

Factores asociados del estrés calórico y producción de leche sobre la tasa de gestación en bovinos en sistemas intensivos

The effect of heat stress and milk yield on pregnancy rates of dairy cattle under intensive production systems

Renato Raúl Lozano Domínguez^a, Carlos Gustavo Vásquez Peláez^b,
Everardo González Padilla^b

RESUMEN

Los objetivos fueron determinar los efectos del estrés calórico, la producción láctea y sus interacciones con las prácticas de manejo, sobre la tasa de gestación (GEST) de vacas Holstein. Se analizaron 23,926 registros de inseminación artificial de nueve hatos lecheros de Cd. Delicias, Chihuahua. Por cada unidad de incremento del índice temperatura/humedad promedio del mes, la GEST disminuyó en 0.7 % ($P < 0.01$). La GEST se redujo a partir del mes de mayo y se mantuvo en ese nivel hasta el mes de octubre, cuyos valores fueron inferiores a lo observado de noviembre a abril ($P < 0.01$). Las vacas con producción de leche estimada a 305 días (PROD) superior a 11,000 L tuvieron menor GEST ($P < 0.01$). De junio a octubre las vacas con PROD superior a 10,000 L mantuvieron GEST por debajo a lo observado en vacas con menor nivel de PROD ($P < 0.01$). La GEST se redujo con índices temperatura/humedad en el día del servicio (THIS) de 72 y mayores ($P < 0.01$), cuyo efecto fue más severo cuando el THIS fue superior a 78 ($P < 0.01$), excepto en vacas con PROD menor a 7,000 L ($P > 0.05$). Las vacas multíparas tuvieron menor GEST a THIS superiores a 72, que las primíparas ($P < 0.01$). La administración de somatotropina bovina (BST), el número de ordeños por día y sus interacciones con THIS, así como tamaño del hato no afectaron la GEST ($P > 0.05$). La PROD fue mayor en vacas con más de dos partos, con administración de BST, con esquemas de tres ordeños por día y las que se manejaron en hatos grandes ($P < 0.01$).

PALABRAS CLAVE: Vacas lecheras, Fertilidad, Estrés calórico, Producción láctea.

ABSTRACT

The objectives of this research were to determine the effects of heat stress, milk production, and their interaction with management practices on pregnancy rates (GEST) in Holstein cows. Twenty three thousand nine hundred and twenty six (23,926) artificial insemination (AI) records from nine dairies in Ciudad Delicias city, State of Chihuahua, Mexico, were analyzed. For each increase unit in the monthly average temperature-relative humidity index (THI), GEST decreased in 0.7% ($P < 0.01$). GEST was decreased starting in May and it remained low through October. These values were lower than those observed from November to April ($P < 0.01$). Cows with 305-day estimated milk production levels (PROD) $> 11,000$ L had lower GEST ($P < 0.01$). From June to October cows with PROD $> 10,000$ L had lower GEST than cows with lower PROD ($P < 0.01$). GEST decreased with day-of-service THI (THIS) ≥ 72 ($P < 0.01$). This effect was even stronger with THIS exceeding 78 ($P < 0.01$), with the exception of cows with PROD levels $< 7,000$ L ($P > 0.05$). Multiparous cows had lower GEST at THIS > 72 , than primiparous ($P < 0.01$). The administration of bovine somatotropin (BST), the number of milkings (2X, 3X) per day, and their interaction with THIS, as well as herd size did not affect GEST ($P > 0.05$). PROD was higher in cows with > 2 calvings, those receiving BST, those under 3X systems, and those in large herds ($P < 0.01$).

KEYWORDS: Dairy cattle, Fertility, Heat stress, Milk yield.

Recibido el 23 de julio de 2004 y aceptado para su publicación el 26 de enero de 2005

^a Centro Regional de Investigación Norte - Centro del INIFAP. Campo Experimental Pabellón, Km 32.5 Carr. Aguascalientes - Zacatecas, Rincón de Romo, Ags. Tel. 01465-9580167. renato_lozano@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

^b Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Este estudio forma parte del proyecto financiado por CONACYT Nacional (31457-B).

INTRODUCCIÓN

En el ganado lechero se ha observado en los meses calurosos una reducción de la tasa de gestación^(1,2,3), donde se ha definido el período crítico del estrés calórico sobre la fertilidad y el desarrollo embrionario dos días antes del servicio^(4,5), y el día del mismo^(3,5). Se ha calculado que por cada unidad de incremento del índice temperatura/humedad en el día del servicio, se da una reducción de 0.5 % en la tasa de no retorno al estro a los 45 días post-servicio⁽⁵⁾.

Se ha demostrado en estudios *in vitro*, que la exposición del ovocito y de embriones de dos a ocho células a altas temperaturas, reduce la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario. Adicionalmente, la exposición de los embriones a patrones de temperatura similares a los experimentados en vacas lactantes durante los días de verano (38.6 a 40.5 °C), en los primeros ocho días post-fertilización, redujo el porcentaje en la viabilidad y el desarrollo embrionario⁽⁶⁾. En estudios *in vivo* se ha confirmado que los embriones en sus primeros tres días de edad son sensibles al estrés calórico⁽⁷⁾.

La industria lechera especializada, cada vez impone mayor exigencia fisiológica a las vacas con lactaciones de mayor cuantía. Se ha calculado en los últimos 25 años, que el incremento de la producción de leche por vaca ha implicado la reducción en la tasa de fertilidad del primer servicio entre 0.5 y 1 % anual^(8,9,10,11). Recientemente, se determinó que la magnitud de la depresión de la tasa de no retorno al estro a 45⁽⁵⁾ y 90 días⁽¹²⁾ fue más acentuada en las vacas con un mayor potencial de producción. Sin embargo, la tasa de no retorno al estro es un indicador poco preciso, por lo que resulta difícil llegar a conclusiones sin analizar otros factores.

A pesar de conocer la relación negativa del estrés calórico y el incremento en la producción láctea sobre la tasa de gestación, se desconoce la magnitud de estos efectos en condiciones concretas de producción, así como también, qué otros factores comunes en los sistemas intensivos actuales pueden estar interactuando con el estrés calórico para hacer

INTRODUCTION

During the hot season dairy cattle experience decreased pregnancy rates^(1,2,3). The critical period when heat stress affects fertility and embryo development has been defined as the two days prior to service^(4,5), and the day of service itself^(3,5). For each increase unit in the temperature:humidity index on the day of service (THIS), a 0.5 % decrease in the rate of non return to estrus (RNRE) has been estimated at 45 d post-service⁽⁵⁾.

In vitro studies have shown that exposing both the oocyte and 2-8-cell embryos to high temperatures results in decreased fertilization rates and delayed embryo development. Additionally, the exposure of embryos to temperature patterns similar to those experienced by lactating cows during summer days (38.6 to 40.5 °C) in the first eight days post-fertilization, resulted in decreased percent livability/embryo development⁽⁶⁾. *In vivo* research has confirmed that embryos are sensitive to heat stress during their three first days of age⁽⁷⁾.

The specialized dairy industry imposes more and more physiological demands on higher and higher-producing cows. In the last 25 years, it has been calculated that the increased milk yield per cow has resulted in decreased first service fertility at a rate between 0.5 and 1 % per year^(8,9,10,11). It was recently determined that the magnitude of decreased RNRE at 45⁽⁵⁾ and 90⁽¹²⁾ days was more pronounced in cows with a higher production potential. Nevertheless, the RNRE is not a precise indicator, so that it is difficult to draw any conclusions using only the RNRE without analyzing other important factors. In spite of knowing the negative ratio that exists between heat stress and increased milk yield over pregnancy rates, the magnitude of these effects remains unknown when related with precise production conditions. Also, knowledge is lacking about any other common factors inherent to current intensive systems that can interact with heat stress to further decrease herd fertility rates. Therefore, the objective of this research was to determine the effects of heat stress, milk yield, cow parity, use of BST, number of milking per day, and the interactions of these factors

más crítica la disminución de la fertilidad en los hatos. Es por esto que los objetivos del estudio fueron determinar los efectos del estrés calórico, el nivel de producción láctea, la paridad de las vacas, el uso de la somatotropina bovina, el número de ordeños y sus interacciones, sobre la tasa de gestación en vacas Holstein de hatos lecheros comerciales con un alto nivel productivo y tecnológico, en la cuenca lechera de Cd. Delicias, Chihuahua.

MATERIALES Y METODOS

Registro y cálculo de las variables climáticas

La información climática se obtuvo de una estación computarizada de Ciudad Delicias, Chihuahua en los años del estudio (1999 y 2000), dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), la cual está ubicada dentro de un radio menor a 20 km de los hatos lecheros en estudio. Se estimó el índice temperatura/humedad (THI) según lo establecido⁽⁴⁾:

$$\text{THI} = ^\circ\text{F} - ((0.55 - ((\text{HR} / 100) \times 0.55)) * (^\circ\text{F} - 58))$$

Características generales de los hatos lecheros

Los nueve hatos lecheros en estudio se encuentran en la cuenca lechera de Cd. Delicias, Chihuahua, la que se caracteriza por ser una área de riego importante para la producción de forrajes y el mantenimiento del sistema de producción de leche intensiva. Las unidades cuentan con un alto nivel tecnológico y productivo, y están en una organización que procesa, comercializa y distribuye los productos lácteos. Las vacas que recibieron los servicios de inseminación artificial analizados tuvieron en promedio 2.4 ± 1.6 partos; 145.3 ± 131.2 días en leche y 2.9 ± 2.4 servicios. La producción de leche estimada a 305 días fue de $9,525.9 \pm 1,971.6$ L. Las vacas en todos los hatos fueron alimentadas con una dieta integral de acuerdo a su estado productivo. Los programas de manejo, de medicina preventiva y de los aspectos reproductivos fueron similares.

Registro de la información productiva

Se utilizaron 23,926 registros de inseminación artificial de vacas lactantes de la raza Holstein. Se

on the pregnancy rates of Holstein cows in commercial dairies with high production/high technological levels in Northern Mexico (Ciudad Delicias City, State of Chihuahua).

MATERIALS AND METHODS

Records and calculation of weather variables

Weather information was obtained from a computerized station in Ciudad Delicias, Chihuahua during the years of study (1999 and 2000). This weather station is a part of Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (Mexico's National Institute for Forestry, Agriculture, and Animal Research, *INIFAP*), located within a <20 km radio from the dairies included in this study. The temperature–relative humidity index (THI) was estimated as previously established⁽⁴⁾:

$$\text{THI} = ^\circ\text{F} - ((0.55 - ((\text{RH} / 100) \times 0.55)) * (^\circ\text{F} - 58))$$

General dairy traits

All nine dairies are located in the Ciudad Delicias dairy belt, which is known for its important irrigation infrastructure for intensive forage/dairy production. Dairies have high technological/production levels, and they are members of an organization to process, sale, and distribute dairy products. Cows whose AI records were analyzed averaged 2.4 ± 1.6 parturitions; 145.3 ± 131.2 d in milk, and 2.9 ± 2.4 services. Estimated 305-d milk production was $9,525.9 \pm 1,971.6$ L. Cows in all dairies were fed a total mixed ration in agreement with their production stage. Management, preventive medicine, and reproductive programs were similar in all nine herds.

Production records

Twenty three thousand nine hundred and twenty six (23,926) AI records from lactating Holstein cows were used. A calve-to-service interval >20 d was determined. From each record the following information was obtained: cow number; parity number (NP); calving date; service date (including day, month and year [MS]); service number; days in milk at service; number of milkings (NM);

tuvo un intervalo al servicio mayor a los 20 días post-parto. De cada registro, se tomó la siguiente información: número de la vaca; número de parto (NP); fechas de parto; día, mes (MS) y año de servicio; número de servicio; los días en leche al momento del servicio (DEL); el número de ordeños (NORD), la producción láctea estimada a 305 días (PROD); el resultado del diagnóstico de gestación de 45 a 60 días posteriores al servicio; si la vaca estaba o no en un programa de administración de somatotropina bovina (BST); así como de información general del hato como el número de ordeños, tipo de alimentación y número de vacas por hato.

La producción de leche (PL) estimada a 305 días se clasificó en cinco niveles: 1) menor de 7,000 L (n=2384); 2) entre 7,000 y 8,499 L (n=4135); 3) entre 8,500 y 9,999 L (n=7313); 4) entre 10,000 y 10,999 L (n=4646); 5) mayor a 11,000 L (n=5372).

Independientemente del mes de servicio, el índice temperatura/humedad en el día del servicio (THIS) se agrupó en seis rangos: 1) menor a 60 (n=1272); 2) entre 60 y 65.9 (n=2038); 3) entre 66 y 71.9 (n=5498); 4) entre 72 y 77.9 (n=5850); 5) entre 78 y 83.9 (n=7914); 6) mayor a 84 (n=1354).

El número de partos se agrupó en tres categorías: a) vacas de primer parto (n=8,318); b) vacas de dos partos (n=7,224); c) vacas de tres o más partos (n=8384). El tamaño del hato por el número de vientres (NVIE) se dividió en: a) hatos con menos de 500 vacas (n vacas=9,616); b) hatos con más de 500 vacas (n vacas=14,312).

Análisis de la información

La variable evaluada fue la tasa de gestación (GEST). El modelo general al cual se atribuyó el total de la variación fue:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + d_{(m)} + MS_i + NP_j + MS \times NP_{ij} + BST_k + MS \times BST_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)}$$

Donde:

Y_{mijkl} = es la variable de respuesta de la l -ésima observación, de la k -ésima administración de

305-d estimated milk production (PROD); gestation diagnosis result at 45 to 60 d post-service; whether or not the cow was under a BST program; and miscellaneous herd information including number of milkings per day (2X, 3X); feeding type; and cow numbers in the herd.

Estimated milk production (MP) at 305 d was categorized using five level brackets: 1) <7,000 L (n=2384); 2) 7,000-8,499 L (n=4135); 3) 8,500-9,999 L (n=7313); 4) 10,000-10,999 L (n=4646); and 5) >11,000 L (n=5372).

Regardless of the month of service, THIS was grouped up in six ranges: 1) <60 (n=1272); 2) 60-65.9 (n=2038); 3) 66-71.9 (n=5498); 4) 72-77.9 (n=5850); 5) 78-83.9 (n=7914); and 6) >84 (n=1354).

Parity was grouped in three categories: a) 1st parity cows (n=8,318); b) 2-parity cows (n=7,224); c) 3+ parity cows (n=8,384). Herd size (i.e. number of breeding cows per herd (NC) was divided as follows: a) <500 cow herds (n=9,616 cows); b) >500 cow herds (n=14,312 cows).

Information analysis

Pregnancy rate (GEST) was the variable evaluated. The general model to which total variation was attributed was:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + d_{(m)} + MS_i + NP_j + MS \times NP_{ij} + BST_k + MS \times BST_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)}$$

Where:

Y_{mijkl} = response variable of the l -th observation, the k -th BST administration, the j -th parity, and the i -th month of service; μ =general mean; B_m =effect of the year of service dairy herd; $d_{(m)}$ =restriction error, NID (0, σ^2_e); MS_i =effect of the i -th month of service (1...12); NP_j =effect of the j -th parity (1,2,3); $MS \times NP_{ij}$ =effect of the i -th month of service x j -th parity interaction; BST_k =effect of the k -th BST administration program (0,1); $MS \times BST_{ik}$ =effect of the i -th month of service x k -th BST administration program interaction; and $b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ =effect of the days-

somatotropina bovina, del j-ésimo número de parto y del i-ésimo mes de servicio; μ =es la media general; B_m =es el efecto de año de servicio hato lechero; $\delta_{(m)}$ =es el error de restricción, NID (0, σ^2_e); MS_i =es el efecto del i-ésimo mes de servicio (1...12); NP_j =es el efecto del j-ésimo número de parto (1,2,3); $MS \times NP_{ij}$ =es el efecto de la interacción de i-ésimo mes de servicio con el j-ésimo número de parto; BST_k =es el efecto del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1); $MS \times BST_{ik}$ =es el efecto de la interacción del i-ésimo mes de servicio con el k-ésimo programa de administración de BST; $b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ =es el efecto de la covariable de los días en leche al momento del servicio en su forma lineal; $E_{(mijk)l}$ =es el error NID (0, σ^2_e).

Se realizó un segundo análisis para evaluar el efecto de interacción del MS con la PL sobre la GEST, cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{lijk} = \mu + B_1 + \delta_{(l)} + MS_i + PL_j + MS \times PL_{ij} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(ij)k}$$

Donde:

Y_{lijk} =es la variable de respuesta de la k-ésima observación, del j-ésimo nivel de producción láctea y el i-ésimo mes de servicio; μ =es la media general; B_1 =es el efecto de año de servicio hato lechero; $\delta_{(l)}$ =es el error de restricción, NID(0, σ^2_e); MS_i =es el efecto de i-ésimo mes de servicio (1..12); PL_j =es el efecto del j-ésimo nivel de producción (1,2,3,4,5); $MS \times PL_{ij}$ =es el efecto de la interacción de i-ésimo mes de servicio con el j-ésimo nivel de producción; $b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ =es el efecto de la covariable de los días en leche al momento del servicio en su forma lineal; $E_{(lij)k}$ =es el error NID(0, σ^2_e).

Para evaluar la interacción del THIS con los efectos de paridad y la aplicación o no de somatotropina bovina sobre la GEST se realizó un análisis cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + d_{(m)} + THIS_i + NP_j + THIS \times NP_{ij} + BST_k + THIS \times BST_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)l}$$

Donde:

in-milk-at-time-of-service co-variable in its linear form; $E_{(mijk)l}$ = NID error (0, σ^2_e).

A second analysis was performed in order to evaluate the effect of the MS x PL interaction on GEST, whose model to which variation was attributed was:

$$Y_{lijk} = \mu + B_1 + \delta_{(l)} + MS_i + PL_j + MS \times PL_{ij} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(ij)k}$$

Where:

Y_{lijk} =response variable of the k-th observation, the j-th milk yield level, and the i-th month of service; μ =general mean; B_1 = effect of service year dairy herd; $\delta_{(l)}$ = restriction error, NID(0, σ^2_e); MS_i =effect of the i-th month of service (1..12); PL_j =effect of the j-th production level (1,2,3,4,5); $MS \times PL_{ij}$ =effect of the i-th month of service x j-th production level interaction; $b_1(\text{del}-\mu_{\text{del}})$ =effect of the days-in-milk-at-time-of-service co-variable in its linear form; $E_{(lij)k}$ =NID error (0, σ^2_e).

In order to evaluate the THIS x parity effect x BST use/no use interaction on GEST, an analysis was carried out whose model to which variation was attributed was:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + d_{(m)} + THIS_i + NP_j + THIS \times NP_{ij} + BST_k + THIS \times BST_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)l}$$

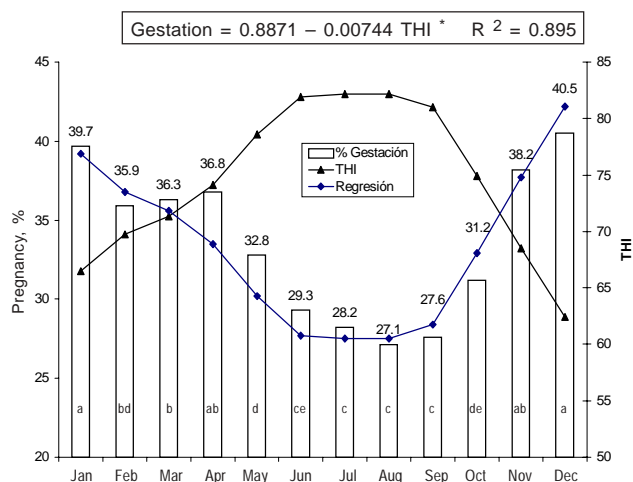
Where:

Y_{mijkl} =response variable of the l-th observation, the k-th BST administration program, the j-th parity, and the i-th THIS; μ =general mean; B_m =effect of the year of service dairy herd; $d_{(m)}$ =restriction error, NID(0, σ^2_e); $THIS_i$ =effect of the i-th THIS level (1,2,3,4,5,6); NP_j =j-th parity (1,2,3); $THIS \times NP_{ij}$ =effect of the i-th THIS level x j-th parity interaction; BST_k =effect of the k-th BST administration program (0,1); $THIS \times BST_{ik}$ =effect of the i-th THIS level x k-th BST administration program interaction; $b_1(\text{del}-\mu_{\text{del}})$ =effect of the days in milk co-variable in its linear form; $E_{(mijk)l}$ =NID error (0, σ^2_e).

Y_{mijkl} =es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina, el j-ésimo número de parto y el i-ésimo índice temperatura – humedad en el día de servicio; μ =es la media general; B_m =es el efecto de año de servicio hato lechero; $\delta_{(m)}$ =es el error de restricción, NID(0, σ^2_{ϵ}); $THIS_i$ =es el efecto del i-ésimo nivel del índice temperatura/humedad del día de servicio (1,2,3,4,5,6); NP_j =es el j-ésimo número de parto (1,2,3); $THIS \times NP_{ij}$ =es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de THIS con el j-ésimo número de parto; BST_k =es el efecto del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1); $THIS \times BST_{ik}$ =es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de THIS con el k-ésimo programa de administración de BST; $b_1(\text{del-}\mu_{\text{del}})$ =es el efecto de la covariable de días en leche en su forma lineal; $E_{(mijkl)}$ =es el error NID(0, σ^2_{ϵ}).

Figura 1. Medias mínimo cuadráticas del porcentaje de gestación y las medias mensuales del índice temperatura – humedad (THI) registradas durante el año

Figure 1. Least square means of pregnancy rate, and monthly means of the temperature:humidity index (THI) recorded throughout the year



c versus a,b,d Different superscripts among columns show a significant difference ($P<0.01$).

a,b,d Different superscripts among columns show a significant difference ($P<0.05$).

To the last model described above, both the PL effect and the PL x THIS interaction were then added, in order to evaluate such effects on GEST.

For the evaluation of 305-d estimated milk production an analysis was performed whose model to which variation was attributed was:

$$Y_{ijkl} = \mu + NP_i + BST_j + NM_k + E_{(ijk)l}$$

Where:

Y_{ijkl} =response variable of the l-th observation, the k-th number of milkings, the j-th BST administration program, and the i-th parity; μ =general mean; NP_i =effect of the i-th parity (1,2,3); BST_j =effect of the j-th BST administration program (0,1); $NORD_k$ =effect of the k-th number of milkings (2,3); $E_{(ijk)l}$ =error NID(0, σ^2_{ϵ}).

Regarding herd size (i.e. number of cows in the herd) both GEST and PROD were evaluated using a variance analysis, where the main effect was NC. A regression analysis was performed in order to determine the relationship between monthly GEST least square means, and the monthly THI average.

Non significant variation sources were removed. Data was analyzed using the least square means method by the GLM (SAS) procedure⁽¹³⁾.

RESULTS

Figure 1 shows both the least square means of pregnancy rates and the monthly THI means recorded throughout the year. This shows a negative linear ratio between the two variables, which equation had a determination coefficient (R^2) of 0.895, where GEST decreased in 0.7 % for each THI increase unit ($P<0.01$). A pronounced GEST decrease was observed starting in May. GEST levels remained low throughout October. These values were lower than those obtained in November - April ($P<0.01$).

Table 1 shows that GEST started to decrease when THIS exceeded 66. This situation worsened when THIS exceeded 72 ($P<0.01$). GEST of 2+ parity

Posteriormente, al último modelo descrito se le incluyó el efecto de PL y su interacción con THIS con el objeto de evaluar estos efectos sobre GEST.

Para evaluar la producción de leche estimada a 305 días se realizó un análisis cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + NP_i + BST_j + NORD_k + E_{(ijk)l}$$

Donde:

Y_{ijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del k-ésimo número de ordeños, el j-ésimo programa de administración de somatotropina bovina y el i-ésimo número de parto; μ = es la media general; NP_i = es el efecto del i-ésimo número de parto (1,2,3); BST_j = es el efecto del j-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1); $NORD_k$ = es el efecto del k-ésimo número de ordeños (2,3); $E_{(ijk)l}$ = es el error NID(0, σ^2_e).

Para el tamaño del hato en cuanto al número de vacas, se evaluaron la GEST y la PROD por medio de un análisis de varianza, donde el efecto principal fue el NVIE. Se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre las medias mínimo cuadráticas de la GEST mensual y el promedio mensual del índice temperatura/humedad.

Las fuentes de variación que no fueron significativas fueron removidas. Los datos se analizaron por el método de mínimos cuadrados por el procedimiento de GLM de SAS⁽¹³⁾.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran las medias mínimo cuadráticas de la tasa de gestación y las medias mensuales del índice temperatura/humedad registradas a lo largo del año. En ésta se observa una relación lineal negativa entre las dos variables, cuya ecuación tuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.895, donde la GEST disminuyó en 0.7 % por cada unidad de incremento del THI ($P < 0.01$). Una notoria reducción de la GEST se observó a partir del mes de mayo, y se mantuvieron esos niveles hasta el mes de octubre, con valores que

Cuadro 1. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio (THIS), el número de parto, la administración de somatotropina bovina y el nivel de producción de leche (PROD) sobre tasa de gestación en vacas Holstein

Table 1. Effect of the day-of-service temperature – humidity index (THIS), parity, BST administration and milk production level (PROD) on the pregnancy rates of Holstein cows

	n	Gestation (%)
THIS		
<60	1272	40.8 ± 0.013 a
60 - 65.9	2038	40.1 ± 0.011 ab
66 - 71.9	5498	37.8 ± 0.006 b
72 - 77.9	5850	35.0 ± 0.006 c
78 - 83.9	7914	28.4 ± 0.005 d
>84	1354	27.1 ± 0.013 d
Parity		
1	8318	37.1 ± 0.007 a
2	7224	34.0 ± 0.007 c
3+	8384	33.4 ± 0.007 c
Bovine somatotropin		
NO	15348	34.6 ± 0.006 a
YES	8578	35.1 ± 0.007 a
PROD (L)		
<7,000	2492	34.1 ± 0.010 ac
7,000 - 8,499	4135	36.8 ± 0.007 b
8,500 - 9,999	7313	34.5 ± 0.005 ac
10,000 - 10,999	4646	32.9 ± 0.007 c
>11,000	5372	29.9 ± 0.006 d

ab Different superscripts per column within each main effect are different ($P < 0.05$).

acd Different superscripts per column within each main effect are different ($P < 0.01$).

b versus c,d Different superscripts per column within each main effect are different ($P < 0.01$).

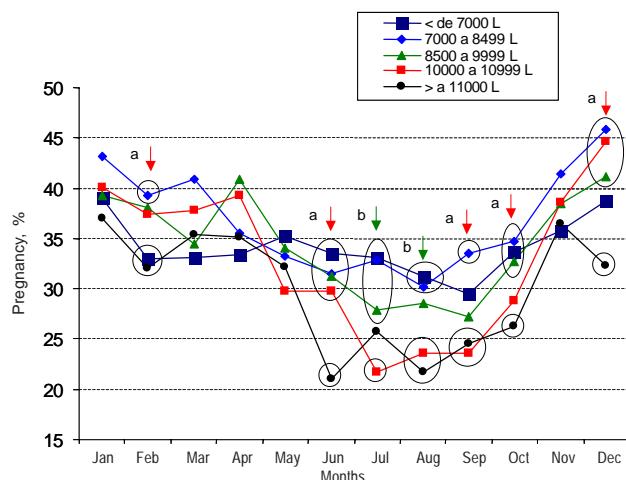
cows was lower than that of primiparous cows ($P < 0.01$). Cows with PROD > 11,000 L had a lower GEST ($P < 0.01$). Cows with 8,500-11,000 L PROD, and those with a < 7,000 L PROD had intermediate GEST values. GEST in these cows was lower than that of cows with 7,000-8,499 L PROD ($P < 0.01$). Cows with 2+ parities had a lower GEST at all THIS ranges exceeding

fueron inferiores a los de noviembre a abril ($P < 0.01$).

En el Cuadro 1 se observa que la reducción de la GEST de las vacas inicia cuando el THIS fue mayor a 66, agudizándose cuando el THIS fue superior a 72 ($P < 0.01$). La GEST de las vacas con dos o más partos fue menor que en las vacas primíparas ($P < 0.01$). Las vacas con PROD superior a 11,000 L tuvieron una menor GEST ($P < 0.01$). Las vacas con una PROD entre 8,500 y 11,000 L, y menores de 7,000 L mostraron una GEST intermedia y menor a la observada en las vacas con una PROD entre 7,000 y 8,499 L ($P < 0.01$). Las vacas con dos o más partos tuvieron una menor GEST en todos los rangos de los THIS superiores a 72, que lo observado en las vacas primíparas ($P < 0.01$) (Cuadro 2).

Figura 2. Porcentaje de gestación por efecto del nivel de producción láctea en vacas Holstein durante el año en sistemas intensivos de producción en el altiplano del centro - norte de México

Figure 2. Percent gestation as an effect of milk yield in Holstein cows throughout the year under intensive production systems in Mexico's central-northern highlands



a ↓ Significant difference exists among circled data within a month ($P < 0.01$).

b ↓ Significant difference exists among circled data within a month ($P < 0.05$).

72, as compared with primiparous cows ($P < 0.01$) (Table 2).

GEST of cows with different PROD levels is shown in detail in Figure 2. Starting in June, GEST of cows with PROD > 11,000 L was mostly affected ($P < 0.01$). From July to October, cows with PROD > 10,000 L showed a lower GEST than those with lower PROD levels ($P < 0.01$). In December, GEST of cows with PROD > 11,000 L was lower than that of cows with PROD < 10,000 L ($P < 0.05$), with the exception of those producing < 7,000 L. In February, groups with PROD < 7,000 L and

Cuadro 2. Efecto de la interacción del índice de temperatura - humedad en el día del servicio (THIS) con la paridad de la vaca (NP) sobre la tasa de gestación de vacas Holstein en sistemas intensivos de producción

Table 2. Effect of the day-of-service temperature - humidity index (THIS) and cow parity (NP) on pregnancy rates of Holstein cows under intensive production systems

THIS	n	NP	Gestation (%)
<60	434	1	42.3 ± 0.02 ^a
<60	404	2	42.6 ± 0.02 ^a
<60	434	3+	37.5 ± 0.02 ^a
60 - 65.9	654	1	40.6 ± 0.01 ^a
60 - 65.9	602	2	39.7 ± 0.01 ^a
60 - 65.9	782	3+	39.9 ± 0.01 ^a
66 - 71.9	1892	1	38.1 ± 0.01 ^a
66 - 71.9	1537	2	38.6 ± 0.01 ^a
66 - 71.9	2069	3+	36.7 ± 0.01 ^a
72 - 77.9	2043	1	37.6 ± 0.01 ^a
72 - 77.9	1757	2	33.4 ± 0.01 ^b
72 - 77.9	2050	3+	34.1 ± 0.01 ^b
78 - 83.9	2815	1	32.1 ± 0.01 ^a
78 - 83.9	2462	2	25.4 ± 0.01 ^b
78 - 83.9	2637	3+	27.7 ± 0.01 ^b
>84	480	1	31.9 ± 0.02 ^a
>84	462	2	24.6 ± 0.02 ^b
>84	412	3+	24.8 ± 0.02 ^b

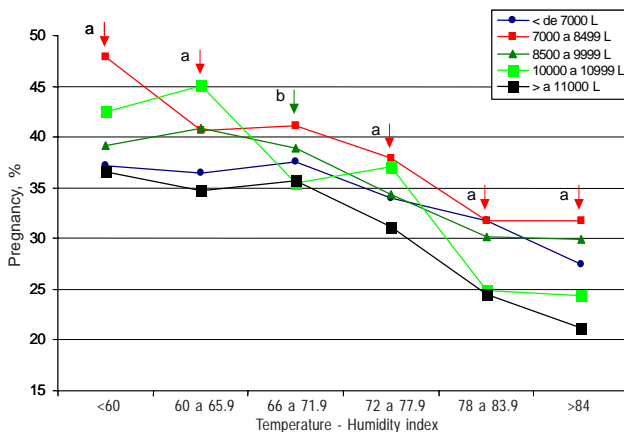
^{ab} Different superscripts within each THIS range show a difference ($P < 0.01$).

La GEST observada en las vacas con diferentes niveles de PROD se detalla en la Figura 2. A partir del mes de junio, la GEST en las vacas con PROD mayor a 11,000 L fue la más afectada ($P < 0.01$). En los meses de julio a octubre las vacas con PROD superior a 10,000 L mantuvieron una GEST por debajo de lo observado en las de menor PROD ($P < 0.01$). En el mes de diciembre, la GEST en las vacas con PROD mayor a 11,000 L fue menor, que lo observado en las vacas con PROD menor a 10,000 L ($P < 0.05$), excepto con las que produjeron menos de 7,000 L. En el mes de febrero, la menor GEST ocurrió en grupos con PROD menor de 7,000 L y mayor a 11,000 L ($P < 0.01$).

En la Figura 3 se observa que las vacas con mayor PROD tuvieron menor GEST en todos los rangos de THIS evaluados ($P < 0.01$); en este grupo de vacas se mostró una menor GEST a THIS superiores

Figura 3. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio sobre la tasa de gestación de vacas Holstein con diferente nivel de producción

Figure 3. Effect of the day-of-service temperature:humidity index (THIS) on pregnancy rates of Holstein cows with varying production levels



a ↓ Significant difference exists among circled data within the same Temperature-Humidity Index range ($P < 0.01$).

b ↓ Significant difference exists among circled data within the same Temperature-Humidity Index range ($P < 0.05$).

those with PROD $> 11,000$ L showed the lowest GEST ($P < 0.01$).

Figure 3 shows that cows with higher PROD levels had lower GEST values at all THIS ranges evaluated ($P < 0.01$). This group of cows showed the lowest GEST at THIS > 66 , as compared to cows with 7,000-8,500 L PROD ($P < 0.01$). Likewise, decreased GEST in cows with higher PROD levels worsened at THIS > 72 ($P < 0.01$). Cows with 7,000-10,000 L PROD showed decreased GEST levels at THIS between 72 and 84 ($P < 0.01$). Cows with PROD $< 7,000$ L showed no THIS-associated differences when THIS was lower than 84 ($P > 0.05$). Generally, this group showed low GEST values.

The effects of BST, number of milkings, herd size, THIS x BST interaction, and THIS x number of milkings interaction on GEST were not significant ($P > 0.05$).

Cuadro 3. Medias mínimo cuadráticas de la producción de leche por efecto del número de partos, la administración de somatotropina bovina, número de ordeños y el tamaño de hato lechero, en vacas Holstein

Table 3. Milk yield least square means as an effect of parity, BST administration, number of milkings, and dairy herd size in Holstein cows

	n	Mean ± SE
Parity		
1	8281	8,622.2 ± 20.7 a
2	7209	9,841.1 ± 22.4 b
3+	8337	9,971.5 ± 20.6 c
Bovine somatotropin		
NO	15300	9,264.6 ± 15.7 a
YES	8527	9,692.0 ± 20.0 b
Number of milkings		
Two milkings	8648	9,018.8 ± 20.1 a
Three milkings	15179	9,937.8 ± 15.4 b
Number of cows per herd		
<500 cows	9540	9,176.1 ± 19.9 a
>500 cows	14312	9,761.2 ± 16.3 b

abc Different superscripts per column within each main effect show a difference ($P < 0.01$).

SE= standard error.

a 66, que lo observado en las de PROD entre 7,000 y 8,500 L ($P < 0.01$). Así mismo, la reducción de la GEST en vacas con mayor PROD se acentuó a THIS mayor a 72 ($P < 0.01$). Las vacas con PROD de 7,000 a 10,000 L mostraron una reducción de la GEST a THIS entre 72 y 84 ($P < 0.01$). En las vacas con PROD menor de 7,000 L no hubo diferencias debidas a THIS con valores inferiores a 84 ($P > 0.05$), este grupo mostró en general baja GEST.

Los efectos de BST, del número de ordeños, del tamaño del hato, y las interacciones de THIS con BST y THIS con el número de ordeños no fueron significativos sobre GEST ($P > 0.05$).

En el Cuadro 3 se presentan los efectos del número de partos, de BST, del número de ordeños y del tamaño del hato sobre la PROD. Las vacas múltiparas mostraron mayor PROD que la observada en las vacas primíparas ($P < 0.01$). Las vacas tratadas con BST, las de tres ordeños y aquéllas en hatos con más de 500 vientres tuvieron una mayor PROD ($P < 0.01$).

DISCUSIÓN

Los sistemas intensivos en el norte de México se caracterizan por tener una dinámica constante en el incremento de la producción de leche por vaca vientre. En estas regiones se tiene un índice de temperatura/humedad elevada en los meses calurosos, con fluctuación promedio mensual de alrededor de 20 puntos a lo largo del año. La reducción de las tasas de gestación en los meses cálidos ha sido informada en otros estudios en vacas de sistemas intensivos de producción de leche en México^(1,2); sin embargo, estos estudios fueron realizados en un solo hato⁽¹⁾, o representan medias generales de la fertilidad registrada en una región⁽²⁾, sin un análisis que hubiese ajustado los datos de fertilidad a otras variables importantes.

La reducción de 0.7 % de la GEST por unidad de incremento del THI promedio del mes muestra la misma tendencia informada en otro estudio⁽⁵⁾, donde se observó una reducción de 0.5 % de la tasa de no retorno al estro (TNRE) a 45 días por unidad

Table 3 shows the effects of parity, BST, number of milkings, and herd size on PROD. Multiparous cows had higher PROD values than primiparous cows ($P < 0.01$). BST-treated cows, 3X cows, and those in herds with >500 breeding cows had higher PROD levels ($P < 0.01$).

DISCUSSION

Intensive dairy systems in Northern Mexico are characterized by a constant, dynamic milk yield increase per cow. In these regions, high THIs exist during the hot season, with average monthly fluctuations of approximately 20 points throughout the year. Decreased pregnancy rates during the hot season have been reported in other studies with dairy cows under intensive production systems in Mexico^(1,2). Nevertheless, these studies used only one herd⁽¹⁾, or show general fertility means recorded in a region⁽²⁾. Such reports include no analysis adjusting fertility data with regard to other important variables.

The 0.7 % GEST reduction per monthly average THI increase unit, shows the same trend reported elsewhere⁽⁵⁾, where a 0.5 % decrease in RNRE at 45 d per day-of-service THI increase unit of each cow was observed. Nevertheless, RNRE is a less precise fertility indicator than the GEST used in this study. Available information shows a critical effect of day-of-service heat stress on fertilization, and early⁽¹⁴⁾ and late⁽³⁾ embryo survival rate, as well as on RNRE⁽⁵⁾.

Regardless of the month of service, the effect of THIS on GEST reached critical levels when THIS exceeded 66, and it was even worse at THIS > 72. Therefore, reproduction did not seem to be affected at THIS levels ≤ 66 . This result is similar to that obtained by others⁽⁵⁾, where lactating cows showed a decreased RNRE at 45 d under THIS ≥ 68 , and the magnitude of this decrease was 15 % approximately. This negative impact was even worse in cows with higher milk yield levels.

The fact that cows with PROD > 11,000 L always had lower GEST at all THIS ranges analyzed, together with the fact that decreased GEST in these

de incremento de THI del día del servicio de cada vaca. Sin embargo, la TNRE es menos precisa como estimador de la fertilidad, que la tasa de GEST del presente estudio. La información disponible demuestra un efecto crítico del estrés calórico en el día del servicio sobre la fertilización y la sobrevivencia embrionaria temprana⁽¹⁴⁾ y tardía⁽³⁾ y sobre la tasa de no retorno al estro⁽⁵⁾.

Independientemente del mes de servicio, la GEST de las vacas por efecto del THIS se tornó crítico cuando éste fue superior a 66 y se agudizó a THIS mayores a 72, por lo que aparentemente la reproducción no se vio afectada a niveles de THIS iguales o menores a 66. Este resultado es similar a lo encontrado en otro estudio⁽⁵⁾, donde se observó en vacas lactantes un decremento de la TNRE a 45 días a partir de THIS de 68, y que la magnitud de este decremento fue del 15 % aproximadamente, con un impacto negativo mayor en la vacas con más producción láctea.

El hecho de que las vacas con PROD superior de 11,000 L siempre tuvieron menor GEST en todos los rangos de THIS estudiados y que la reducción de la GEST en éstas se agudizó en THIS superiores a 78, con respecto a lo observado en vacas con un menor nivel PROD, indica que la menor GEST a THIS inferiores a 72 es debido al estrés fisiológico de producción, en tanto que a THIS mayores el efecto del estrés calórico se agrega al de producción.

Algunos estudios, han estimado en el transcurso de los últimos 25 años una reducción anual entre 0.5 y 1 % de la fertilidad al primer servicio, donde el factor que ha contribuido a la declinación de la fertilidad ha sido el incremento de la producción láctea^(8,9,10,11), que además se ha asociado con el retraso en el re-inicio de la actividad ovárica posparto^(3,11,15) y una tendencia a tener un primer servicio retrasado⁽¹⁶⁾. En el presente estudio, la depresión de la GEST fue considerablemente mayor en las vacas con más PROD (43.2 al 50 %), que en vacas con una PROD menor a 10,000 L (25 a 36.3 %), y presenta las mismas tendencias observada en otro estudio⁽¹²⁾, donde se determinó una depresión de alrededor del 90 % de la TNRE a 90 días en

cows worsened at THIS >78 as compared to cows with lower PROD levels, means that lower GESTs at THIS <72 are due to the physiologic stress of production, while at higher THIS levels the effect of heat stress adds up to that of production.

In the last 25 years, several studies have estimated a yearly decrease in first service fertility of 0.5 to 1 %, and the factor contributing to decreased fertility has been increased milk yield^(8,9,10,11). Higher milk production levels have also been associated with delayed re-initiation in the ovarian activity *postpartum*^(3,11,15), together with a trend to delay first service⁽¹⁶⁾. In our study, GEST was further depressed in cows with higher PROD levels (43.2 to 50 %), as compared to cows with PROD levels <10,000 L (25 to 36.3 %). GEST shows the same trend observed by other authors⁽¹²⁾ where a decrease of 90 % RNRE was determined at 90 d in high production cows during the hot season of the year.

The slow recovery of GEST levels in cows with higher PROD levels can be associated with a carry-over effect of summer heat stress on the development and quality of both the follicle and the oocyte, as well as on the luteal function. All of these factors play important roles on fertility and early embryo development. In lactating⁽¹⁷⁾ and non lactating⁽¹⁸⁾ Holstein cows exposed to summer heat stress⁽¹⁷⁾ or only during one follicular cycle⁽¹⁸⁾, increased rates of unhealthy follicles⁽¹⁸⁾, and decreased embryo development^(17,19) have been observed. It has also been shown that repeated treatments with gonadotropin-releasing factor and the frequent aspiration of follicles >5 mm⁽¹⁸⁾ or between 3 and 7 mm⁽¹⁷⁾ during several estrus cycles, nullified the detrimental effect attributed to heat stress during earlier months on follicular development. Such treatments also allowed for the recruitment of better quality follicles, resulting in improved embryo development as compared to that observed in non treated cows.

The mechanism by which heat stress affects fertility has not been precisely described, but a damage on cellular communication between *granulosa* cells, those in the *cumulus ovigerus* and the oocyte^(19,20), decreased oocyte competence^(19,21), altered

las vacas con mayor producción en los meses calurosos del año.

La lenta recuperación de los niveles de GEST de las vacas con mayor PROD, puede estar relacionada con un efecto acarreado del estrés calórico del verano sobre el desarrollo y la calidad folicular y del ovocito, y de la función lútea, que juegan un papel importante en la fertilidad y el desarrollo embrionario temprano. Se ha observado en vacas Holstein lactantes⁽¹⁷⁾ y no lactantes⁽¹⁸⁾ expuestas a estrés calórico durante el verano⁽¹⁷⁾ o en un ciclo folicular⁽¹⁸⁾, un incremento de folículos no saludables⁽¹⁸⁾, y una reducción en el desarrollo embrionario^(17,19); y se ha demostrado que tratamientos repetidos con factor liberador de las gonadotropinas y la aspiración frecuente de los folículos mayores de 5 mm⁽¹⁸⁾ y entre 3 y 7 mm⁽¹⁷⁾ durante varios ciclos estrales, disipó el efecto detrimental atribuido al estrés calórico de los meses previos sobre el desarrollo folicular y permitió el reclutamiento de folículos de mejor calidad, que se reflejó en un mayor desarrollo embrionario, en comparación con lo observado en el grupo de vacas no tratadas.

No se ha descrito un mecanismo preciso por el cual el estrés calórico afecta la fertilidad, pero se sugiere que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulo y del ovocito^(19,20), se afecte la competencia del ovocito^(19,21), se altera el contenido proteico del fluido folicular⁽²²⁾, la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna y se modifica la esteroidogénesis^(20,23,24).

Los valores de la GEST de las vacas con PROD menores a 7,000 L, pueden indicar que en este grupo posiblemente se encontraban animales con algunos problemas metabólicos o infecciosos, que limitaron su producción y reproducción, como lo han descrito otros estudios^(25,26). En contraste, en las vacas con una producción intermedia (entre 7,000 y 10,000 L), aún cuando se observó una reducción de la GEST en condiciones de estrés calórico, la depresión de ésta fue menor, lo que puede indicar que en este rango de producción, los animales mantuvieron mejor estado de salud y

follicular fluid protein content⁽²²⁾, decreased cell livability in both the *granulosa* and the *theca interna*, and altered steroidogenesis^(20,23,24) have been suggested.

GEST values in cows with PROD <7,000 L can mean that this group probably included animals with some metabolic/infectious problems limiting their production/reproduction abilities, as described elsewhere^(25,26). In contrast, cows with intermediate production levels (7,000-10,000 L), even when decreased GEST in the face of heat stress was observed, reduction was only minor. This could mean that within this production range, animals maintained improved health status, and they were less susceptible to high THIs.

Cows receiving BST had no positive effect on GEST, as reported in other studies with cows at first service^(27,28), or with return-to-estrus cows^(27,28). In super-ovulated cows, the use of BST has improved both survivability of recovered embryos and pregnancy rates among recipient cows^(29,30,31). Contrary to our study, those authors applied BST either on the day of service, during the super-ovulation process, or at embryo transfer, while the routine use of BST to improve production does not consider reproduction-associated events.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It is expected that heat stress will remain an unresolved problem, and that it will create more and more concerns in the future. Nevertheless, the use of technologies such as BST and 3X milking, does not add any negative effects whatsoever in the face of heat stress. The fact that high production cows have delayed fertility recovery supposes that this can be due to a carry-over effect on the quality of follicles that started to develop during heat stress conditions. It is interesting to evaluate the effect of inducing –from the early fall– the accelerated follicular turnover with treatments such as those used to synchronize estrus and ovulation. One other option to increase gestation during the hot season is the use of embryo transfer at 6-7 d of age. Additionally, under the conditions prevailing in the area of our research, the inclusion of cooling

fueron menos susceptibles a los altos índices de temperatura/humedad.

Las vacas que recibieron BST no mostraron un efecto positivo sobre GEST, como ha sido informado en otros estudios con vacas de primer servicio^(27,28), y con vacas repetidoras^(27,28). En vacas superovuladas, el uso de BST ha mejorado la sobrevivencia de los embriones recuperados y la tasa de preñez de vacas receptoras^(29,30,31). A diferencia del presente estudio, esos autores aplicaron la BST en el día del servicio o en el proceso de superovulación o de la transferencia de los embriones, en tanto que el uso rutinario para mejorar la producción no considera eventos asociados con la reproducción.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Es de esperarse que el estrés calórico siga siendo un problema no resuelto y que tendrá cada vez mayor vigencia; sin embargo, el uso de tecnologías como la aplicación de BST y el ordeño tres veces al día, no agregaron efecto alguno sobre la fertilidad en condiciones de estrés calórico. El hecho de que en los animales de mayor producción se retrasa la recuperación de la fertilidad, se presume que esto puede deberse a un efecto acarreado en la calidad de los folículos que iniciaron su desarrollo en condiciones de estrés, y resulta interesante evaluar el efecto de inducir, desde inicios del otoño, el recambio folicular acelerado con tratamientos como los empleados para sincronizar el estro y la ovulación. Otra opción para incrementar la gestación en la época calurosa es optar por la transferencia de embriones de 6 a 7 días de edad. Adicionalmente, en las condiciones del área de estudio, la inclusión de sistemas de enfriamiento para mantener a las vacas alrededor del día del servicio y los subsecuentes es una práctica que amerita ser analizada.

AGRADECIMIENTOS

El estudio forma parte de un proyecto financiado por CONACyT Nacional (31459-B). Los autores agradecen la colaboración del grupo de productores

systems for cows around the day of service and afterwards, is a practice that should also be investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is a part of a project financed by Mexico's National Science and Technology Council (CONACyT Nacional [31459-B]). The authors express their gratitude to collaborating dairy producers, and to ALPURA's Technical Department (Cd. Delicias, Chihuahua), who were always willing to cooperate with this study.

End of english version

de leche y al departamento técnico de ALPURA, de Cd. Delicias, Chihuahua, quienes siempre estuvieron dispuestos para colaborar en el estudio.

LITERATURA CITADA

1. Avendaño RL, Molina RL, Correa CA. Factores ambientales que influyen sobre la eficiencia reproductiva en un hato Holstein de Baja California [resumen]. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1990:447.
2. Fernández DLJ. Evaluación de parámetros reproductivos en hatos de la comarca lagunera. Unión Ganadera 1997:12-14.
3. Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Rozell TG, Smith JF, Stevenson JS. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. J Dairy Sci 2001;(84):799-806.
4. Ingraham RH, Stanley RW, Wagner WC. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. J Dairy Sci 1975;59(12):2086-2090.
5. Ravagnolo O, Misztal I. Effect of heat stress on nonreturn rate in Holsteins: fixed-model analyses. J Dairy Sci 2002;(85):3101-3106.
6. Rivera RM, Hansen PJ. Development of culture bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. J Reprod Fert 2001;(121):107-115.
7. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. J Dairy Sci 1993;(76):2899.
8. Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. J Reprod Fert 1999;54(Suppl):411-424.

9. Roche JF, Mackey FD, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000;60(61):703-712.
10. Royal M, Mann GE, Flint AP. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Veter J* 2000;(160):53-60.
11. Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Williams JA, Lamming GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci* 2000;(70):487-501.
12. Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999;(82):2611-2616.
13. SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). Cary NC, USA: SAS Inst Inc 1988.
14. Putney DJ, Mullins S, Thatcher WW, Drost M, Gross TS. Embryonic development in superovulate dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci* 1989;(19):37.
15. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000;(53):841-857.
16. Faust MA, Mc Daniel BT, Robinson OW, Britt JH. Environmental and yield effects on reproduction in primiparous Holstein. *J Dairy Sci* 1998;(71):3092-3099.
17. Roth Z, Arav A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 2001;122(5):737-744.
18. Guzeloglu A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ, Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim Reprod Sci* 2001;(66):15-34.
19. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2002;(85):390-396.
20. Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001;(121):745-751.
21. Sartori S, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85(11):2803-2812.
22. Ambrose JD, Guseloglu A, Thatcher MJ, Kassa T, Díaz T, Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to heat-stress. *J Reprod Fert* 1999;(54):503-504.
23. Wolfenson D, Luft O, Berman A, Meidan R. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin f2 alpha production in bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci* 1993(32):27-40.
24. Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci* 1997;(47):9-19.
25. Scott HL, Meint J de Vries, Ynte HS. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999;(82):2589-2604.
26. Grohn YT, Rajaal-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000;(60-61):605-614.
27. Morales-Rouda JS, Zarco L, Hernández-Ceron J, Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 2001;(55):1831-1841.
28. Mendoza MG. Efecto de una dosis de 500 mg de somatotropina bovina recombinante (rbST) en la fertilidad de vacas Holstein al primer servicio y repetidoras [tesis maestría]. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México; 2000.
29. Moreira F, Risco CA, Pires MF, Ambrose JD, Drost M, Thatcher, WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000;(83):1237-1247.
30. Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2001;(55):535.
31. Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*; 2002;57(4):1371-1387.