil.

Los porcentajes de preñez en inseminaciones efectuadas en el tercio anterior del cuerno uterino: 39% y en el tercio medio: 49% resultaron similares entre sí y no difirieron de las realizadas en el cuerpo del útero: 42%. En cambio, el porcentaje de preñez de vaquillas con signos intensos de celo (46%) fue superior al de aquellas con signos débiles (21%). Seidel y Schenk (2008) llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se inseminaron vaquillas y vacas, utilizando semen congelado en dosis que oscilaron entre 1 y 6 millones de espermatozoides

sexados, los cuales fueron depositados en el cuerpo del útero o en el tercio medio de ambos cuernos uterinos. Como testigo, se usó semen convencional a una dosis de 20×10^6 espermatozoides. Cuando se utilizaron dosis que variaron entre 1.5 y 6×10^6 espermatozoides sexados, el porcentaje de preñez resultó similar. Del mismo modo, el lugar donde se efectuó la descarga del semen no modificó los resultados.

En cambio, cuando se utilizó la dosis 1×10^6 espermatozoides, el porcentaje de preñez resultó inferior y la deposición del semen en los cuernos uterinos afectó negativamente la tasa de preñez. En la mayoría de estos experimentos, el porcentaje de preñez obtenido con el semen sexado fue menor que el logrado con el semen convencional. Factores como condición corporal, edad, manejo reproductivo y sanitario, y eficiencia en la detección de celo, fueron importantes para obtener una adecuada fertilidad. En un trabajo muy similar al anterior, se comparó el porcentaje de preñez en vaquillas inseminadas con semen sexado con una dosis de 2×10^6 espermatozoides y convencional cuya dosis fue 15×10^6 espermatozoides. El experimento incluyó 9 toros Holstein, Jersey y Rojo Danesa. Las diferencias en los porcentajes de preñez, siempre a favor del semen convencional, fueron 12%, 7% y 5%, respectivamente (Borchersen y Peacock, 2009).

6. MANUSCRITOS

6.1. Estudio I

Milk yield of Holstein cows induced into lactation twice consecutively and lactation curve models fitted to artificial lactations

Abstract

Nineteen pluriparous barren Holstein cows were subjected to an induction of lactation protocol for 21 days administering estradiol cypionate (2 mg/kg of BW per day, days 1 to 14), progesterone (0.10 mg/kg of BW, days 1 to 7), flumethasone (0.03 mg/kg of BW on days 18 to 20) and recombinant bovine somatotropin (rbST; 500 mg per cow, days 1, 6 and 16). At the end of lactation and with a minimum of a two-month dry period, the same cows were again hormonally induced into lactation. Cows in both lactations were not artificially inseminated, were milked 3 times daily and received rbST throughout lactation. Mean accumulated milk yield at 305 days in milk (DIM) did not differ between first and second induced lactations (9710 ± 1728 and 9309 ± 2150 kg; mean \pm SD). Total milk yield (12707 ± 3406 vs. 12306 ± 4218 kg; mean \pm SD) and lactation length (405 ± 100 vs. 410 ± 91 days; mean \pm SD) were not different between first and second induced lactations. In a second study 15 empirical models including exponential, power law, yield-density, sigmoidal and miscellaneous models were compared for their suitability for modeling 12 (n=334), 18 (n= 164) and 29-month lactation cycles (n= 22) of Holsteins cows induced into lactation and treated with rbST throughout lactation. Hoerl ($y=ab^{1/x} x^c$), Wood ($Y=ax^b \exp(cx)$) and Dhanoa ($y=ax^{(bc)} \exp(cx)$) models

were equally suitable to describe 12-month lactations. An exponential model with five parameters ($y=\exp(a+bx+cd^2+e/x)$) showed *the best* fit for milk yield for 18-month lactations. The Rational model ($y=a+bx/1+cx+dx^2$) was found to produce the closest fit for 29-month lactations. It was concluded that, with the protocol used in the present study, pluriparous cows *respond* favorably to a second cycle of induced lactation, with milk yield similar to that experienced during the first cycle. Thus, dairy producers might be able to lengthen the *productive life* of infertile high producing cows with a renewal of artificial lactation, which would imply an overall reduction in voluntary culling of cows. Also, various equations used to describe the lactation curves demonstrated the potential for fitting monthly milk records of Holstein cows with prolonged lactations and induced hormonally into lactation.

Keywords: Lactation curve, modeling, extended lactations, peak milk yield, somatotropin.

1. Introduction

With the refinement of protocols for the induction of lactation in nonlactating and nonpregnant dairy cows, producers have been able to substantially reduce herd culling losses and replacement costs by retaining young infertile cows that would otherwise be culled from the herd. This is particularly important in areas of intense warm weather, where reproduction efficiency is seriously compromised.

Rescuing infertile cows by inducing them to lactate with the use of hormones offers the producer the opportunity to continuing exploiting outstanding high milk-producing cows. Additionally, these apparently barren cows have additional breeding opportunities during the induced lactation, and some of them become pregnant (Mellado et al., 2006), which prolong the lifespan of genetically superior cows for milk yield.

In countries where the use of hormones to induce lactation is legally permitted, those cows unable to become pregnant during the induced lactation typically are culled at the end of the induced lactation. The average milk yield per lactation in hormonally-induced cows is about 90% of cows whose lactation derives from calving (Mellado et al., 2011), and this level of milk yield is high enough for keeping overall herd efficiency. Thus, if milk yield during a second consecutive induced lactation is similar to the first induced lactation, a second consecutive induced lactation is still likely to be profitable for dairy producers.

On the other hand, a great deal of cows induced into lactation and milked three times per day extended their lactations far beyond 305 days. Most equations used

to describe the lactation curves reported in the literature have been for 305-d lactations, with few exceptions with extend lactations (Grossman and Koops, 2003; Dematawewa et al., 2007). Moreover, no attempts have been done to model lactation curves of cows whose lactation derives from a hormonal treatment. Therefore, the objectives of this study were (1) to assess the milk yield of cows induced to lactation twice consecutively, and (2) to describe with mathematical functions the lactation curves of cows hormonally treated to induce lactation.

2. Material and methods

2.1 Study 1

All experimental procedures complied with The Guide for Care and Use of Agricultural Animals of the Agrarian Autonomous University Antonio Narro. Nineteen healthy infertile multiparous Holstein cows from a large dairy herd in northern Mexico (26°23'N, 104°47'W, elevation 1,140 m, mean annual temperature 27°C, mean annual rainfall 230 mm) were used in this study. Cows were housed in open dirt pens and managed in groups according to lactation, production, and reproductive status. Pens were equipped with evaporative coolers, which injected a fine mist of water into turbulent air from fans installed on shade roofs. Shades were equipped with curtains that descended automatically when ambient temperatures reached 28°C.

Diets were formulated to meet requirements for NE_L , crude protein, minerals, and vitamins of dairy cows weighing 670 kg, producing 40 kg of milk with 3.5% fat

(NRC, 2001). Diets contained 45% forage (50% alfalfa hay and 50% corn silage; DM basis) and 55% concentrate (DM basis), based on ground shelled corn and soybean meal. Cows were fed ad libitum (5 to 10% refusal) 4 times daily at 0600, 1000, 1200, and 1600 h. Cows were induced into lactation by administering daily s.c. injections of estradiol cypionate (2 mg/kg of BW per day; Pfizer, Mexico DF, Mexico) and 0.10 mg/kg of BW per day progesterone (Pfizer, Mexico DF, Mexico) from d 1 to 7. Estradiol cypionate (2 mg/kg BW) was applied from d 8 to 14. Somatotropin (Lactotropin, 500 mg of zinc rbST, Elanco Animal Health, Guadalajara, Mexico) was applied on d 1, 6, 16, and 21. Lactation was triggered by administration of 0.03 mg/kg of BW per day of flumethasone (Fluвет, Fort Dodge, Mexico DF, Mexico) injected s.c. daily for 3 d (d 18 to 20). Milking was initiated on d 21.

Cows were milked 3 times per day (0600, 1400, and 2100 h) throughout the study in a milking parlor. Cows received 500 mg rbST (Lactotropin®, Elanco Animal Health, Guadalajara, Mexico) subcutaneously at 60 DIM, and these cows remained on rbST throughout lactation with injections every 14 days in order to maximize milk yield in response to induction of lactation. Cows were not bred throughout lactation and they were dried off when daily milk yield was <15 kg. Upon completion of lactation cows had a two-month dry period, after which they were reinduced to lactation with a hormonal treatment. Milk yield was recorded daily using electronic milk meters.

2.2 Study 2

A data set with milk yield records from pluriparous Holstein cows induced into lactation was obtained from the dairy operation described in the first study (same nutritional and management conditions and same protocol for induction of lactation). Edits removed records with lactations <12 months of and lactations from primiparous cows. Three lactation length groups were formed, with a final data set consisting of 334 records for 12-month lactations, 164 records for 18-month lactations and 22 records for 29-month lactations. No attempts were made to establish pregnancy in cows that successfully initiate the induced lactation. Milk yield was electronically recorded daily for all cows and the daily records used to estimate the average daily milk yield in months 1 up to 29 of lactation. A variety of previously published and evaluated models were used to find the appropriate function describing the patterns of milk yield.

2.3 Statistical analyses

Milk production variables were first checked for normality (UNIVARIATE procedure; SAS Inst., Inc., Cary, NC). Given that observations were not independent of one another for cows induced twice consecutively to lactation, a dependent group t-test (within-subjects t-test) was used to compare the first and second lactation (TTEST procedure of SAS).

In the case of the three groups of cows with different lactation length, a wide range of empirical models previously used to model conventional or extended lactations which account for a rise to peak yield after calving [e.g. Wood ($y=ax^{(b)}$)

$\exp(cx)$), Hoerl ($y=ab^x x^c$), Dhanoa ($y=ax^{(bc)} \exp(cx)$), rational ($y=a+bx/1+cx+dx^2$),
 Steinhart-Hart ($y=1/a+b\ln(x)+c\ln(x)^3$), Morant and Gnanasakthy
 ($y=\exp(a+bx+cx^2+d/x)$), reciprocal quadratic ($y=1/(a+bx+cx^2)$), heat capacity
 ($y=a+bx+c/x^2$), vapor pressure ($y=e^{a+b/x+c\ln(x)}$), modified Hoerl ($y=ab^{1/x} x^c$), sinusoidal
 ($y=a+b\cos(cx+d)$), Gaussian ($y=ae^{-(x-b)^2/2c^2}$), Cobby and Le Du ($y=a-bx-a \exp(-$
 $cx)$), Gompertz ($y=a\exp(b)\exp(cx-1)/b$), exponential with five parameters ($y=$
 $\exp(a+bx+cd^2+e/x)$), among others were used to fit the lactation curves of the three
 groups of cows. For all models “y” was mean milk yield (kg/d) of each 30-d interval
 of the lactation, at time x (months), and a, b....n, were parameters that defined the
 scale and shape of the curve. Each model was fitted using the CurveExpert
 Professional program (version 1.6.5; Levenberg-Marquardt method). Model
 selection criteria included SSE, root MSE, adjusted multiple coefficient of
 determination (R^2_{adj}), unlikeness of patterns of residuals, the correlation between
 the observed and predicted values and Akaike information criterion (AICC, a
 measure of the relative goodness of fit of a statistical model; Akaike, 1973).

3. Results and discussion

3.1 successive induced lactation

All cows induced into lactation for the second time consecutively appeared normal in terms of health, body energy reserves, and occurrence of estrous cycles, milk yield and feeding behavior. It seems that these cows made the transition from the dry to lactating state effortlessly, with good adaptation to higher feed intake to keep pace with increasing milk yield. Milk production performance data are presented in Table 1. 305-d milk yield did not differ between first and second hormonally induced lactations. The lack of differences observed between the two lactations is related in part to similar feeding, management and hormone protocol used in these cows and probably to a similar secretory tissue induced by the hormonal treatment.

The reinduction of lactation did not alter the consistency of the daily milk yield during the second lactation, with both lactations reaching over 12,300 kg of milk in over 400 days in milk. This suggests that reinduction of lactation induced a population of mammary epithelial cells to serve as alveolar stem cell/ progenitor cells during successive lactation cycles (Wagner and Smith, 2005). It seems that reinduced cows had similar amounts of mammary secretory tissue as that present during the first induced lactation and that this mammary development driven by exogenous hormones was accompanied by an extensive cytological and biochemical differentiation necessary for producing copious quantities of milk during lactation. Total milk yield production achieved by cows in the present study is far above the values reported by Magliaro et al. (2004) for cows induced into

lactation, but are similar to that observed by Mellado et al. (2006, 2011) under the same management conditions. Thus, these results reaffirm that the lactation induction methodology used in the present study is a practical, repeatable and effective tool that allows high and persistent milk yields in cows.

As in previous lactation-induction studies (Mellado et al., 2006, 2011; Corradi-Freitas et al., 2010), peak milk yields were reached a little over four months into lactation. The delayed peak milk production in induced cows has not been elucidated. This could be due to the fact that the udder of the induced cows does not undergo the renovation and cellular proliferation process during the dry period, due to the absence of hormones involved in gestation (Nørgaard et al., 2008). Thus, hormones used to induce lactation may be insufficient to trigger, at the same intensity as pregnant cows, the renovation of the secretory tissue, which may result in less secretory tissue at the beginning of lactation in the induced cows, compared with non-induced cows, as mammary development occurs over a 20-d period in the former and during the last months of gestation in the latter (Knight and Wilde, 1993). This seems to explain the slow daily increase in milk yield during the first weeks following induction of lactation Corradi-Freitas (2010).

Additional possibilities for the delayed peak milk production in the induced cows could be a greater degree of uncoupling and a delayed recoupling of the somatotropic axis in the hormonally-treated cows (Lucy et al., 2009), which could delay mammary gland development, which in turn would extend maximum parenchyma volume, required for peak milk yield. Also, cows induced into lactation may be less sensitive to the signaling pathways involved in downregulation of cell

proliferation (Finucane et al., 2008) and present a longer period of secretory tissue proliferation, which would be reflected in a longer time to reach peak milk yield.

3.2 lactation curves models

The average curve of lactation for cows with 12-month lactations is reported in Figure 1. As expected for high-producing Holstein dairy cows induced into lactation, the peak of lactation was reached at around fourth months in milk with 36.2 kg of milk per day. After fitting a series of equations to raw milk yield data the calculated statistics to discriminate between the goodness of fit of different equations, showed that the Hoerl, Wood, Dhanoa models offered the best fit, with no difference in rank or quality in fitting the lactation data. In fact, predicted time to peak yield was similar among models, ranging from 129 to 131 days in milk.

The average curve of lactation for cows with 18-month lactations is shown in Figure 2. Initial yield was about the same compared to cows with 12-month lactation. Peak of lactation was reached at around fourth months in milk with a slightly higher peak yield (37.4 kg per day) than for cows with 12-month lactations. An exponential model with five parameters showed *the best* fit to the milk yield data, with little difference compared to Hoerl, Dhanoa and Wood models. Predicted time to peak yield was 130 days (Very close to real data) for the exponential model whereas predicted time to peak yield for Hoerl, Dhanoa and Wood models was 160 days.

Lactation curve for induced cows with extended lactations is presented in Fig. 3. Cows reaching 29 months in milk were more persistent, and their lactation curves

were flatter than those of 18-month lactation length cows, although a clear discernible rise to a peak was evident. Interval from initiation of lactation and peak milk yield was far longer than values found in cows with 12 or 18-month lactations. As it was observed previously in cows with extended lactations (Dematawewa et al., 2007), the prediction errors of models for these cows were larger than those found in shorter lactations. Much lower number of observations in the extended lactation group compared with cows with shorter lactations is partially responsible for this difference. An exponential model with 5 parameters was able to predict daily yield within a ± 2.8 kg range for the entire 29-month period. This exponential model having 5 parameters showed the best adjustment, although the differences from the rational model were marginal. Considering the computational problems of the large exponential model and the fact that the rational model gave the closest prediction of peak day, the Rational model was considered to have a robust predictive ability for modeling extended lactations in induced Holstein cows treated with rbST throughout lactation.

4. Conclusions

This study showed that milk yield and lactation length are not altered when cows are induced into lactation for a second consecutive time, which indicate that dairy producers could induce a renewed lactation in barren high-yielding dairy cows in order to reduce herd culling losses and replacement costs. This would results in greater percentages of lactating cows throughout the year and consequently an extended herd life. Also, based on criteria to measure goodness of fit, the results of this study showed that either Hoerl, Dhanoa or Wood were equally efficient in describing the lactation curve of 12-month lactations, whereas an exponential model with five parameters gave an acceptable fit to milk yield data of cows with 18-month lactations. The rational model was able to fit monthly lactation records satisfactorily for induced cows lactating during 29 months.

Table 1. Milk traits of pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation during two consecutive lactation periods (n= 19).

Item	First lactation	Second lactation	SEM
305-d milk yield, kg	9710	9309	1951
Total milk yield, kg	12707	12306	3833
Lactation length (d)	405	410	96
Daily milk yield, kg	31	29	5
Peak milk yield (kg/d)	43	40	7
Day of peak milk yield	127	120	24

SEM= Standard error of the mean. For all traits no differences ($P>0.05$) between groups were detected.

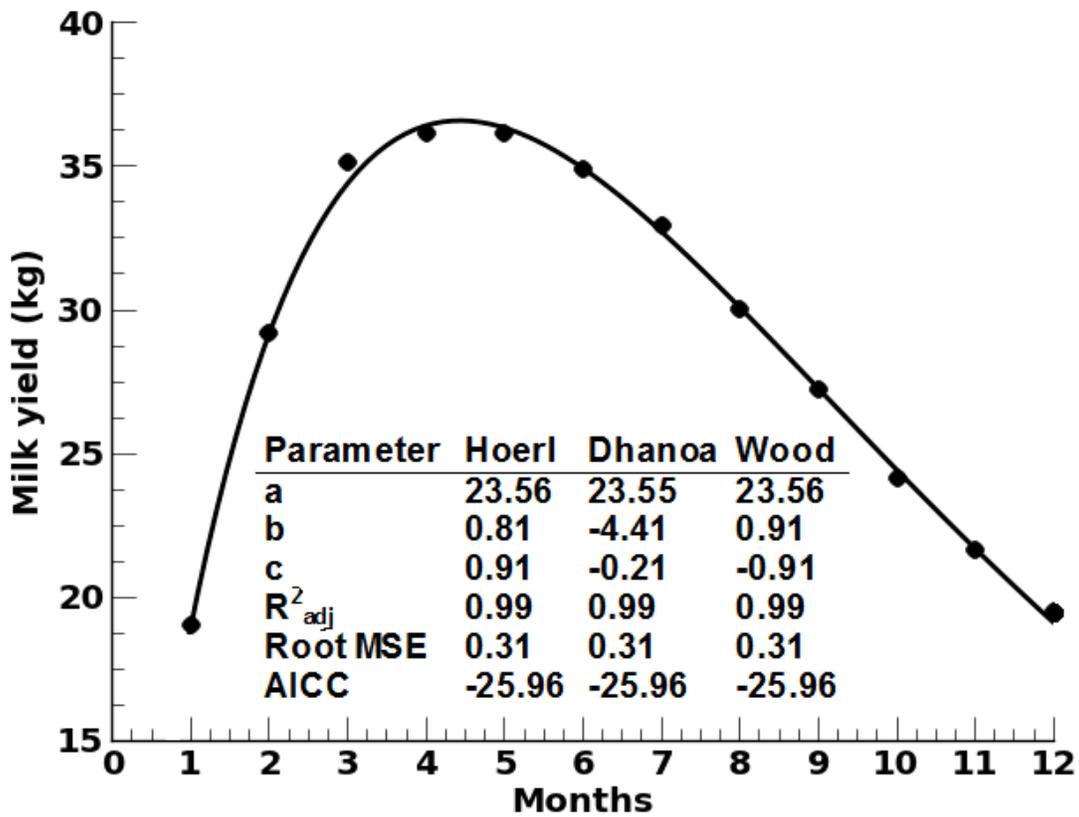


Fig. 1. Lactation curve for pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin throughout a 12-month lactation. Dots are monthly average milk yield of 334 cows. Among a variety of models tested, the Hoerl, Wood (shown) and Dhanoa models showed the better adjustment. R^2_{adj} =adjusted R^2 by the number of parameters in each model. AICC= Akaike information criterion.

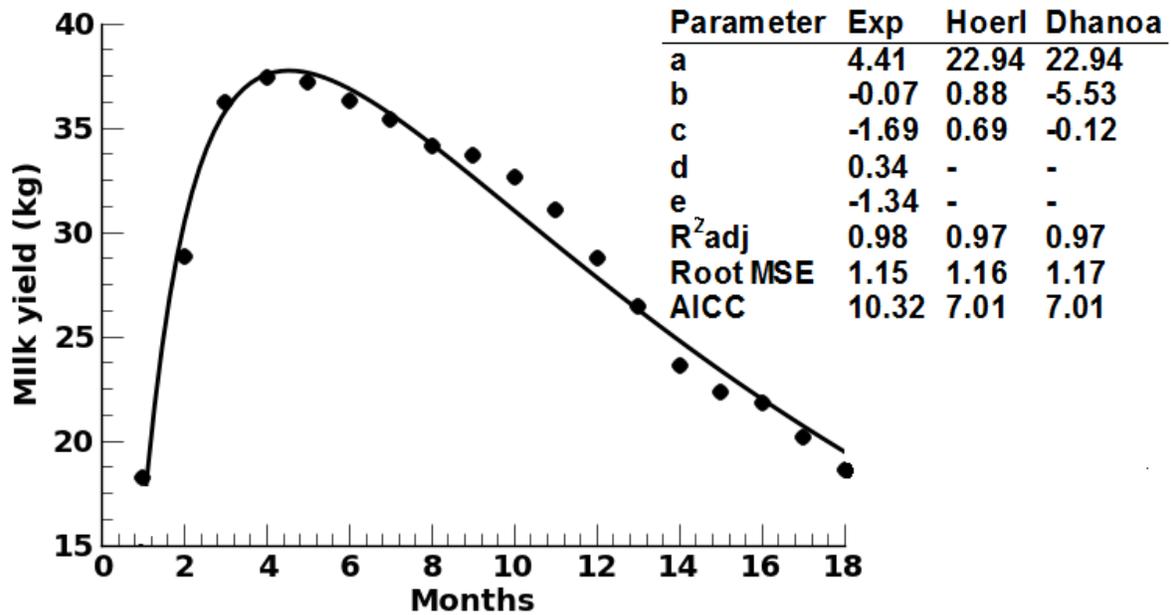


Fig. 2. Lactation curve for pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin throughout a 18-month lactation. Dots are monthly average milk yield of 164 cows. Among a variety of models tested, an exponential model with five parameters showed the better adjustment. R^2_{adj} =adjusted R^2 by the number of parameters in each model. AICC= Akaike information criterion.

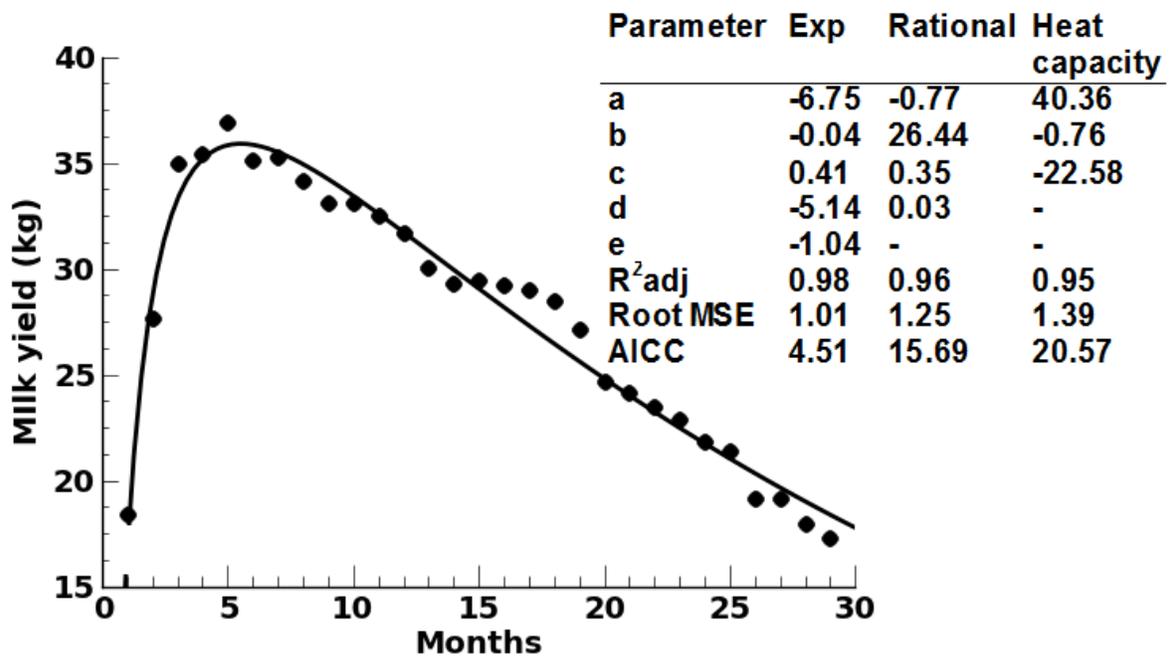


Fig. 3. Lactation curve for pluriparous Holstein cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin throughout a 29-month lactation. Dots are monthly average milk yield of 22 cows. Among a variety of models tested, the rational model showed the better adjustment. R^2_{adj} =adjusted R^2 by the number of parameters in each model. AICC= Akaike information criterion.

References

- Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B.N. Petrov and F. Csaki (Eds.), Second international symposium on information theory. Budapest, Academiai Kiado. pp. 267-281.
- Corradi-Freitas, P.R., Coelho, S.G., Rabelo, E., Quintao-Lana, A.M., Torres-Artunduaga, M.A., Mattana-Saturnino, H., 2010. Artificial induction of lactation in cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 2268–2272.
- Dematawewa, C.M.B., Pearson, R.E., VanRaden, P.M. 2007. Modeling extended lactations of Holsteins. *J. Dairy Sci.* 90, 3924–3936.
- Finucane, K. A., McFadden, T.B., Bond, J.P., Kennelly, J.J., Zhao, F.Q., 2008. Onset of lactation in the bovine mammary gland: Gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Funct. Integr. Genomics* 8, 251–264.
- Grossman, M., Koops, W.J., 2003. Modeling extended lactation curves of dairy cattle: A biological basis for the multiphasic approach. *J. Dairy Sci.* 86, 988–998.
- Knight, C.H., Wilde, C.J., 1993. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livest. Prod. Sci.* 35, 3–19.
- Lucy, M.C., Verkerk, G.A., Whyte, B.E., Macdonald, K.A., Burton, L., Cursons, R.T., Roche, J.R., Holmes, C.W., 2009. Somatotropic axis components and

nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J. Dairy Sci.* 92, 526–539.

Macrina, A.L., Kauf, A.C.W., Kensinger, R.S., 2011. Effect of bovine somatotropin administration during induction of lactation in 15-month-old heifers on production and health. *J. Dairy Sci.* 94, 4566-4573.

Mellado, M., Antonio-Chirino, E., Meza-Herrera, C., Veliz, F.G., Arevalo, J.R., Mellado, J., 2011. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 94, 4524-4530.

Mellado, M., Nazarre, E., Olivares, L., Pastor, F., Estrada, A., 2006. Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. *Anim. Sci.* 82, 1-5.

Nørgaard, J.V., Theil, P.K., Sørensen, M.T., Sejrsen, K., 2008. Cellular mechanisms in regulating mammary cell turnover during lactation and dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 2319-2327.

NRC., 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

Wagner, K.U., Smith, G.H., 2005. Pregnancy and stem cell behavior. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 25–36.

6.2. Estudio II

Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment

Abstract

The main objective of this study was to assess the effect of month of breeding on reproduction performance of Holstein heifers and cows inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. Pregnancy per artificial insemination (P/AI; 62,666 services over an eight-year period) both in heifers (n=20,313) and cows (42,353) from a large dairy herd in northern Mexico (26° N) were evaluated with the GENMOD procedure of SAS, with respect to month of AI. Overall, P/AI with sex-sorted semen was greater ($P<0.01$) in heifers (41.6%) than cows (17.3%). P/AI for cows serviced with conventional semen was ten percent points higher ($P<0.01$) in January and December (31 vs., 21%) than cows serviced with sex-sorted semen. While there was no difference in P/AI between the sex-sorted sperm and conventional semen in cows inseminated in July (16 and 18%, respectively), P/AI plummeted for both groups of cows during the summer and fall heat stress. P/AI was not different between heifers serviced with sex-sorted or conventional semen during the hottest months of the year (July to October). However, during the coldest month of the year (January and February), P/AI was 10 percentage points greater ($P<0.01$) in heifers serviced with

conventional than sex-sorted semen. It was concluded that in this hot climate cow and heifer fertility declined in the summer and fall when inseminated with conventional semen. However, the use of sex-sorted semen during summer and fall did not compromise the breeding success in heifers. Thus, this data suggests that sex-sorted semen promotes some embryonic thermoprotective mechanism, which leads to a marginal summer and fall fertility depression in this particular hot environment.

Keywords: Pregnancy, Heat stress, Artificial insemination, Fertility,

Introduction

The use of female-sorted sexed semen in dairy operations around the world has increased significantly during recent years (Seidel Jr, 2009; Norman et al., 2010). This reproductive technology can achieve 90% accuracy of a desired sex either with semen of dairy (DeJarnette et al., 2009; Norman et al., 2010) or *Bos indicus* bulls (Mellado et al., 2011), which has marked implications for the dairy industry in terms of economic returns. The most important advantages for using sexed semen are the fact that heifer calves are born on the dairy in a fast way to grow a herd internally, bio-security (Seidel, 2003; Weigel, 2004), and opportunities to create a more valuable calf crop (Seidel, 2003). The use of sexed semen is very useful for the dairy herds, since there is always a market for heifer calves but not for the bull calves. Additionally, the option of sex determination reduces calving difficulty in first calvers (Norman et al., 2010; heifer calves are typically smaller at

birth than bull calves). The sex-sorted semen gives producers a faster genetic progress, enabling them to keep more good cows and implement a more drastic culling (De Vries et al., 2008).

This reproductive technology is especially significant for dairy operations in hot environments where the adverse effect of high ambient temperatures hampers the reproductive processes in dairy cattle (De Rensis F, Scaramuzzi et al., 2003; Garcia-Isperto et al., 2007; Mellado et al. 2013), which force producers to rely on the buying of replacement dairy heifers or cows. Because of the additional expense and lower conception rates achieved with sex-sorted semen, it is not clear if this technology can thrive in environments where high pregnancy rates are not possible. Most studies reporting the negative effect of high ambient temperatures on fertility of dairy cows were published with conventional semen and with cows not treated with rbST. Genetic selection for high milk yield coupled with the use of rbST throughout lactation increases metabolic heat output per cow (Wheelock et al., 2010); this in turn increases the lactating dairy cows' susceptibility to heat stress due to *high metabolic heat* production. Thus, it is pertinent to reevaluate the impact of month of breeding in a hot environment in high milk-yielding cows where sex-sorted semen is used.

The main goal of this research was to investigate the relationship between month of breeding using either sex-sorted semen or conventional semen on pregnancy per artificial insemination (P/AI) in a herd of high milk-yielding Holstein cows. The hypothesis tested was that breeding during the summer and fall months are associated with reduced likelihood of pregnancy, regardless of semen category.

Material and methods

Animals and management

This was a retrospective study on one high producing large commercial dairy farm in northern Mexico (26° 23' N, 104° 47' W, elevation 1140 m, mean annual temperature 27°C, mean annual rainfall 230 mm), beginning in June 2004 and ending in July 2012. The study utilized breeding records for 62,666 inseminations of Holstein cows: 20,313 for nulliparous (14497 for sex-sorted and 5,816 for conventional semen) and 42,353 (13574 for sex-sorted and 28779 for conventional semen) for multiparous cows. The average number of lactating cows during the study was 2,525 cows, and the 3.5% fat-corrected milk yields per cow (rolling herd average) exceeded 11,500 kg of milk production per lactation throughout the duration of the study. All cows received recombinant bovine somatotropin (rbST; lactotropin, 500 mg of zinc bovine somatotropin, Elanco Animal Health, Mexico) administered subcutaneously every 14 days beginning at 60 DIM and continuing until 2 weeks before drying off.

Cows were housed in in open, dirt pens barns. Diets were formulated to meet, or exceed, National Research Council (NRC, 2001) nutrient requirements for net energy for lactation, crude protein, fibre, mineral and vitamins for Holstein cows weighing 670 kg and producing 40 kg per day of milk with 3.5% fat and 3.2% true protein, and consuming 23 kg/d of DM. Cows were fed twice daily and milked three times per day. In the case of heifers these were fed a TMR twice daily that met or

exceeded the nutritional requirements of Holstein heifers weighing 360 kg and gaining 0.8 kg/d (NRC, 2001).

Reproductive management

After calving, all cows were observed daily for signs of uterine diseases. All cows were palpated per rectum in the first 2 weeks postpartum for diagnosis of puerperal metritis. The voluntary waiting period for cows was 50 d. Cows received typical reproductive management: detection of estrus at 08:00 and 17:00 h with the a.m. – p.m. breeding rule. The AI was performed by well-trained herd personnel in charge of AI, and service sires were selected by the herd manager as part of their normal program of genetics and reproduction. The technology used for the sex-sorted semen was the same for all semen used in the present study. Pregnancy diagnoses were performed at 40 ± 3 days after AI and reconfirmed by palpation per rectum 15 days later by the herd veterinarian. Cows that were observed in estrus >15 d after AI were assumed nonpregnant and were reinseminated. Pregnancy per AI was defined as the number of cows pregnant at 45 to 50 d post-AI divided by the total number of cows that received that AI. Records for each cow were for one lactation.

The data were screened to include only those cows that had at least one service, were lactating (cows), were not hormonally induced into lactation and had an interval to first service greater than 35 d and less than 150 d. Only AI inseminations from the first 8 services with known outcomes (success or failure) were included in

the analysis. Also, cows bred by natural service were not included in the study. Heifers bred <12 and >16 mo of age were not included in the study.

Statistical analysis

Within month and animal category, The GENMOD procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) was implemented to assess the effect of semen category (sexed-sorted vs. conventional), animal category (heifers vs. cows), month of breeding, year of breeding, sire (n=89) and semen category x animal category and semen category x animal category (independent variables) on P/AI (dependent variable). Within animal category the GENMOD procedure of SAS was also used to assess the statistical significance of the effect of month of breeding and semen category on P/AI. Treatment means were separated using the probability of a statistical difference (PDIF option of SAS). Polynomial regression and Pearson correlation analyses were used to determine the relationship between month of breeding and P/AI for heifers and cows. Treatment differences with $P \leq 0.05$ were considered significant.

Results and discussion

The main effects of year of breeding, animal category, sire, month of breeding, and semen category significantly ($P < 0.05$) influenced P/AI. There was a month x type of semen (conventional or sexed) interaction ($P < 0.50$). Likewise, the interaction animal category x type of semen was an important source of variation ($P < 0.05$).

Although the technology for sexing sperm has not changed greatly in the past decade, refinements of this technology in recent years and more advanced semen preservation protocols (Rath et al., 2009) have speeded up the process and reduced damage to sperm (Seidel Jr, 2007), increasing motility and improve acrosome integrity and extended the lifespan of sorted bull sperm. This seems to explained the differences in P/AI due to year of breeding P/AI using sex-sorted semen was extremely different between sires (range 16 to 63%; $P < 0.01$). Other studies have reported a difference in fertility rates among bulls when using sexed semen (Doyle et al., Proceedings, Western Section American Society of Animal Science, 1999, 50:203-205). This wide variation in fertility when using sex-sorted semen might be due to factors related to the laboratories where freezing is done. It could be that sperm from some bulls are less susceptible to alterations in membrane functionality, motility characteristics and sperm morphology derived from the process of sexing semen. Some sires produce better cleavage rates (Zang et al., 2003), and semen from some sires is more susceptible to morphological damage than others by the cytometry process (Blondin et al., 2009; Gosálvez et al., 2011). Thus, identifying resistant bulls suitable for to the rough process of sex-sorting would allow the increase use of this reproductive technology.

Cows inseminated with sex-sorted semen had 25 percentage points lower P/AI (42.1 vs. 17.1%; $P < 0.01$) than heifers. Mean P/AI for cows was 23.9% for conventional and 17.1% for sexed semen. This 7 percentage units difference between type of semen in cows is much lower than that observed by other authors,

where sexed semen reduces pregnancy rates by >12 percentage units in Holsteins cows (Andersson et al., 2006; Schenk et al., 2009).

Influences of month of breeding on fertility of heifers inseminated either with sexed-sorted or conventional semen are presented in Figure 1. P/AI of heifers inseminated with conventional semen markedly decreased from April to October; thus, the highest P/AI was observed in the winter months (over 48%). On the other hand, P/AI of heifers bred with sex-sorted semen showed little change throughout the year. In fact, no differences ($P>0.05$) in P/AI were detected in the warmest month of the year (July to October) for heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen. Previous field trials indicates that pregnancy rates using sexed semen are generally 70-90% of conventional semen (Bodmer et al., 2005; Seidel and Schenk, 2002; DeJarnette et al., 2009), which did not happen during the months with the greatest heat load in the present study.

These results are intriguing because heat stress during the hottest months affected P/AI differently, with a marginal impact on heifers inseminated with sex-sorted semen and a marked impact in heifers bred with conventional semen.

The mechanisms by which sex-sorted semen ameliorate the magnitude of summer and fall infertility in heifers is puzzling, therefore, there is no choice but to speculate on these issue. Summer depression in fertility of dairy cattle is a multifactorial problem and heat stress may act at several physiological time points to disrupt establishment of pregnancy, including before ovulation, on the day of breeding, and during early embryonic development. The main causes for reduced fertility under extreme heat load lies in effects on oocyte (Gendelman et al., 2010; Payton et al., 2011) and embryonic development (García-Ispuerto et al., 2006;

Sakatani et al., 2012). Sexed spermatozoa do not hamper fertilization and cleavage rates (Carvalho et al., 2010; Underwood et al., 2010). Thus, sex-sorted sperm cells retain their capacity to produce viable embryos *in vitro*. Bovine embryos derived from sex-sorted sperm display a differential expression of developmentally important genes compared with their counterparts derived from conventional sperm cells (Morton et al., 2007). It could be that sex-sorted semen promotes some embryonic thermoprotective molecules or apoptosis inhibitor molecules, which block the effects of elevated temperature on early embryonic development. Data of Stewart et al (2011) support this view because the transfer of fresh embryos produced *in vitro* using sex-sorted semen to lactating heat-stressed dairy cows, increased the percentage of cows that got pregnant and carried their fetuses to term, compared with percentages of cows artificially inseminated with conventional semen. Another possibility is the fact that during the sexing process dead or damaged sperm are identified, gated out and disposed off as waste along with those sperm not measured properly, so that only living intact sperm are actually sorted (Sharpe and Evans, 2009). This possibly results in embryos of higher quality.

Regression coefficients for the relationship between month of breeding and P/AI for cows inseminated with sex-sorted or conventional semen are shown in Figure 2. Summer and fall months were associated with a depression in P/AI both in cows bred with sex-sorted or conventional semen. However, P/AI during July did not differ between cows bred with two types of semen. Again, results indicate that during one of the hottest months of the year marginal differences in P/AI existed between cows inseminated with sex-sorted or conventional semen, which points

toward a less drastic summer fertility depression with the use of sexed semen. Under the high ambient temperature tested, unknown changes in the cellular characteristics of embryos derived of sex-sorted semen could override the adverse effects of high ambient temperature developmental potential of these embryos.

Conclusions

Results indicate that Holstein heifers inseminated with sex-sorted sperm under field conditions in a commercial dairy herd without oestrus synchronization and under extreme heat load for the most part of the year, results in similar P/AI to that observed with the use of conventional semen during the summer and fall months. Similarly, analogous P/AI is expected in cows in July with either sex-sorted or conventional semen. Thus, the use of sex-sorted semen during the hottest months of the year under the condition tested seems to ameliorate the summer depression of fertility with the additional advantage of increasing the proportion of live heifer calves born.

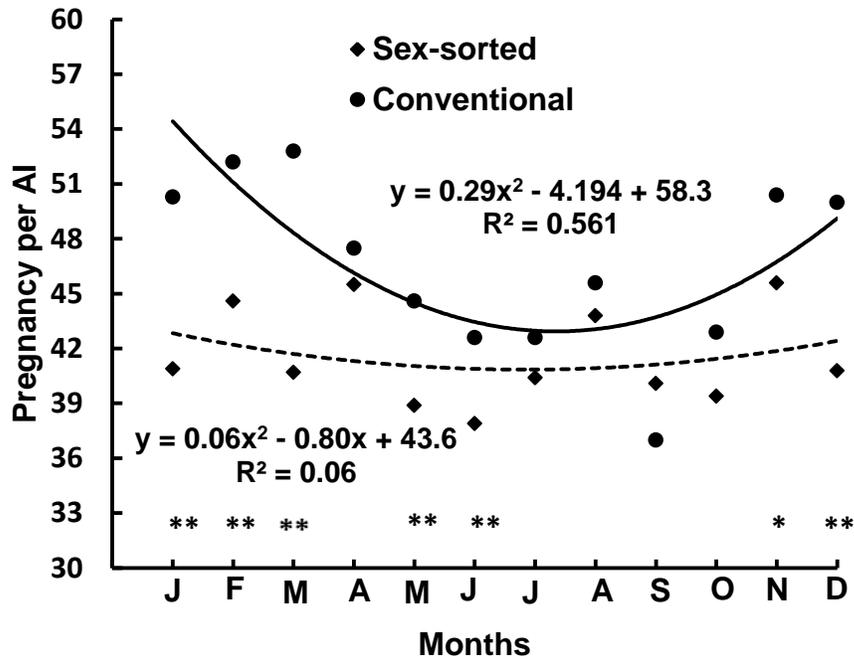


Figure 1. Seasonal variation in pregnancy per artificial insemination (P/AI) in Holstein heifers inseminated either with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. Dots and diamond are monthly P/AI means. Within months *=P<0.05, **=P<0.01.

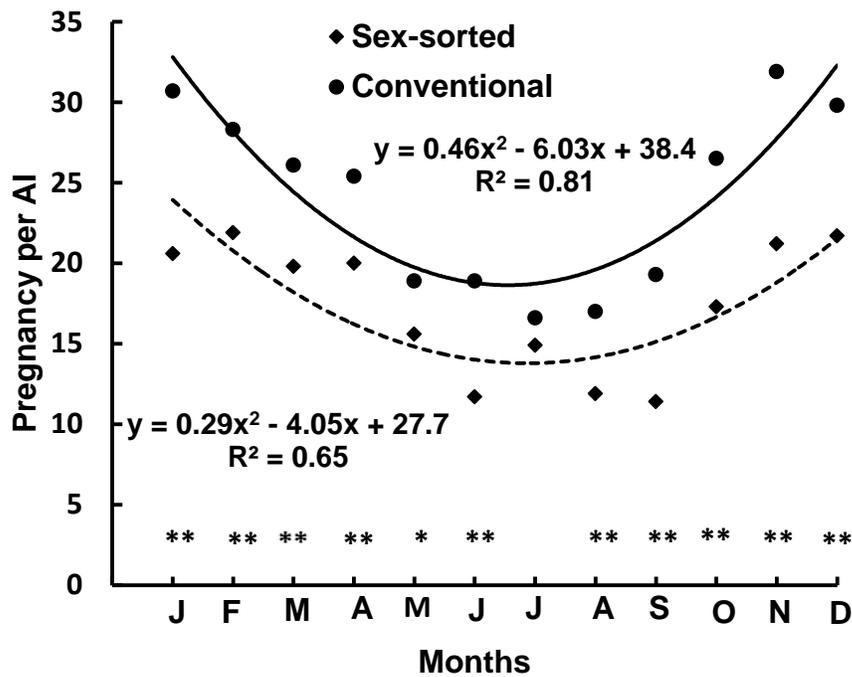


Figure 2. Seasonal variation in pregnancy per artificial insemination (P/AI) in high-milk yielding Holstein cows inseminated either with sex-sorted or conventional semen in a hot arid environment. Dots and diamond are monthly P/AI means. Within months *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$.

Acknowledgments

The authors thank Manuel Guillén for providing reproduction records of cows used in the present study.

References

- Andersson, M., Taponen, J., Kommeri, M., Dahlbom, M., 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein–Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 95–97.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, N., Crawford, L., Madan, P., King, W.A., 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71, 30-38.
- Bodmer, M., Janett, F., Hassig, M., Den Daas, N., Reichert, P., Thun, R., 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and nonsorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64,1647-1655.
- Carvalho, J.O., Sartori, R., Machado, G.M., Mourão, G.B., Dode, M.A.N., 2010. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 74, 1521-1530.
- DeJarnette, J.M., Nebel, R.L., Marshall, C.E., 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71, 49-58.
- De Vries, A., Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S., Rogers, G., 2008. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science* 91, 847-856.
- Garcia-Ispuerto, F.G., Lopez-Gatius, P., Bech-Sabat, G., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Nogareda, C., De Rensis, F., Lopez-Bejar, M., 2007. Climate factors affecting

- pregnancy rate of high-producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology* 67,1379-1385.
- Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S., Roth, Z., 2010. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 140,73-82.
- Gosálvez, J., Ramirez, M.A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K.M., Kjelland, M.E., Moreno, J.F., 2011. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 75,197-205.
- Mellado, M., Coronel, F., Estrada, A., Ríos, F.G., 2010. Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. *Tropical Animal Health and Production* 42, 1493-1496.
- Mellado, M., Sepulveda, E., Meza-Herrera, C., Veliz, F.G., Arevalo, J.R., Mellado J., de Santiago, A., 2013. Effects of heat stress on reproductive efficiency in high milk-yielding Holstein cows in a hot arid environment. *Revista Colombiana de Ciecias Pecuarias*. In press.
- Morton, K.M., Herrmann, D., Sieg, B., Struckmann, C., Maxwell, W.M.C., Rath, D., 2007. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sexsorted sperm. *Molecular Reproduction and Development* 74, 931-940.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

- Norman, H.D., Hutchison, J.L., Miller, R.H., 2010. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science* 93, 3880-3890.
- Payton, R.R., Rispoli, L.A., Saxton, A.M., Edwards, J.L., 2011. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. *Journal of Reproduction and Development* 57, 481-491.
- Rath, D., Moench-Tegeder, G., Taylor, U., Johnson, L.A., 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71, 22-29.
- Sakatani, M., Alvarez, N.V., Takahashi, M., Hansen, P.J., 2012. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *Journal of Dairy Science* 95, 3080–3091.
- Seidel Jr, G.E., 2003. Economics of selecting for sex: The most important genetic trait. *Theriogenology* 59, 585–598.
- Seidel Jr, G.E., 2009. Sperm sexing technology-The transition to commercial application. An introduction to the symposium “Update on sexing mammalian sperm”. *Theriogenology* 71, 1–3
- Seidel Jr, G.E., 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68, 443-446.
- Schenk, J.L., Cran, D.G., Everett, R.W., Seidel Jr, G.E., 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71, 717-728.

- Sharpe, J.C., Evans, K.M. 2009. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71, 4–10.
- Stewart, B.M., Block, J., Morelli, P., Navarette, A.E., Amstalden, M., Bonilla, L. Hansen, P.J., Bilby, T.R., 2011. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Journal of Dairy Science* 94, 3437–3445.
- Underwood, S.L., Bathgate, R., Pereira, D.C., Castro, A., Thomson, P.C., Maxwell, W.M.C., Evans, G., 2010. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology* 73, 97-102.
- Weigel, K.A., 2004. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *Journal of Dairy Science* 87(E-Suppl.), E120–E130.
- Wheelock, J.B., Rhoads, R.P., VanBaale, M.J., Sanders, S.R., Baumgard, L.H., 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 93, 644–655.

7. LITERATURA CITADA

Akers, R. M. 1985. Lactogenic hormones: binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation and milk biosynthesis in ruminants. *J. Dairy Sci.* 68:501-519.

Akers, R. M. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1222-1234.

Akers, R. M., and A. M. Lefcourt. 1984. Effects of presence of calf on milking induced release of prolactin and oxytocin during early lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:115-122.

Baldwin, R. L., R. S. Emery, and J. P. McNamara. 1994. Metabolic relationships in the supply of nutrients for milk protein synthesis: Integrative modeling. *J. Dairy Sci.* 77: 2821-2836.

Bauman, D. E. 1992. Bovine somatotrophin: review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* 75:3432-3451.

Bauman, D. E., and P. J. Eppard. 1985. Response of high producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *J. Dairy Sci.* 68:1352-1362.

Berry, S. D., R. D., Howard, P. M. Jobst, H. Jiang, R. M. Akers. 2003. Interactions between the ovary and the local igf-i axis modulate mammary development in prepubertal heifers. *J. Endocrinol.* 177, 295–304.

Bodmer, M., F. Janett, M. Hässig, N. den Daas, P. Reichert, and R. Thun. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64:1647–1655.

Borchersen, S. and M. Peacock. 2009. Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology* 71:59–63.

Byatt, J. C., W. C. Warren, P.J. Eppard, N. R. Staten, G. G. Krivi and R. J. Collier. 1992. Ruminant placenta lactogens: structure and biology. *J. Anim. Sci.* 70:2911-2923.

Caja, G., X. Such, M. Rovai, M. P. Molina, N. Fernández, A. Torres, L. Gallego, 2002. Aptitud al ordeño mecánico y morfología mamaria en ovino lechero. *Sitio Argentino de Prod. Anim.* 19-48.

Capuco, A. V., D. L. Wood, R. Baldwin, K. Mcleod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177-2187.

Capuco, A.V., S. E. Ellis, S. A. Hale, E. Long, R. A. Erdman, X. Zhao, and M. J. Paape. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl):18-31.

Capuco, A. V., J. E. Keys, and J. J. Smith. 1989. Somatotropin increases thyroxine-5 α -monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J. Endocrinol.* 121:205–211.

Coffey, M.P., G. Simm, J. D. Oldham, W.G. Hill and S. Brotherstone. 2004. Genotype and diet effects on energy balance in the first three lactations of dairy cows. *J Dairy Sci.* 87:4318-4326.

Collier, R.J., D.E. Bauman, and R.L. Hays. 1975. Milk production and reproductive performance of cows hormonally induced into lactation. *J. Dairy Sci.* 58:1524.

Collier, R. J., and H. A. Tucker. 1978. Regulation of cortisol uptake in mammary tissue of cows. *J. Dairy Sci.* 61:1709–1714.

Corradi-Freitas, P. R., S. G. Coelho, E. Rabelo, A. M., Quintao-Lana, Torres- M. A. Artunduaga, H. Mattana-Saturnino. 2010. Artificial induction of lactation in cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 39:2268–2272.

Davis, S. R., and G. A. Hughson. 1988. Measurement of functional udder capacity in lactating Jersey cows. *Aust. J. Agric. Res.* 39:1163–1168.

Deshmukh, B. T., V. G. Joshi, M. D. Patil, B. A. Talvelkar, and A. J. Mhatre. 1992. Induced lactation in dairy cattle for increased milk production: effect on milk constituents. *Indian J. Dairy Sci.* 45:110-113.

Dembinski, T. C., and R.P.C. Shiu. 1987. Growth factors in mammary gland development and function. Pages 355–381 *in* *The Mammary Gland. Development, Regulation, and Function.* M. C. Neville and C. W. Daniel, ed. Plenum Press, New

York, NY.

DeJarnette, J. M., R. L. Nebel, and C. E. Marshall. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71:49–58.

Djiane, J., and P. Duran. 1977. Prolactin-progesterone antagonism in self regulation of prolactin receptors in the mammary gland. *Nature*. 266:641.

Erb, R. E., B. P. Chew, H. F. Keller, and P. V. Malven. 1977. Effect of hormonal treatments prior to lactation on hormones in blood plasma, milk, and urine during early lactation. *J. Dairy Sci.* 60:557-563.

Erdman, R. A., and M. Varner. 1995. Fixed yield responses to increased milking frequency. *J. Dairy Sci.* 78:1199–1203.

Evans, E. E. 1933. Initiation of copious milk secretion in virgin goats by anterior pituitary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 30:1372.

Feuermann, Y., S. J. Manbjeesh, L. Niv-Spector, D. Levin, and A. Shamay. 2006. Prolactin affects leptin action in the bovine mammary gland via the mammary fat pad. *J. Endocr.* 191:4007-413.

Finucane, K. A., T. B. McFadden, J. P. Bond, J. J. Kennelly, and F. Q. Zhao. 2008. Onset of lactation in the bovine mammary gland: Gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Funct. Integr. Genomics* 8:251-264.

Flint D. J. and C. H. Knight. 1997. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 2:41-48.

Forsyth, I. A. 1986. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *Journal of Dairy Science* 69, 886–903.

Frandsen, R. D., W. L. Wilke, and A. D. Fails. 2009. *Anatomy and physiology of farm animals*. Wiley- Blackwell. Ames, Iowa, USA.

Glauber, C. E. 2007. Fisiología de la lactación en la vaca lechera 24:274-281. Dpto. Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias.

Gorewit, R. C., and H. A. Tucker. 1976. Glucocorticoid binding in mammary slices of cattle in various reproductive states. *J. Dairy Sci.* 59:1890–1896.

Hale, S. A., A. V. Capuco, and R. A. Erdman. 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J. Dairy Sci.* 86: 2061-2071.

Hayakawa, H., T. Iría, A. Takimoto, A. Ideta, and Y. Aoyagy. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm *Theriogenology* 71: 68–73.

Hayden, T. J., C. R. Thomas, and I. A. Foreshyth. 1979. Effect of number of young born (litter size) on milk yield of goats: role of placental lactogen. *J. Dairy Sci.* 62:53-57.

Hindery G. A., C. W. Turner. 1965. Effect of administration of Lthyroxine 25 and 50% above secretion rate on lactating cows. *J Dairy Sci*; 48:596-601. En: Knobil E, Neill, J. D. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Rasven Press; 1994. p.1083.

Hohenboken, W. D. 1999. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology* 52:1421–1433.

Johnsson, I. D. 1988. The effect of pubertal nutrition on lactation performance by dairy cows. In: *Nutrition and Lactation in the Dairy Cow*, pp. 171-192 [P. C. Garnsworthy, editor]. London: Butterworth.

Kahl, S., Capuco, A. V., Binelli, M., Vanderkooi, W. K., Tucker, H. A. 1995. Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropina: thyroid status of lactating, primiparous cows. *J. Dairy Sci.* 78:2150-2158.

Kimmins, S. and L. A. Mac Laren. 2001. Oestrous cycly and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22:742-748.

Kume, S. I., and S. Tanabe. 1993. Effect of parity on colostrual mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrums as a mineral souece for newborn calves. *J. Dairy Sci.* 76:1654-1660.

Kurykin, J., U. Jaakma, M. Jalakas, M. Aidnik, A. Waldmann, L. Majas. 2007. Pregnancy percentage following deposition of sex–sorted sperm and different sites whiting the uterus in estrus–synchronized heifers. *Theriogenology* 67:754–759.

Lacasse, P., V. Lollivier, R. M. Bruckmaier, Y. R. Boisclair, G. F. Wagner, and M. Boutinaud, 2011. Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows J. Dairy Sci. 94:1302–1309.

Lefcourt, A. M., and R. M. Akers. 1983. Is oxytocin really necessary for efficient milk removal in dairy cows? J. Dairy Sci. 66:2251–2259.

Li, M., X. Liu, G. Robinson, U. Bar-Peled, K.U. Wagner, W.S. Young. 1997. Mammary derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. Proc. National Academy of Sciences of the U.S.A. 94: 3425–3430.

Loor, J. J., M. Bionaz, and J. K. Drackley. 2013 .Systems Physiology in Dairy Cattle: Nutritional Genomics and Beyond. Anim. Biosc. 1:365-392.

Lupoli, B. B., Johansson, K. Uvnas-Moberg, and K. Svennersten- Sjaunja. 2001. Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. J. Dairy Res. 68:175-187.

Macrina, A. L., A. C. W. Kauf, R. S. Kensinger. 2011. Effect of bovine somatotropin administration during induction of lactation in 15-month-old heifers on production and health. J. Dairy Sci. 94:4566-4573.

Magliaro, A. L., R. S. Kensinger, S. A. Ford, M. L. Oconnor, L. D. Muller, and G. Graboski. 2004. Induced lactation in nonpregnant cows: Profitability and response to bovine somatotropin. J. Dairy Sci. 87:3290-3297.

Marini, P.R. and I. Galassi, 2011. Relación entre celo–inseminación con semen sexado y porcentaje de preñez en vaquillas Holstein. *Rev. Vet.* 22:52–54.

Medina, M., L. Cattaneo, J. Caballero, H. Cerrate, M. Panarace, L. Ferré, M. Dalla. B. Lasta. 2002. Semen sexado y congelado en Argentina. Resultados de su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Taurus* 13:4–8.

Mellado, M., E. Nazarre, L. Olivares, F. Pastor, and A. Estrada. 2006. Milk production and reproductive performance of cows induced with bovine somatotrapin. *Anim. Sci.* 82:555-559.

Mellado, M., E. Antonio-Chirino, C. Meza-Herrera, F. G. Veliz, J. R. Arevalo, J. Mellado, A. de Santiago. 2011. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 94,:4524-4530.

Mellado, M., A. Bernal, R. Mendoza, and E. Carrillo. 1996. Hormonal induction of lactation in prepuberal and multiparous crossbred goats kept under extensive conditions. *Small Rumin. Res.* 19:143-147.

Meites, J. 1961. Hormonal induction of lactation and galactopoiesis. Page 321 *in* *Milk: the mammary gland and its secretions*. Vol. 1. S. K. Kon and A. T. Cowie, eds. Academic Press, New York and London.

Meyer, M. J., A. V. Capuco, D. A. Ross, L. M. Lintault, and M. E. Van Amburgh. 2006. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal bovine mammary

gland. I. Epithelial cell proliferation, parenchymal accretion rate, and allometric growth. *J. Dairy Sci.* 89:4298–4304.

Meyer, M. J., A.V. Capuco, D. A. Ross, L. M. Lintault, M.E. Van Amburgh. 2006. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal heifer mammary gland. I. Parenchyma and fat pad mass and composition. *J. Dairy Sci.* 89:4289–4297.

Meyer, M. J. A. V. Capuco, D. A. Ross, L. M. Lintault, and M. E. Van Amburgh. 2006. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal heifer mammary gland: I. Parenchyma and fat pad mass and composition. *J. Dairy Sci.* 89:4289–4297.

Mills, E. S., and Y. J. Topper. 1970. Some ultrastructural effects of insulin, hydrocortisone and prolactin on mammary gland explants. *J. Biol. Chem.* 44:310–328.

Nagasawa, H., C. L. Chen, and J. Meites. 1969. Effects of estrogen implant in median eminence on serum and pituitary prolactin levels in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132:859.

Narendran, R., R. R. Hacker, T. R. Batra, and E. B. Burnside. 1974. Hormonal induction of lactation in the bovine: Mammary gland histology and milk composition. *J. Dairy Sci.* 57:1334-1340.

Norgaard, J. V., P. K. Theil, M. T. Sorensen, and K. Sejrsen. 2008. Cellular mechanisms in regulating mammary cell turnover during lactation and dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:2319-2327.

Nørgaard, J., A., M. T. Sørensen, J. B. Sørensen, B. Andersen, and K. Sejrsen. 2005. Mammary cell turnover and enzyme activity in dairy cows: Effects of milking frequency and diet energy density. *J. Dairy Sci.* 88:975–982.

Norman, H.D., J. L. Hutchison, and R.H. Miller. 2010. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *J. Dairy Sci.* 93:3880-3890.

O'Brien, B., G. Ryan, W. J. Meaney, D. McDonagh, and A. Kelly. 2002. Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *J. Dairy Res.* 69:367–374.

Oka, T., M. Yoshimura, S. Lavandero, K. Wada, and Y. Ohba. 1991. Control of growth and differentiation on the mammary gland by growth factors. *J. Dairy Sci.* 74:2788-2800.

Palma, G.A., N. Olivier, C. Neumuller, and F. Sinowatz. 2007. Efecto del semen sexado por medio de citometría de flujo sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* y la ultraestructura de blastocistos producidos *in vitro*. *Resúmenes del VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*, IRAC, Córdoba (Argentina), p. 205.

Reece, W. O. 2005. Functional anatomy and physiology of domestic animals. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore. Marilad. USA.

Rivera, E. M. 1964. Maintenance and development of whole mammary glands of mice in organ culture. *J. Endocrinol.* 30:33–39.

Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming, and D. C. Wathes. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples through the oestrus cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122:965-79.

Rowson, A.R., K.M. Daniels, S.E. Ellis, and R.C. Hovey. 2012. Growth and development of the mammary glands of livestock: A veritable barnyard of opportunities. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 23:5557–566.

Salama A., A. K., G. Caja, E. Albanell, S. Carné, R. Casals, and X. Such. 2007. Mammogenesis and induced lactation with or without reserpine in nulliparous dairy goats. *J. Dairy Sci.* 90:3751-3657.

Schams, D., I. Russe, E. Schallenberger, S. Prokopp, and J. S. Chan. 1984. The role of steroid hormones, prolactin and placental lactogen on mammary gland development in ewes and heifers. *J.Endocrinol.* 102, 121–130.

Schenk, J. L., and G. E. Seidel Jr.. 2007. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed spermatozoa: Effects of laser intensity, staining conditions and catalase. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64:165–177.

Seidel, G. E. Jr., J. L. Schenk, L. A. Herickhoff, S. P. Doyle, Z. Brink, R. D. Green, and D. G. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407–1420.

Seidel, G. E. Jr. 2003. Economics of selecting for sex: The most important genetic trait. *Theriogenology* 59:585–598.

Seidel, G. E., Jr., and J. L. Schenk. 2002. Field trials with sexed, frozen bovine semen. Pages 64–69 in Proc. 19th Tech. Conf. on Artificial Insemination and Reproduction. Natl. Assoc. Animal Breeders, Columbia, MO.

Seidel, G. E., Jr. 2002. Sexing sperm for beef and dairy cattle breeding. Pages 281–286 in Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction. M. J. Fields, R. S. Sand, and J. V. Yelich, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Seidel, G. E. and J. L. Schenk. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim. Reprod. Sci.* 105:129–138.

SIAP, 2012, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA.

Sinowatz, F., D. Schams, S. Kolle, A. Plath, D. Lincoln, and M. J. Waters. 2000. Cellular localization of GH receptor in the bovine mammary gland during mammaryogenesis, lactation and involution. *J. Endocrinol.* 166:503-510.

Skrzeczowski, L., K. Lembowicz, A. Rabek, E. Stupnicka, and H. Kaciuba-Uscieko. 1979. Hormone induced lactation in cows culled from herd as a reproductive failures. *Prace I Mat. Zootech.* 20:31-39.

Smith K. L., and F. L. Schanbacher. 1974. Hormone-induced lactation in the bovine. II. Response of nulligravida heifers to modified estrogen-progesterone treatment. *J. Dairy Sci.* 57:296-303.

Smith, K. L., L. A. Muir, L. L. Ferguson, and H. R. Conrad. 1971. Selective transport of IgG into the mammary gland: Role of estrogen and progesterone.

J. Dairy Sci. 54:1886.

Smith, K.L. and F.L. Schanbacher. 1973. Hormone induced lactation in the bovine I. Lactational performance following injections of 17β -estradiol and progesterone. J. Dairy Sci., 56, 738-743.

Smith, K. L., L. A. Muir, L. C. Ferguson, and H. R. Conrad. 1971. Selective transport of IgG1 into the mammary gland: Role of estrogen and progesterone. J. Dairy Sci. 54:1886.

Smith, K. L., and F. L. Schanbacher. 1973. Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17β -estradiol and progesterone. J. Dairy Sci. 56:738.

Smith, K. L., and F. L. Schanbacher. 1974. Hormone induced lactation in the bovine. II. Response of nulligravida heifers to modified estrogen-progesterone treatment. J. Dairy Sci. 57:296–303.

Smith, K. L., and L. C. Ferguson. 1970. Bovine colostrin formation: A possible role of estrogen. Federation Proc. 29:1455.

Spencer, T. E. and F. W. Bazer, 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. Biol. Reprod. 53:1527-1543,

Stricker, P., and R. Grueter. 1928. Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee laiteuse. Compt. Rend. Soc. Biol. 99:1978–1980.

Troccon, J. L., and M. Petit. 1989. Croissance des génisses de renouvellement et performances ultérieures (Growth of replacement heifers and their subsequent milk production). *INRA Prod. Anim.* 2:55-64.

Tucker, H. A. 2000. Symposium: Hormonal regulation of milk synthesis. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J. Dairy Sci.* 83:874-884.

Turner, C.W., H. Yamamoto, and H.L. Ruppert, JR. 1956. The experimental induction of growth of the cow's udder and the initiation of milk secretion. *J. Dairy Sci.* 39:1717-1722.

Turner, C. W. 1959. The experimental induction of growth of the cow's udder and the initiation of milk secretion. *Missouri Agr. Exp. Sta. Bull.* 697.

Turner, C. W., R. Williams, and G. A. Hindery. 1963. Growth of the udders of dairy heifers as measured by milk yield and desoxyribonucleic acid. *J. Dairy Sci.* 46:1390.

Vonderhaar, B. K. A. and E. Greco 1979. Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinol.* 104:409-418.

Waldo, D. R., A. V. Capuco, and C. E. Rexroad. 1989. Replacement heifer growth rate affects milk producing ability. *Feedstuffs* 27:15-17.

Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2007. Optimal timing and duration of unilateral frequent milking during early lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5042–5048.

Weigel, K. A. 2004. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *J. Dairy Sci.* 87(E Suppl.):E120–E130.

Williams, R., O. A. Childs, D. Smith and C. W. Turner. 1955. The effects of the hormones progesterone and estrogen in initiating lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 38:609-613.

Williams, R., and C. W. Turner. 1961. Effect of increased levels of ovarian hormones and duration of treatment on experimental induction of growth of the cow's udder. *J. Dairy Sci.* 44:524-529.

Williams, R., and C. W. Turner. 1962. Study of successive experimental lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 45:1248.

Wilde, C. J., C. V. Addey, P. Li and D. G. Fernig. 1997. Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp. Physiol.* 82:943–953.