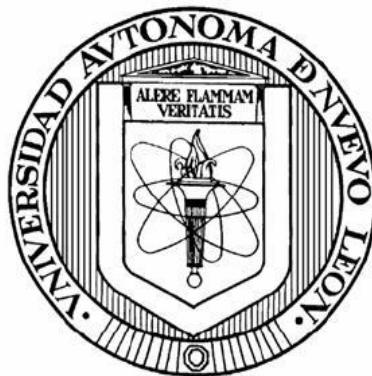


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**USO DE DOS FUENTES DE ESTRÓGENOS: BENZOATO DE ESTRADIOL VS
CIPIONATO DE ESTRADIOL PARA SINCRONIZAR EL ESTRO Y LA OVULACIÓN
EN VACAS HOLSTEIN-FRIESIAN**

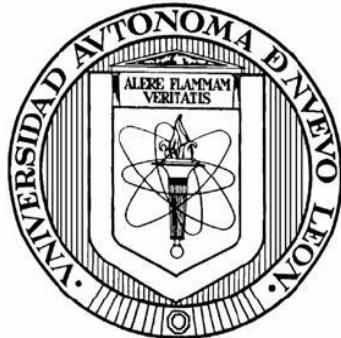
POR

**ANA LILIAN IÑIGUEZ
MONTEJANO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

OCTUBRE, 2019

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



USO DE DOS FUENTES DE ESTRÓGENOS: BENZOATO DE ESTRADIOL VS
CIPIONATO DE ESTRADIOL PARA SINCRONIZAR EL ESTRO Y LA
OVULACIÓN EN VACAS HOLSTEIN-FRIESIAN

Aprobación de tesis por el comité particular de

Ana Lilian Iñiguez Montejano

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

Vocal

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



USO DE DOS FUENTES DE ESTRÓGENOS: BENZOATO DE ESTRADIOL VS
CIPIONATO DE ESTRADIOL PARA SINCRONIZAR EL ESTRO Y LA
OVULACIÓN EN VACAS HOLSTEIN-FRIESIAN

Aprobación de tesis por el comité particular de
Ana Lilian Iñiguez Montejano

Dirección de Tesis

Dr. Fernando Sánchez Dávila
Director

Dr. Hugo Bernal Barragán
Co-Director

Dr. J. Rubén Cervantes Vega
Co-Director

Dra. Estela Garza Brenner
Co-Director

Dr. Rogelio Alejandro Ledezma Torres
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León que me brindó la oportunidad a través del programa de Posgrado Conjunto en Ciencia Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Agronomía para realizar mis estudios de maestría y de las cuales siempre recibí un gran apoyo.

A mi director de tesis el Dr. Fernando Sánchez por su dirección, sus valiosas asesorías y la oportunidad de desarrollar este proyecto.

Al Dr. Hugo Bernal por sus observaciones objetivas, apoyo en el trabajo de laboratorio y análisis de datos.

Al Dr. Rogelio Ledezma por su paciencia, gestión de apoyos y comentarios.

Al Dr. Rubén Cervantes y la Dra. Estela Garza Brenner por su tiempo dedicado en las revisiones de mis avances y mi tesis.

A la Unidad Académica Marín de la FA-UANL por la prestación de instalaciones y animales aportados, al equipo de apoyo de los técnicos encargados de área, en especial a la Ing. Reyna Lucia por su ayuda y facilitarme información de la base de datos, a los practicantes y al Ing. Cristian Reyna por su apoyo durante los muestreos para la realización de este estudio.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Nutrición Animal de la FA-UANL por su guía, apoyo y enseñanzas para llevar a cabo el trabajo del laboratorio.

Y finalmente al CONACYT y PAICYT (UANL) por el apoyo económico a lo largo de este trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres por siempre estar conmigo, Carlomagno Iñiguez Luna (†) el mejor ejemplo de esfuerzo, dedicación y constancia, por enseñarme a no rendirme, sin ti todo esto no hubiera sido posible.

Sra. Araceli Montejano Sandoval por su apoyo y amor incondicional, y a mi hermana Carla Araceli Iñiguez Montejano por siempre escucharme y por sus palabras de aliento

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos específicos.....	2
1.2 Hipótesis.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Importancia del ganado lechero en México	3
2.2 Aplicación Biotecnologías reproductivas.....	4
2.3 Ciclo estral de la vaca	5
2.3.1 Fase Folicular	5
2.3.2 Fase Lútea.....	6
2.4 Sincronización de estros.....	7
2.4.1 Protocolos.....	8
2.5 Uso de estradiol.....	9
2.6 Factores que influyen en la fertilidad	10
2.6.1 Condición Corporal y producción láctea	11
2.6.2 Edad de la vaca/ número de partos	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Ubicación del experimento	13
3.2. Tamaño de muestra y selección de animales	13
3.2.1 Estado reproductivo y sanitario.....	13
3.2.2 Condición corporal.....	14
3.2.3 Manejo general.....	14
3.3. Protocolo de sincronización.....	14
3.4. Muestreo y análisis de sangre	16
3.5. Análisis hormonales	17
3.6. Detección de celo	17
3.7. Medición de diámetros foliculares	18

3.8. Diagnóstico de preñez.....	19
3.9. Análisis Estadístico.....	19
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES.....	25
7. LITERATURA CITADA	26
8. ANEXOS	35
8.1 Datos generales.....	35

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Signos de celo y su puntuación.	18
2. Porcentaje de vacas por tratamiento que presentaron estro una vez retirado el dispositivo.	20
3. Porcentaje gestación de vacas por tratamiento	20
4. Promedios de número y diámetro de folículos por tratamiento.	21
5. Promedios de número y diámetro de cuerpos lúteos por tratamiento.	21

INDICE DE FIGURAS

	Figura	Página
1.	Puntuación de Protocolos aplicados en los 3 grupos (P4, progesterona; BE, benzoato de estradiol; Cipionato de estradiol; eCG, gonadotropina coriónica equina; IATF, inseminación artificial a tiempo fijo)	15
2.	Esquematización de toma de muestras.	17
3.	Concentraciones de estradiol de acuerdo a la fuente de estrógenos aplicados en vacas Holstein.	22

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
CC	Condición corporal
CE	Cipionato de estradiol
CIDR	Controlled Internal Drug Release
CL	Cuerpo lúteo
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FSH	Follicle stimulating hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
H	Hora (s)
IA	Inseminación Artificial
IATF	Inseminación Artificial a Tiempo Fijo
IM	Intramuscular
L	Litros
LH	Luteinizing hormone
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
ml	Mililitro
mm	Milímetros
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetro
P4	Progesterona
pg	Picogramo
PGF_{2a}	Prostaglandina
SPSS	Statistical Package for the Social Science
UI	Unidades internacionales

RESUMEN

El presente trabajo tuvo el objetivo de medir la concentración sérica de estrógenos en vacas Holstein tratadas con dos fuentes de estrógenos: Cipionato de estradiol (CE) y Benzoato de estradiol (BE), evaluando también la relación que estas fuentes de estrógenos exógenos tienen con la eficiencia reproductiva. Se utilizaron 21 vacas de la raza Holstein-Friesian asignadas a 3 tratamientos ($n=7$) (tratamiento 1 Grupo BE, tratamiento 2 Grupo CE y tratamiento 3, Grupo control). En el día 1: se colocó el dispositivo intravaginal bovino (CIDR), y se realizó la aplicación de la primera dosis de 2 mg de Benzoato de Estradiol vía IM; el día 8 se retiró el dispositivo intravaginal, en el tratamiento 2 Grupo CE se aplicó 1 mg vía IM de Cipionato, y el en tratamiento 3 Grupo control una aplicación 1 ml vía IM de solución salina, seguido de la aplicación a todos los tratamiento de una dosis de prostaglandina y 300 UI de eCG, ambas vía IM. En el día 9, al tratamiento 1 (Grupo BE) se aplicó 1 mg Benzoato de estradiol vía IM. El día 10 se realizó la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) a todos los tratamientos.

Se evaluó el efecto de los tratamientos (BE, CE y Control) sobre los porcentajes de estro, la tasa de gestación a la IATF y la presencia de estructuras ováricas, con una prueba de ji cuadrada. Se fijó un nivel de confianza del 95% ($P=0.05$). No se encontró disparidad entre los tratamiento de BE y CE, en cada uno de los análisis estadísticos ($P=0.05$) para cada una de las variables estudiadas. El tratamiento de BE presentó estructuras lúteas de mayor tamaño en comparación con el grupo Control y el de CE. En conclusión, a pesar de las diferencias farmacológicas entre ambos ésteres de estradiol, estos tuvieron el mismo efecto sobre la presencia de estructuras ováricas, presentación de signos asociados a estro y tasa de gestación.

Palabras Clave: Protocolo, progesterona, onda folicular.

ABSTRACT

The objective of this study was to measure the serum estrogen concentration in Holstein cows treated with two estrogen sources, estradiol cypionate (EC) and estradiol benzoate (BE), also evaluating the relationship that these sources of exogenous estrogens have with reproductive efficiency. Twenty one Holstein-Friesian cows divided into 3 treatments were used (n=7) (treatment 1 Group BE, treatment 2 Group CE and treatment 3 Control group). In each of them, on day 1 the bovine intravaginal device (CIDR) was placed, and the application of the first dose of 2 mg of estradiol benzoate was carried out via IM. On day 8 the intravaginal device was withdrawn, in the treatment 2 (Group CE) 1 mg cypionate was applied via IM; in treatment 3 Control group 1 ml via IM of saline was applied, followed by the application to all the treatment of a prostaglandin dosis, and 300 IU of eCG, both via IM. On day 9 to treatment1 Group BE 1 mg estradiol benzoate was applied via I.M. On day 10, artificial insemination was performed at fixed time (IATF) on all treatments.

The effect of the treatments (BE, CE and Control) on the percentages of presentation of estrus, the gestation rate to the IATF and the presence of ovarian structures, with a Chi-square test was evaluated. A 95% confidence level was established ($P=0.05$). No differences were found between the treatments BE and CE ($P=0.05$). Treatment BE had larger luteal structures in comparison with the Control group and the CE group. In conclusion, despite their pharmacological differences, both esters of estradiol had the same effect on the presence of ovarian structures, presentation of signs associated with estrus and gestation rate.

Keywords: Protocol, progesterone, follicular wave.

1. INTRODUCCIÓN

Del consumo mundial de lácteos, el 85% corresponde a leche de vaca y el resto a otras especies (búfala 11%, cabra 2% y otras 2%) (Secretaría de Economía, 2012). La eficiencia reproductiva es una gran prioridad en todos los sistemas, sin embargo, se considera mayor en los sistemas de partos estacionales, donde la oportunidad de que una vaca presente un parto y quede gestante es un tiempo limitado para asegurar un becerro por vaca por año (Dillon et al., 2006).

Actualmente es posible sincronizar eficientemente el crecimiento folicular ovárico e inducir la ovulación de una folículo dominante en un momento conocido, permitiendo la inseminación de hembras bovinas en un día y hora predeterminado, sin necesidad de detectar celo (Baruselli et al., 2004).

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) puede ser empleada (Bó et al., 2003). Muchos protocolos están basados en sincronizar la aparición de la onda de crecimiento folicular por administración simultánea de progesterona y estradiol (Bó et al., 2002; Carvalho et al., 2008). Al final de un protocolo, es necesario reducir las concentraciones de progesterona en circulación con el retiro del dispositivo de progesterona (fuente exógena), por ello se administra prostaglandina para promover la regresión del CL (fuente endógena), para que pueda ocurrir la ovulación.

Por último, es necesario promover el crecimiento final del folículo e inducir una ovulación sincronizada, que permite la inseminación en un determinado momento (Bó et al., 2003). Se sabe que los ésteres de estradiol son capaces de inducir la ovulación en vacas, sin embargo, su farmacocinética difiere. En algunos estudios, el Benzoato de estradiol (BE) presenta una vida media más corta e induce un pico de LH anterior en comparación con el Cipionato de estradiol (CE) (Colazo et al., 2003; Martínez et al., 2007).

Se han realizado varios estudios evaluando los diferentes efectos entre CE y BE. Sales (2012), no encontró diferencia ($P<0.05$) entre los tratamientos con BE y CE en las respuestas foliculares en vacas Nelore y concluyó que a pesar de las diferencias farmacológicas, ambos ésteres de estradiol al administrarse son eficaces para inducir un

aumento de LH que da lugar a ovulaciones sincronizadas. Uslenghi (2010) comparó 2 dosis de CE vía IM después del retiro del dispositivo con progesterona en vacas primípara de 15 meses de la raza Aberdeen Angus y Careta. En este experimento no se observaron efectos de estas dos dosis (0.5mg y 1mg) de CE sobre los porcentajes de preñez en IATF y se concluyó que ambas dosis a las 24 horas del retiro del dispositivo son igual de efectivas que el uso de BE.

Ruiz (2017) comparó CE vs BE evaluando el desempeño reproductivo en vacas lecheras Holstein con involución uterina retardada; en ese estudio, las vacas tratadas con CE tuvieron 1.6 veces más probabilidades de quedar gestantes más pronto que las vacas tratadas con BE ($P<0.01$), por lo que recomendaron la aplicación de CE sobre el BE para mejorar el desempeño reproductivo de vacas lecheras con involución uterina retardada.

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto de dos fuentes de estrógenos sobre la dinámica folicular y su relación con eficiencia reproductiva.

1.1 Objetivos específicos.

Comparar el efecto del Cipionato de estradiol (CE) vs Benzoato de estradiol (BE) sobre la concentración sérica de estrógenos, la presentación de signos asociados a estro, la tasa de gestación, y el cambio de condición corporal (CC) en hembras bovinas de la raza Holstein.

1.2 Hipótesis

El uso de dos fuentes de estrógenos (Benzoato de estradiol vs el Cipionato de estradiol) modificará de diferente manera la concentración de estrógenos en sangre y por lo tanto el comportamiento y la eficiencia reproductiva en vacas lecheras.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del ganado lechero en México

La leche es considerada como una de las principales fuentes de proteína animal en la dieta cotidiana de las personas (Del Valle, 2000); uno de los productos de la canasta básica más importantes, y además un promotor de creación de empleos en el sector pecuario (López et al., 1996). Dado que su cadena productiva abarca desde el abastecimiento de insumos que intervienen en la producción agropecuaria hasta el consumo final de productos lácteos, esta actividad es un generador neto de bienes y servicio (Álvarez, 1999).

Actualmente la mayor parte del consumo de lácteos está concentrado en los países industrializados. En la última década este aumento dependió en gran medida del crecimiento de la población mundial, así como a consecuencia de un mayor poder adquisitivo y de su mayor consumo per cápita. Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas en equivalente leche en diversas presentaciones para alimento humano. El 85% corresponde a leche de vaca y el resto a otras especies (búfala 11%, cabra 2% y otras 2%).

En México la tercera industria de alimentos más importante es la de productos lácteos, y su crecimiento depende de la disponibilidad y producción nacional de leche. Se prevé que para el 2020 el sector ganadero en lo que respecta al valor agregado será el sector agropecuario más importante. La producción pecuaria mundial está creciendo más que cualquier otro sector (Secretaría de Economía, 2012).

El aumento en la demanda de productos lácteos no solo se debe al crecimiento de la población mundial, sino también con el cambio de hábitos alimenticios cotidianos que contribuyen a mejorar la salud de la población en general. En este cambio no solo se habla de productos reducidos en grasa o azúcar, sino con componentes que no proceden directamente de la leche con la que hacen estos productos que se adicionan o modifican para representar una función que mejora la dieta de los consumidores, por ejemplo, adiciones de vitaminas, pre y pro-bióticos o fibra. Por ello, este aumento está relacionado con la industrialización y transformación de quesos, yogurts y leches industrializadas.

En cuanto al mercado internacional de la leche, pocos países cuentan con producción excedente exportable, esta disponibilidad está relacionada con los ciclos de producción del hemisferio norte y el sur, pues mientras hay un ciclo alto en el norte (primavera-verano) en el sur el ciclo está a la baja, y a la inversa pues cuando hay ciclo alto en el sur sucede lo contrario en el norte (Secretaría de Economía, 2012).

La eficiencia reproductiva es una gran prioridad en todos los sistemas, sin embargo, se considera mayor en los sistemas de partos estacionales, donde la oportunidad de que una vaca tenga su parición y nuevamente deba quedar gestante es un tiempo limitado, para asegurar un becerro por vaca por año, ya sea por motivos de temperatura en animales completamente estabulados en zonas áridas o por crecimiento de pastos en animales en pastoreo en zonas más templadas (Dillon et al., 2006).

En México la producción lechera se desarrolla en todo el territorio, pero en el periodo 2005 a 2010 cuatro estados de la región árida y semiárida (Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua) contribuyeron con el 45% del total de la producción nacional (Secretaría de Economía, 2012). Para el cierre de 2018, la producción de leche bovina alcanzó 12,008 millones de litros, es decir 2.0% más que en 2017, destacando el incremento del 5.5% en Jalisco, 3.4% en Guanajuato y 3.0% en Chihuahua (SADER, 2018).

2.2 Aplicación Biotecnologías reproductivas

La biotecnología aplicada a la reproducción comprende a un conjunto de técnicas cuyo objetivo principal es el de aumentar la eficiencia reproductiva y la tasa de mejoramiento genético de los animales, teniendo como principal efecto el aumento en la producción del sector ganadero (Palma, 2008).

Ellas contribuyen a aumentar la multiplicación y transporte de material genético y conservación de recursos excepcionales en formas que puedan ser utilizadas con facilidad en un futuro, obteniendo beneficios directos de selección de características deseadas.

Entre estas biotecnologías aplicadas se encuentra por ejemplo la inseminación artificial, que ha tenido una fuerte repercusión en programas de mejoramiento, pues es una de las más sencillas. En un inicio se seleccionaban machos y se utilizaba semen fresco,

actualmente es congelado y las compañías especializadas lo venden por catálogo. Otro de estos procesos son el uso de protocolos de sincronización del estros y de la ovulación, la transferencia de embriones, recolección de ovocitos, maduración y fecundación *in vitro* y sexado de embriones (Secretaría de Economía, 2012).

2.3 Ciclo estral de la vaca

El ciclo estral representa el patrón cíclico de actividad ovárica que facilita que las hembras pasen de un período de no receptividad reproductiva a la receptividad en última instancia permitiendo el apareamiento y el posterior establecimiento de gestación.

El inicio de los ciclos de estro se produce en la pubertad, que en vaquillas ocurre de los 6 a 12 meses de edad, generalmente con un peso de 200 a 250 kg. Los bovinos son animales poliéstricos no estacionales; la duración normal de un ciclo estral es de 18 a 24 días, y que exhiben comportamiento de estro en promedio cada 21 días. El ciclo consiste de dos fases discretas: la fase lútea (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días) (Forde et al., 2011).

El ciclo estral está regulado por las hormonas del hipotálamo (GnRH: hormona liberadora de gonadotropina), la pituitaria anterior (FSH: hormona estimulante del folículo y LH: hormona luteinizante), los ovarios (P4: progesterona, E2: estradiol e inhibinas) y el útero (PGF: prostaglandina F2). Estas hormonas funcionan a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa para regular el ciclo estral del ganado (Roche, 1996).

2.3.1 Fase Folicular

La fase folicular es el período que da inicio con la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis) hasta que ocurre la ovulación (a menudo designado como proestro y estro). Durante la fase folicular, el ovocito madura y es liberado del folículo (ovulación), el ovocito se libera en el oviducto, permitiendo una posible fertilización (Forde et al., 2011).

El crecimiento folicular dependiente de gonadotropina en el ganado ocurre en 2-3 olas por ciclo estral. Cada una de estas olas implica reclutamiento (proliferación), crecimiento, selección y dominio seguido de ya sea atresia u ovulación del folículo dominante (Savio et al., 1988).

El comienzo del desarrollo de los folículos depende de la gonadotropina, generalmente consta de 5–20 folículos con diámetro igual o mayor de 5 mm, relacionado con un aumento transitorio en las concentraciones de FSH (Sunderland et al., 1994).

Esto marca el principio de la dependencia del crecimiento folicular de la FSH (Ginther et al., 2002) con receptores de FSH (FSH-R) localizados a las células de la granulosa de los folículos (Camp et al., 1991; Evans & Fortune, 1997).

Este aumento de tamaño conduce a un aumento en las concentraciones de estradiol e inhibina del fluido folicular (Hillier, 1994). El aumento de inhibina suprime las concentraciones de FSH de la glándula pituitaria anterior mediante retroalimentación negativa, reduciendo FSH a concentraciones basales (Ginther et al., 2000a, b).

El folículo dominante se vuelve cada vez más sensible a LH (Ginther et al., 2000a). Independientemente del escenario del ciclo estral durante el cual se desarrollan los folículos, el cambiar de FSH a dependencia de LH (Kulick et al., 1999) se propaga a través de la presencia de receptores de LH (LH-R) en las células de la granulosa (Xu et al., 1995). LH-R se localizan en las células de la teca y la granulosa de folículos sanos, en diferentes etapas del desarrollo (Camp et al., 1991).

Se registran aumentos transitorios en circulación de la concentración de LH que ocurren al momento de la selección (Ginther et al., 2003), permitiendo que el folículo dominante continúe produciendo estradiol y creciendo en un entorno con menor concentración de FSH. La producción de altas concentraciones de estradiol es una característica del folículo dominante (Ireland & Roche, 1983) antes que sea visible su diferencia de diámetro, este tiene mayores concentraciones de estradiol en el líquido folicular en comparación con otros folículos que se desarrollaron a la par (Fortune, 1994; Sunderland et al., 1994; Mihm et al., 2000).

2.3.2 Fase Lútea

La fase lútea es el período posterior a la ovulación cuando el cuerpo lúteo (CL) está formado (a menudo designado como metaestro y diestro) (Forde et al., 2011). El CL se origina de las células del folículo ovulatorio. LH, es la principal hormona luteotrófica en

el ganado (Hansel, 1966), y es responsable de estimular la luteinización de la teca y células de la granulosa del folículo preovulatorio para convertirlas en células lúteas (Alila & Hansel, 1984).

La función del CL es la de producir concentraciones suficientes de progesterona a lo largo de la fase lútea del ciclo estral para eventualmente (si hay fecundación presente) mantener la gestación, y durante ésta, para disminuir la secreción de gonadotropina y prevenir la aparición de celos conductuales. Durante la fase luteal media, las altas concentraciones sostenidas de progesterona circulante regulan los receptores nucleares en el epitelio luminal del endometrio (Kimmings & MacLaren, 2001). Esto es un cambio crítico para permitir el aumento sincrónico o disminución de la expresión de genes del endometrio, que se requieren para iniciar la receptividad uterina, independientemente del estado de preñez del animal (Spencer et al., 2008).

Si en el día 16 del ciclo estral, no se ha detectado la señal de reconocimiento materno (interferón tau) en cantidades suficientes, se produce luteólisis. La prostaglandina es secretada por el útero en el bovino (Lamothe et al., 1977), esta es la principal hormona luteolítica en rumiantes (Kindahl et al., 1976; Nett et al., 1976).

2.4 Sincronización de estros

Actualmente es posible sincronizar eficientemente el crecimiento folicular ovárico e inducir la ovulación de un folículo dominante en un momento conocido, permitiendo la inseminación de hembras bovinas en un día y hora predeterminado, sin necesidad de detectar celo (Baruselli et al., 2004).

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) puede ser empleada ya sea en vacas cíclicas o en anestro, independientemente de la fase del ciclo estral en que se encuentre (Bó et al., 2003). Muchos protocolos están basados en sincronizar la aparición de la onda de crecimiento folicular por administración simultánea de progesterona y estradiol (Bó et al., 2002; Carvalho et al., 2008)

Al final de un protocolo, es necesario reducir las concentraciones de progesterona en circulación con el retiro de la Dispositivo de progesterona (fuente exógena), por ello se

administra prostaglandina para promover la regresión CL (fuente endógena), para que pueda ocurrir la ovulación. Por último, es necesario promover el crecimiento final del folículo e inducir una ovulación sincronizada, que permite la inseminación en un determinado momento (Bó et al., 2003).

2.4.1 Protocolos

Los protocolos de sincronización son utilizados como herramientas de control del ciclo estral y son regímenes hormonales de dosis múltiples dispuestos en orden de acuerdo a la función de cada componente del tratamiento.

Actualmente estos protocolos tienen como una fuerte base el uso de progestágenos, siendo el dispositivo de intravaginal liberador de progesterona (CIDR) una de los más utilizados (Carvalho et al., 2008).

Aunque estos tratamientos se pueden aplicar a grupos para sincronizar estratégicamente el estro, los resultados que se han obtenido al implementarlo junto con Inseminación Artificial (IA), el éxito en términos de fertilidad han sido bajo (Díaz et al., 2002; Ross et al., 2004). Con el fin de mejorar la respuesta y éxito al usar estos protocolos con el CIDR, se ha implementado el uso en conjunto de otras hormonas, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la gonadotropina coriónica equina (eCG) y el estradiol, en sus diferentes presentaciones (valerato de estradiol, cipionato de estradiol, benzoato de estradiol).

El control farmacológico del ciclo estral con el CIDR ha permitido conocer el día y hora estimado de ovulación, lo que dio pie al uso de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). El protocolo tradicional consiste en la aplicación del dispositivo CIDR más una aplicación de una dosis de benzoato de estradiol (BE), para generar una nueva onda de crecimiento folicular. De siete a ocho días posteriores el dispositivo es retirado y se administra un agente luteolítico, 24 h después se inyecta BE para sincronizar las ovulaciones, pasadas las 48 a 56 h del retiro se realiza la IATF (Sá filho et al., 2011).

Muchos de los protocolos implementados para el control de la ovulación requieren un gran número de contactos de manejo directo con el animal, que podría en algunos casos causar

estrés severo, esto seguido de consecuencias como la disminución de la fertilidad y el posible fracaso de la técnica. Abordando esto resulta interesante considerar protocolos que disminuyan la cantidad de encierres necesarios, lo que marca una diferencia entre el uso de BE y el de CE, pues la administración de CE en un protocolo es el día del retiro del dispositivo en comparación con el BE que se administra 24 h después del retiro del dispositivo, que se traduce como una diferencia de 1 día menos de manejo en caso de usar CE (Callejas et al., 2005).

2.5 Uso de estradiol

La síntesis de estradiol depende de la producción de andrógenos en las células de la teca y la posterior aromatización de estos andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa, conocido como el modelo teórico dos células-dos gonadotropinas (Fortune & Quirk, 1988). La producción de estradiol de los folículos en crecimiento depende de la frecuencia de pulso de LH (Crowe et al., 2001a, b). La unión de LH a sus receptores en las células teca impulsa la conversión de colesterol a testosterona a través de una serie de reacciones catalíticas. Una vez producida la testosterona en las células de la teca, se difunde en las células de la granulosa donde se convierte en estrógenos por el enzima aromatasa (Dorrington et al., 1975).

El estradiol no solo tiene un efecto local en el desarrollo del folículo, sino que también tiene un papel sistémico a través de un mecanismo de retroalimentación positiva al hipotálamo y la glándula pituitaria. Durante la fase folicular del ciclo estral, cuando las concentraciones de progesterona son basales, la alta concentración del estradiol producido por el folículo dominante pre-ovulatorio induce una oleada de GnRH del hipotálamo. El oleaje resultante de LH es de suficiente amplitud y frecuencia para estimular la maduración final y ovulación del folículo dominante (Sunderland et al., 1994).

El aumento de la concentración de estradiol también induce la expresión de comportamiento estral requerido para el éxito apareamiento (Ireland, 1987). La activina puede aumentar la producción de estradiol en líquido folicular (Knight & Glister, 2003) mientras que la folistatina impide el efecto esteroidogénico positivo de las activinas, los cuales pueden alterar la retroalimentación del mecanismo de estradiol para el hipotálamo

y la hipófisis (Phillips & de Kretser, 1998). Las inhibinas que se han detectado en las células de la granulosa en el ganado juegan un papel en la supresión de la FSH secretada en la hipófisis anterior también regula el ciclo estral (Findlay et al., 2002).

Se sabe que los ésteres de estradiol son capaces de inducir la ovulación en vacas, sin embargo, su farmacocinética difiere. En algunos estudios, el Benzoato de estradiol tuvo una vida media más corta e indujo un pico de LH anterior en comparación con el Cipionato de estradiol (Colazo et al., 2003; Martínez et al., 2007).

El uso de estradiol en protocolos de sincronización tiene dos funciones principales.

Cuando su aplicación está acompañada con progestágenos, al inicio tiene la finalidad de provocar la atresia a los folículos ya existentes, para ser un inductor de una nueva ola, entre tres y cinco días después de su aplicación (Bó et al., 1994), lo que asegura la presencia de un folículo nuevo y un ovocito viable para fertilizar al finalizar el tratamiento.

Cuando el estradiol se aplica al retiro del dispositivo de liberación de progesterona, induce una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo desencadenando a su vez la liberación de GnRH, que tiene la capacidad de aumentar los pulsos y la frecuencia de LH, logrando una uniformidad y reducción en el tiempo en que se presentará la ovulación (Lefebvre et al., 1992; Lucy et al., 2004), lo que tiene un uso útil en protocolos donde se realiza la IA a tiempo fijo (IATF) (Diskin et al., 2002).

2.6 Factores que influyen en la fertilidad

En todo sistema de producción se considera de alta prioridad la eficiencia reproductiva, pero es considerada aún de más alta en sistemas de parto estacional donde la oportunidad de que una vaca para y quede preñada tiene un tiempo limitado, esto para asegurar un ternero por año y tener sincronía entre la producción con la temperatura ambiental y disponibilidad de alimento (Dillon et al., 2006).

En consecuencia, uno de los mayores desafíos para cualquier profesional que se desempeñe en el ámbito productivo como técnicos reproductivos, nutricionistas y genetistas es el de comprender todos los fenómenos relacionadas a la vaca lechera que

contribuyen a una baja fertilidad y desarrollar medidas preventivas y estrategias para mejorar la fertilidad.

Rasgos multifactoriales intervienen directamente en la fertilidad, su deterioro se da por una red de variables genéticas, ambientales y de gestión de los diferentes sistemas de explotación, sus interacciones complejas hacen que sea difícil determinar una razón directa para que se manifieste una disminución, por ello es uno de los mayores retos de los profesionales directamente relacionados es la identificación de errores, debilidades y soluciones (Walsh et al., 2011).

2.6.1 Condición Corporal y producción láctea

La condición corporal (CC) es una estimación subjetiva de la cantidad de grasa o cantidad de energía almacenada, la cual tiene una gran influencia en facilidad o complicación de parto, en producción de leche y sobre la eficiencia reproductiva de la próxima lactancia.

Su evaluación y puntaje, aunque subjetivo es internacionalmente aceptado. Es una estimación visual y táctil, y sus cambios temporales se utilizan para monitorear el estado nutricional y de salud de las vacas en producción a lo largo del ciclo (Berry et al., 2007).

Se ha correlacionado directamente con el rendimiento reproductivo, tanto fenotípicamente (Buckley et al., 2003) y genéticamente (Berry et al., 2003) y apoya la premisa de que el estado nutricional afecta a la función reproductiva.

Las vacas con CC baja, o que sufren una pérdida excesiva y precoz de CC después del parto, tienen menos probabilidad de ovular, tienen una tasa reducida de preñez a la inseminación artificial, baja tasa de concepción al primer servicio y también mayor probabilidad de pérdida embrionaria, además de un aumento entre el intervalo entre partos (Berry et al., 2007; Roche et al., 2009).

Por otra parte la fertilidad en vacas que están sobre condicionados al momento del parto ($CC \geq 3.5$; escala de 5 puntos) está también comprometida, ya que se reduce la ingesta de materia seca justo antes del parto, y tienden a tener mayor movilización de grasa y por lo tanto un posparto temprano, y un balance de energía negativo más severo que las vacas con una CC óptima al parto (Roche et al., 2009).

De igual manera, en vacas de alta producción, ya que experimentan un incremento sustancial en los requerimientos energéticos para facilitar los aumentos dramáticos en la producción diaria de leche, entre 4 y 8 semanas postparto. Este requisito es solo parcialmente por un mayor consumo de alimento (debido a limitaciones en la ingesta y el apetito) y el resto se cumple con la movilización de reservas corporales, resultando en animales en balance de energía negativa (Grummer, 2007).

En este estado (balance de energía negativo) las concentraciones de insulina permanecen bajas, lo que evita el aumento en hígado de receptores de la hormona de crecimiento y secreción de Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) (Lucy, 2008). La reducción de insulina y de IGF-I impacta de manera negativa a las células ováricas evitando la ovulación del folículo dominante (Beam & Butler, 1999) y retrasan la reanudación de un nuevo ciclo (Gutiérrez et al., 1999).

Las consecuencias de los animales que entran en balance de energía negativo severo son un aumento en el riesgo de enfermedades metabólica, que ocurren en gran medida dentro del primer mes de lactancia, tienden a tener una función inmune reducida y una disminución en la fertilidad posterior (Roche et al., 2009).

2.6.2 Edad de la vaca/ número de partos

Otro factor a considerar es el de la edad en una vaca de producción, porque este puede determinar en su permanencia en un hato, aun por baja producción, baja fertilidad o enfermedad (Vollema, 1996), pues estos pueden afectarse por errores en el manejo general y reproductivo (Ferguson, 1995).

La edad al primer parto puede tener un efecto significativo, positivo si es la adecuada pues se dará el rendimiento productivo esperado o negativo pues puede disminuir la vida productiva dentro del hato lechero (Marini et al. 2007, Haworth et al. 2008). En vacas que tienen su primer parto a una corta edad hay una disminución de producción de leche durante su primera lactancia, sin embargo, su producción total por día y el rendimiento durante toda su vida serán significativamente mayores en comparación a las que tuvieron su primer parto a edad avanzada (Radostits 2001; Bormann et al. 2002, Marini et al. 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el establo lechero de la Unidad Académica Marín, de la Facultad de Agronomía de la UANL, localizado sobre la carretera Zuazua-Marín km 17.5 municipio de Marín NL (Latitud: 25.874945 | Longitud: -99.547656) y Altitud: 403 m.s.n.m. La medición hormonal se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la FA-UANL.

En Marín N.L el clima es extremoso, con lluvias en los meses de agosto y septiembre, y un promedio anual del 548 mm de lluvia, con presencia de meses calurosos en julio y agosto. Los vientos van con dirección de norte a sur y su temperatura media anual es 22 °C, con temperaturas mínimas y máximas de 4 y 40 °C.

3.2. Tamaño de muestra y selección de animales

Se utilizaron un total de 21 vacas de la raza Holstein-Friesian escogidas bajo los siguientes parámetros:

3.2.1 Estado reproductivo y sanitario

Vacas vacías con 60 días posparto (± 5 días). Todas las hembras utilizadas para el estudio estaban libres de enfermedades reproductivas (evaluadas por palpación rectal y con apoyo de un equipo de ultrasonido) y por análisis de registros previos. Durante la evaluación se consideró: Conformación anatómica (tamaño- posición del útero y cérvix a pregestacional), presencia de secreción- moco cervical (color y consistencia) y si se presentaban estructuras ováricas, que indiquen actividad.

3.2.2 Condición corporal

Todas las vacas consideradas para el proyecto fueron evaluadas por el mismo técnico y cumplen con una condición corporal de 3.5 ± 0.5 . Los grados de condición corporal van de 1 como sub-condicionamiento severo al 5 como sobre-condicionamiento severo (Edmondson et al., 1989).

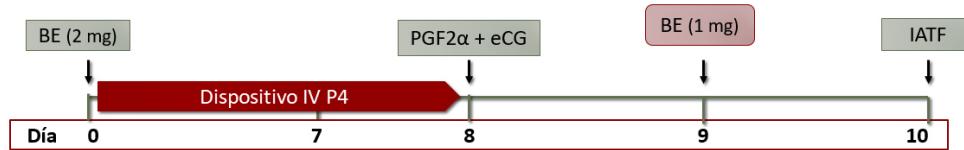
3.2.3 Manejo general

Los animales fueron sometidos a las mismas condiciones en el establo. Se utiliza una explotación intensiva, dividido en las áreas de becerreras, corrales de vaquillas, corrales de vacas en producción y corral de vacas en seco. La vacas se agruparon según su cantidad de producción y su estado (producción o en seco). Se cuenta con una sala de ordeño tecnificada de tipo espina de pescado de doble 4, con un foso central de casi 1 metro de profundidad, colocándose las vacas una de tras de otra con una leve inclinación a ambos lados. Son ordeñadas 2 veces al día por la mañana a las 6 am y por la tarde a las 6 pm. Se alimentan dos veces al día a las 8 am y 8pm, una vez terminada la ordeña, la ración se produce en la planta de alimentos de la Unidad Marín y tiene como base: Sorgo forrajero, silo de maíz, Alfalfa, y concentrado lechero. Se dispone de agua y minerales a libre acceso.

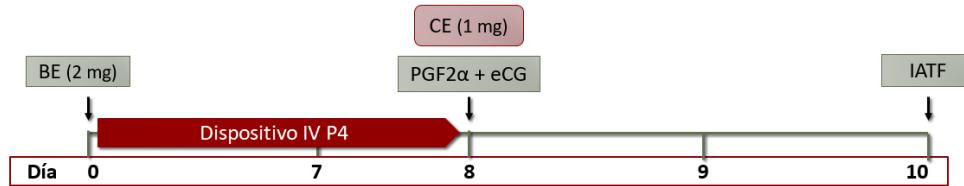
3.3. Protocolo de sincronización

Para el control del ciclo estral se emplearon 3 tratamientos hormonales de dosis múltiples, dispuestos en orden de acuerdo a la función de cada uno: Grupo Benzoato de estradiol, Grupo Cipionato de estradiol y Grupo Control, cada uno de ellos con 7 unidades experimentales (vacas) (Figura 1). Las vacas tenían un peso vivo de $544 \text{ kg} \pm 78 \text{ kg}$ y una condición corporal de 3.4 ± 0.3 . Al inicio del experimento cada lote de vacas tenía una producción promedio de leche 1,722 L.

Grupo BE



Grupo CE



Grupo Control

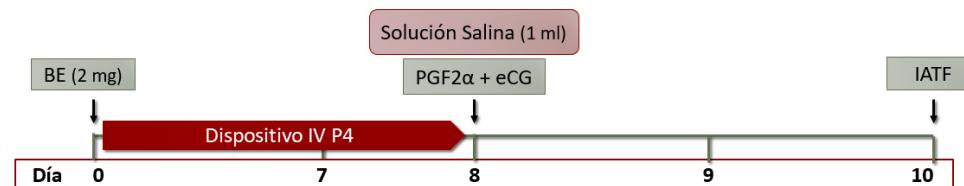


Figura 1. Protocolos aplicados en los 3 grupos (P4, progesterona; BE, benzoato de estradiol; Cipionato de estradiol; eCG, gonadotropina coriónica equina; IATF, inseminación artificial a tiempo fijo) (Adaptado de: Sales et al., 2012).

Descripción de cada tratamiento:

Tratamiento 1- Grupo BE: En el día 1 se realiza la colocación del dispositivo intravaginal (CIDR) bovino DispoceL® monouso, y se realiza la aplicación de la primera dosis de 2mg de Benzoato de Estradiol (International Prode. México) vía IM. En el día 8 se retira el dispositivo CIDR, seguido de una dosis de 25 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Zoetis, México) y 300 U.I. de eCG (Serigan®, Sanfer, México) ambas vía IM. El día 9 se aplica nuevamente Benzoato de estradiol 1mg vía IM. El día 10 se procede a realizar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

Tratamiento 2- Grupo CE: En el día 1 se realiza la colocación del dispositivo intravaginal (CIDR) bovino Dispocel® monouso, y se realiza la aplicación de la primera dosis de 2mg de Benzoato de Estradiol (International Prode. México) vía IM. En el día 8 se retira el dispositivo CIDR, seguido de una dosis de 25 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Zoetis, México) y 300 U.I. de eCG (Serigan®, Sanfer, México) ambas vía I.M, y 1 mg vía I.M de Cipionato de estradiol (International Prode. México) el día 10 se procede a realizar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

Tratamiento 3- Grupo Control: En el día 1 se realiza la colocación del dispositivo intravaginal (CIDR) bovino Dispocel® monouso, y se realiza la aplicación de la primera dosis de 2mg de Benzoato de Estradiol (International Prode. México) vía IM. En el día 8 se retira el dispositivo CIDR, seguido de una dosis de 25 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Zoetis, México) y 300 U.I. de eCG (Serigan®, Sanfer, México) ambas vía I.M, y 1 ml vía I.M de solución salina, el día 10 se procede a realizar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

En cada uno de los tratamientos el día 10 se realizó la IATF utilizando semen congelado/descongelado en pajillas provenientes de un toro de fertilidad probada de la compañía de genética Alta Genetics.

3.4. Muestreo y análisis de sangre

Para la determinación de estradiol en muestras de suero sanguíneo, se obtuvieron muestras de sangre cada 4 h (8am, 12pm, 4pm, 8pm 12 am y 4 am) durante 72 h (18 muestras en total). Comenzando un día antes del retiro del Dispositivo y finalizando el día de la IATF (Figura 2). Para cuidar la integridad de las venas utilizadas el sitio de punción para la obtención de muestra varió dependiendo de la hora, siendo las primeras 24 h en vena coccígea, de 24 a 48 h en vena yugular y de las 48-72 h en la vena coccígea nuevamente. Para el muestreo se utilizaron tubos Vacutainer de 6 ml sin anticoagulante (con activador de coagulo- CLOT ACTIVATOR), utilizando agujas 21 x 1.5". Las muestras se identificaron y fueron llevadas al Laboratorio de Reproducción Animal de la unidad Marín de la FA-UANL. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min en centrífuga (Clay

Adams®, modelo Dynac Centrifuge No. 420101, EUA). El suero obtenido fue identificado de manera individual, colocado en tubos Eppendorf y congelado hasta su análisis posterior.

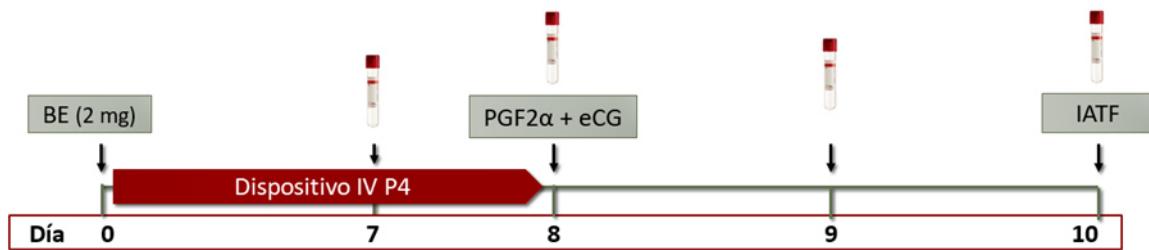


Figura 2. Esquematización de toma de muestras (inicio al día 7, un día antes del retiro del CIDR y finalizó el días 10, día de la IATF).

3.5. Análisis hormonales

Para cuantificar las concentraciones séricas de estradiol se utilizó el kit de Inmunoensayo enzimático para la cuantificación del Estradiol en suero o plasma (kit 6001010, MexLab, México). Este kit de Estradiol (E2) es un ensayo de competición en fase sólida (ELISA) entre las muestras y el conjugado enzimático de estradiol añadido a los pozos sensibilizados con anticuerpos policlonales (anti-Estradiol). Las determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos. El equipo para lectura fue un espectrofotómetro de placa (Stat Fox – 2100, EUA) a la longitud de onda de 450 nm.

3.6. Detección de celo

Se detectaron celos por observación directa en la mañana a las 9 am y por la noche a las 9 pm, con una duración de 60 minutos, utilizando el sistema de puntuación para registro de signos asociados a Celo.

Cuadro 1. Signos de celo y su puntuación (Adaptado de Van Eerdenburg et al., 1996).

Signos de celo	Puntos
Primario	
Acepta la monta	100
Secundarios	
Descarga vaginal mucosa	3
Intranquilidad y nerviosismo	5
Olfatear genitales de otras vacas	10
Apoyo de la barbilla	15
Monta pero no estática	10
Monta o intenta montar otras vacas	35
Montando la cabeza de lado sobre otra vaca	45

Como herramienta de apoyo se utilizaron crayones para pintar y marcar la base de la cola del animal, con el objetivo de realizar una lectura de grado de despintado pues las sucesivas montas eliminarían el color dejando el pelo del animal limpio. Eso fue el indicador de celo.

3.7. Medición de diámetros foliculares

En cada animal se evaluó la presencia de estructuras ováricas (folículo-cuerpo lúteo) cantidad y la medición de diámetros individuales por ultrasonido. Se evaluaron los dos ovarios por la técnica de barrido en ubicación latero-medial, dorso-ventral y cráneo-caudal, primero el derecho y luego el izquierdo, como lo describen Perea et al. (1998). Este proceso se realizó al inicio del protocolo para corroborar actividad ovárica, y al retiro de dispositivo intravaginal para identificar cambios y nuevas estructuras. Cada imagen seleccionada fue guardada y fue utilizada la herramienta de medición en cada estructura como un registro de campo.

Para esto se utilizó un ultrasonido portable SonoScape A5 Vet (Sonoscape Co. China) y una onda lineal de 12 MHz y transductor microconvexo de 6,5 MHz.

3.8. Diagnóstico de preñez

Se realizó a los 30 días post inseminación, con apoyo de ultrasonido portable SonoScape A5 Vet (Sonoscape Co. China) y una onda lineal de 12 MHz y transductor microconvexo de 6,5 MHz

3.9. Análisis Estadístico

Se utilizó una prueba de chi-cuadrada (χ^2) para variables discretas como son el % de estros, % de gestación y un ANOVA para determinar las diferencias de estructuras ováricas y de estradiol en función de la aplicación de 2 fuentes de estrógenos y el control. Se utilizó el Software estadístico SPSS, versión 18 para Windows 2013.

4. RESULTADOS

Del total de las vacas tratadas, el 57% presentó estro. De este porcentaje, una mayor proporción (el 83%) inició con signos de estro durante la tarde-noche pasadas las 27.36 h después del retiro del dispositivo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de vacas por tratamiento que presentaron estro una vez retirado el dispositivo.

Tratamiento	N.º	% estros	Intervalo retiro-estro (h)
CE	7	57.1 (4/7)	25.0
BE	7	71.4 (5/7)	25.8
Control	7	42.8 (3/7)	31.3

El tiempo que demoraron en presentar algún signo de estro fue similar en los tratamientos de BE y CE, y mayor en el grupo control ($p>0.05$). Asimismo, no se encontró diferencia por el tipo de hembra (vacas 57.2%, vaquillas 42.8%; $p>0.05$), independientemente el tratamiento utilizado.

El porcentaje de gestación fue del 29% (6/21), el cual fue bajo, no se encontró efecto del tratamiento sobre la tasa de gestación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje gestación de vacas por tratamiento.

Tratamiento	N.º	% gestación
CE	7	14.0 (1/7)
BE	7	43.0 (3/7)
Control	7	29.0 (2/7)

En cuanto al número y al tamaño de diámetro de estructuras foliculares no se encontró diferencia entre tratamientos ($p>0.05$), el tratamiento con BE presentó un diámetro ligeramente más grande en comparación con el CE y el Control (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios de número y diámetro de folículos por tratamiento.

Tratamiento	N.º	N.º folículos		Diámetro folículos (mm)	
		Inicio	Retiro	Inicio	Retiro
BE	7	3.1	3.7	10.7	7.5
CE	7	3.0	3.4	10.0	6.5
Control	7	3.0	3.7	9.2	6.5

No se encontraron diferencias en cuanto a número de Cuerpos Lúteos ($p>0.05$), en el tratamiento con BE los diámetros fueron ligeramente mayores en comparación con los tratamientos de CE y Control (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedios de número y diámetro de cuerpos lúteos por tratamiento

Tratamiento	N.º	N.º CL		Diámetro de CL (mm)	
		Inicio	Retiro	Inicio	Retiro
BE	7	0.14	1.14	2.6	4.1
CE	7	0.14	1.42	1.2	2.9
Control	7	0.14	0.57	0.8	2.1

El perfil de estrógeno fue diferente entre tratamientos (Figura 3). El grupo BE mostró dos elevaciones de 93 pg/ml y 106 pg/ml 8 h antes del retiro del dispositivo, y una elevación aun mayor de 221 pg/ml pasadas las 36 h del retiro del dispositivo. El grupo control se mantuvo debajo de los 63 pg/ml en todo momento, y el grupo CE tuvo a mayor elevación (143 pg/ml) antes del retiro del dispositivo en comparación con el tratamiento de BE y el control, y presentó una segunda elevación a las 20 h después del retiro del dispositivo de 120 pg/ml.

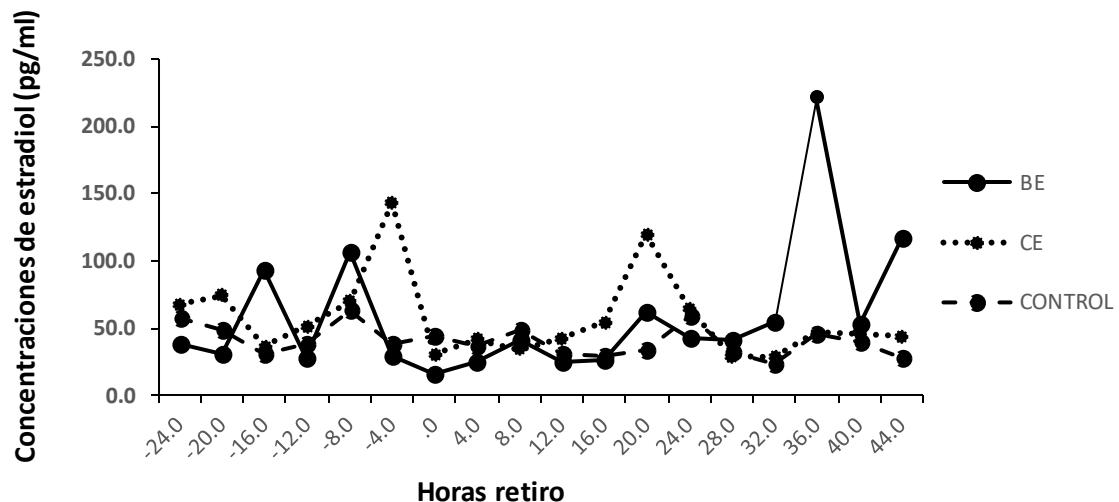


Figura 3. Concentraciones de estradiol de acuerdo a la fuente de estrógenos aplicados en vacas Holstein.

5. DISCUSIÓN

El porcentaje general de estro observado en este experimento fue bajo en comparación con otros reportes, donde se observó entre un 87 y 93.3% de vacas en estro (Martínez et al., 2000; García & De Jarnette, 2003). Se han reportado entre 86 y 100% de presentación de estros con protocolos en los que se ha utilizado un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (Lammoglia et al., 1998), porcentaje superior a los encontrados en este estudio. El intervalo de tiempo en que se presentó algún signo de estro fue en promedio de 25 a 31.3 h, siendo estos tiempos inferiores a los reportados por García & De Jarnette (2003), quienes observaron la presentación del estro en novillas tratadas con Cipionato de estradiol y grupo control de 51.4 vs 48.8 h respectivamente.

En cuanto al porcentaje de gestación tampoco se encontró diferencia estadística entre tratamientos, ni en el tipo de vaca, siendo los resultados obtenidos en el presente estudio similares a los reportados por Colazo et al. (2003), quienes no observaron diferencias entre tratamientos con CE y BE (63.3 vs 63.1%) en cuanto a la tasa de gestación con novillas Angus y F1. Otros estudios tampoco reportaron diferencias entre las hembras tratadas con BE y grupo control reportando tasas de gestación entre 28 y 50% (Kim et al., 2005; Abad-Zavaleta et al., 2006; Alnimer & Husein., 2007).

Los porcentajes de gestación obtenidos en el presente estudio son relativamente bajos. Sin embargo, hay reportes de que la sincronización del estro con la utilización de un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona resulta en una baja fertilidad al primer servicio (Chenault et al., 2003). Más aún, en el caso del presente experimento al momento del posparto tenían una condición corporal de 3.2 y al inicio del experimento ya presentaba una condición de 2.5. Se ha reportado que si la condición corporal inferior de tres (Roche et al., 2009), esto puede repercutir en que no se tengan los suficientes nutrientes para llevar a cabo la foliculogénesis, y por lo tanto una tasa de ovulación mayor y mejor sincronizada (Berry et al., 2007). Estudios realizados en vacas de leche posparto y que ganaron condición corporal 120 días posparto o la mantuvieron, tuvieron mejor tasa de gestación (58 y 60 %) en comparación con el grupo que perdió hasta una unidad de CC (36%). En el presente estudio, probablemente las vacas estuvieran en balance energético negativo, el cual reduce la frecuencia de LH, las concentraciones circulantes de insulina,

glucosa, factor de crecimiento similar a la insulina-1 y la producción de estradiol en el ovario (Lucy, 2008; Beam & Butler, 1999; Gutiérrez et al., 1999).

Para el caso de las concentraciones de estrógeno, este aumentó en todos los tratamientos una vez retirado el dispositivo. El aumento fue más rápido en el tratamiento en que se utilizó BE en comparación con el de CE y el Control, con diferencias entre las vacas que presentaron signos de estro y las que no lo presentaron.

Se puede observar que a las vacas del grupo control nunca se elevaron las concentraciones de estradiol comparadas con las del CE y BE. Las vacas del tratamiento BE tuvieron un pico elevado más cercano a las horas en que se llevó la IATF comparado con el grupo de CE y control.

Considerando que el estradiol indujo una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo produciendo a su vez la liberación de GnRH, la cual es capaz de aumentar los pulsos y la frecuencia de la LH, logrando con ello que se unifique y se reduzca el tiempo en que se presenta la ovulación (Lefebvre et al., 1992; Lucy et al., 2004).

Para este estudio se descarta el efecto de la época en que se desarrolló el experimento, que fue durante la época de invierno e inicio de la primavera, ya que en otros estudios reportan una baja en el porcentaje de gestación cuando se evaluaron las dos fuentes de estrógenos, siendo esta en época de verano, lo cual provoca un estrés térmico que deprime el desarrollo y la función folicular (Roth et al., 2000). Sin embargo, actualmente se documenta en la literatura que para mantener un mayor porcentaje de gestación, se requiere que dentro del desarrollo del folículo dominante sea lo más grande posible y robusto para poder dar a lugar a que se forme un cuerpo lúteo y poder mantener una gestación, por lo tanto se han desarrollado protocolos de sincronización de la ovulación utilizando el CE, que hace que el pico de estradiol sea más temprano después de retirado el dispositivo (Menchaca et al., 2015). En ganado lechero, al uso de estos protocolos de sincronización de ovulación con dosis múltiples de hormonas se les atribuyen efectos potencialmente negativos en la salud humana pues han sido detectados residuos por sofisticados métodos aun en partes muy pequeñas, sin embargo, aún existen dudas sobre si estos residuos significan un riesgo para el consumidor ya que no se pueden descartar en los resultados la influencia de otros factores (FAO, 2000).

6. CONCLUSIONES

En el presente experimento, a pesar de las diferencias farmacocinéticas entre ambos ésteres de estradiol evaluados, estos tuvieron el mismo efecto sobre la presencia de estructuras ováricas, presentación de signos asociados a estro y tasa de gestación.

Ambos tratamientos fueron igualmente efectivos en un protocolo de sincronización con el dispositivo de liberación lenta de progesterona (CIDR), pero el uso de Cipionato de estradiol permite reducir el número de veces que la vaca debe ser manejada para la aplicación de dosis hormonales, esto sin afectar su fertilidad.

7. LITERATURA CITADA

- Abad-Zavaleta J, Ramírez-Godínez JA., Flores-Mariñelarena A, Grado-Ahuir A, García-Macías A. 2006. Benzoato de estradiol en vaquillas sincronizadas con progesterona y prostaglandina-F2. *Archivo. Zootecnia.* 55 (209): 15-20.
- Álvarez MA. 1999. Tendencias de la reestructuración agroindustrial en la actividad lechera mexicana. In: *Dinámica del Sistema Lechero Mexicano en el Marco Regional y Global.* Martínez E., A. Álvarez M., L. García y M. Del Valle (coord.). Plaza y Valdez, Instituto de Investigaciones Sociales, Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM, UAM-Xochimilco. México. pp: 183-202.
- Alila HW, Hansel W. 1984. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction.* 31, 1015–1025.
- Alnimer MA, Husein MQ. 2007. The effect of progesterone and oestradiol benzoate on fertility of artificially inseminated repeat-breeder dairy cows during summer. *Reproduction in Domestic Animals.* 42: 363-369.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science.* 82,83:479–486
- Beam SW, Butler WR. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction & Infertility. Suppl.* 54, 411–424.
- Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD, Rath M, Veerkamp RF. 2003. Genetic relationships among body condition score, body weight, milk yield, and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 86, 2193–2204.
- Berry DP, Roche JR., Coffey MP. 2007. Body Condition Score and Fertility – More Than Just a Feeling. *Fertility in Dairy Cows – Bridging the gaps* Liverpool Hope University, Liverpool, UK, pp. 107–118.

- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41: 1555-1569.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R. 2002. The control of follicular wave development for selfappointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57:53-72.
- Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 78:307-26.
- Bormann J, Druet T, Gengler N, Wiggans GR. 2002. Estimating effects of permanent environment, lactation stage, age and pregnancy on test-day yield. *J. Dairy Sci.* 85:263-284
- Buckley F, O'Sullivan K, Mee, JF, Evans RD, Dillon P. 2003. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*. 86, 2308-2319.
- Callejas S, De Dominici O, Madero S, Cantalops F, Cabodevila J. 2005. Efecto del CPE administrado al momento de retirar un dispositivo intravaginal con progesterona o 24 hs después sobre el porcentaje de preñez a la IATF. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. p. 391.
- Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Molecular Endocrinology*. 5, 1405-1417.
- Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 69:167-75.
- Chenault JR, Boucher JF, Dame KJ, Meyer JA, Wood-Follis SL. 2003. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86: 2039-2049.

- Colazo MG, Kastelic JP, Maplesoft RJ. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*. 60:855– 865.
- Crowe MA, Enright WJ, Boland MP, Roche JF. 2001a. Follicular growth and serum follicle-stimulating hormone (FSH) responses to recombinant bovine FSH in GnRH-immunized anoestrous heifers. *Animal Science*. 73, 115–122.
- Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF. 2001b. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin releasing hormone-immunized heifers. *Biology of Reproduction*. 64, 368–374.
- Del Valle RM. 2000. La Innovación Tecnológica en el Sistema Lácteo Mexicano y su Entorno Mundial. UNAM, IIEC y Miguel Ángel Porrúa. México. 439 p
- Díaz GS, Galina CS, Basurto CH, Ochoa GP. 2002. Efecto de la progesterona natural con o sin la adición de benzoato de estradiol sobre la presentación de celo, ovulación y gestación en animales tipo Bos indicus en el trópico mexicano. *Arch. Med. Vet.* 34: 235-244.
- Dillon P, Berry DP, Evans RD, Buckley F, Horan B. 2006. Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. *Livestock Science*. 99, 141–158.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 23: 211-228.
- Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. 1975. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97, 1328–1331.
- Edmondson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72:68-78.

- Evans ACO, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138, 2963–2971.
- FAO. 2000. Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series. 893 (1): 21-54.
- Ferguson J. 1995. La reproducción en hatos lecheros. Hoard's Dairymen. Diciembre. p 1138.
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. 2002. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 191, 35–43.
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 163–169.
- Fortune JE, Quirk SM, 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science*. 66 (Suppl. 2), 1–8.
- Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 50, 225–232.
- García A, De Jarnette M. 2003. The effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or estradiol cypionate (ECP) treatment at CIDR insertion on reproductive performance of virgin beef heifers. *Theriogenology*.59 (1): 219.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000a. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biology of Reproduction*. 63, 383–389.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000b. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biology of Reproduction*. 62, 920–927.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction* 124, 475–482.

- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 78, 239–257.
- Gutiérrez CG, Gong JG, Bramley TA, Webb R. 1999. Effects of genetic selection for milk yield on metabolic hormones and follicular development in postpartum dairy cattle. *Journal of Reproduction & Infertility*. 24.
- Grummer RR. 2007. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: management of the dry period. *Theriogenology*. 68 (Suppl. 1), S281–S288.
- Hansel W. 1966. Luteotropic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea. *Journal of Reproduction & Infertility*. 33–48.
- Haworth G, Tranter W, Chuck J, Cheng Z, Wathes V. 2008. Relationships between age at first calving and first lactation milk yield, and lifetime productivity and longevity in dairy cows. *Veterinary Record*. 162:643-647.
- Hillier SG. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction* (Oxford, England). 9, 188–191.
- Ireland JJ, Roche JF. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112, 150–156.
- Ireland, J.J., 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34, 39–54.
- Kim UH, Suh GH, Nam HW, Kang HG, Kim IH. 2005. Follicular wave emergence, luteal function and synchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in CIDR-treated, lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 63: 260-268.
- Kimmins S, MacLaren LA. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22, 742–748.
- Kindahl H, Edqvist LE, Granstrom E, Bane A. 1976. The release of prostaglandin F2alpha as reflected by 15-keto-13,14- dihydroprostaglandin F2alpha in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins* 11, 871–878.

- Knight PG, Glister C. 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*. 78, 165–183.
- Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* 52, 913–921.
- Lammoglia MA, Short RE, Bellows RE, Bellows SE, MacNeill MD, Hafs HD. 1998. Induced and synchronized estrus in cattle. Dose titration of estradiol benzoate in prepuberal heifers and post-partum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2. *Journal of Animal Science*. 76: 1662-1670.
- Lamothe P, Bousquet D, Guay P. 1977. Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. *Journal of Reproduction & Infertility*. 50, 381–382.
- Lefebvre DM, Block E. 1992. Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol-induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *Journal of Dairy Science*. 75: 1461-4.
- López MRJ, Solleiro IN, Hernández RH. 1996. Capacidad tecnológica de los sectores agrícola y agroindustrial de México. In: *El Cambio Tecnológico en la Agricultura y las Agroindustrias en México*. Del Valle, C. y J. Solleiro (coord). Siglo XXI, IIEC y UNAM. México. pp: 95-114
- Lucy MC, McDougall S, Nation DP. 2004. The use of hormonal treatment to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 495-512.
- Lucy MC. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for postpartum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (Suppl.2), 31–39.
- Marini PR, Charmandarian A, Di Masso RJ. 2007. Desempeño productivo y reproductivo de vacas de diferentes edades al primer parto en sistemas a pastoreo. Sitio Argentino de Producción Animal (en línea). Consultado 14 junio 2017. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar/>.

- Martínez MF, Kastelic JP, Adams GP, Janzen E, McCartney DH, Maplettoft RJ. 2000. Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol or GnRH. *The Canadian Veterinary Journal*. 41: 786-790.
- Martínez MF, Kastelic JP, Colazo MG. 2007. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. *Domestic animal Endocrinology*. 33:77–90.
- Menchaca A, Nuñez-Olivera R, Cuadro F, Bó G. 2015. Pregnancy rates in beef heifers synchronized with a shortened oestradiol-based treatment that provides for a prolonged proestrus. *Reproduction, Fertility and Development*. 27:96.
- Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*. 63, 811–819.
- Nett TM, Staigmiller RB, Akbar AM, Diekman MA, Ellinwood WE, Niswender GD. 1976. Secretion of prostaglandin F2alpha in cycling and pregnant ewes. *Journal of Animal Science*. 42, 876–880.
- Palma G. 2008. Biotecnología de la reproducción. Repro Biotec: Argentina, pp. 1-15.
- Perea F, González R, Cruz R, Soto E, Rincón E, González C, Villamediana P. 1998. Evaluación ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y en novillas mestizas. *Revista Científica FCV-LUZ*, 8 (1), 14-24.
- Phillips DJ, de Kretser DM. 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 19, 287–322.
- Radostits O. 2001. Herd health: food animal production medicine. 3 ed. W.B. Saunders Company. Pennsylvania, USA. 884 p.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis. *Reviews of Reproduction*. 1, 19–27.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. 2009. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*. 92, 5769–5801.

Ross PJ, Aller JF, Callejas SS, Butler H, Alberio RH. 2004. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology*. 62: 265-273.

Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction & Infertility*. 120: 83-90.

Ruiz GLF, Sandoval MRS, Montenegro VM, Delgado CA. 2017. Desempeño Reproductivo de Vacas Lecheras con Involución Uterina Retardada bajo Tratamiento Hormonal con Cipionato de Estradiol y Benzoato de Estradiol. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 28(1), 110–119.

Sá Filho MF, Sales JN, Baruselli P. 2011. Actualización sobre programas de sincronización de celos en ganado bovino de carne. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, p.165-190.

SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2018. Boletín Informativo SIAP, Panorama de la leche en México. Disponible en <https://www.inforural.com.mx/panorama-de-la-leche-en-mexico-6/>

Sales J, Carvalho J, Crepaldi G, Cipriano RS, Jacomini J, Maio J, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS. 2012. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78(3), 510–516.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of reproduction and fertility*. 83, 663–671.

Secretaría de economía. 2012. Análisis del sector lácteo en México. Disponible en https://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf .

Spencer TE, Sandra O, Wolf E. 2008. Genes involved in conceptus endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* (Cambridge, England) 135, 165–179.

- Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of reproduction and fertility*. 101, 547–555.
- Uslenghi G, Chayer R, Callejas S. 2010. Efectividad del cipionato de estradiol inyectado al final de un tratamiento con progesterona sobre la eficiencia reproductiva. *Revista Veterinaria*, 21(1), 55–58.
- Van Eerdenburg FJM, Karthaus D, Taverne MAM, Merics I, Szenci O. 2002. The relationship between estros behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85:1150.
- Vollema, 1996. Genetic parameters of longevity traits of an upgrading population of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 79: 2261- 2267.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123(3–4), 127–138.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*. 53, 951–957.

8. ANEXOS

8.1 Datos generales

nº.	ID	SIINIGA	FECHA NACIMIENTO	EDAD MESES	nº. PARTO	FECHA PARTO	PESO-PARTO (KG)	C.C PARTO	FUENTE DE ESTR	PROD. LECHE (L)	INICIO PROTOCOLO
1	113	1903526370	14/02/2011	90,35	5	26/08/2018	556	3	CE	1973.30	30/10/2018
2	158	1903595847	15/04/2013	64,39	4	27/08/2018	670	3.5	CE	1658.80	30/10/2018
3	179	1903794757	26/01/2014	55,13	3	30/08/2018	588	3.5	BE	1358.60	30/10/2018
4	171	1903595857	10/10/2013	58,68	3	31/08/2018	828	4	BE	1922.00	30/10/2018
5	133	1903646171	30/07/2011	86,51	4	14/10/2018	646	4	CE	1493.00	07/12/2019
6	166	1903794749	29/10/2013	59,53	3	15/10/2018	604	3.5	BE	1316.90	07/12/2019
7	208	1904385910	16/09/2016	24,8	0	11/10/2018	449	3	BE	1219.40	07/12/2019
8	210	1904385892	01/01/2016	34,23	0	08/11/2018	652	4	CE	1791.80	15/01/2019
9	209	1904385899	15/06/2016	28,35	0	26/10/2018	429	3	CE	1642.00	15/01/2019
10	189	1904385878	08/09/2015	37,69	1	29/10/2018	522	3	CONTROL	1801.00	15/01/2019
11	173	1903595848	19/08/2013	62,92	2	16/11/2018	570	3	CONTROL	1781.00	15/01/2019
12	211	1904385941	17/10/2016	25,07	0	17/11/2018	389	3	CONTROL	1003.50	15/01/2019
13	212	1904385943	04/11/2016	25,07	0	17/11/2018	454	3	BE	1097.20	15/01/2019
14	182	1903794781	28/08/2014	54,44	2	27/11/2018	584	3.5	BE	3048.80	12/03/2019
15	186	1903794791	30/11/2014	51,34	2	07/12/2018	554	3.5	CONTROL	2800.00	12/03/2019
16	184	1903794782	28/08/2014	54,44	3	15/12/2018	564	4	CE	1874.90	12/03/2019
17	214	1904385914	24/09/2016	29,54	0	06/01/2019	452	3	BE	1695.10	12/03/2019
18	216	1904385898	23/04/2016	34,6	0	13/01/2019	497	3.5	CONTROL	1524.20	12/03/2019
19	215	1904385942	30/10/2016	28,35	0	07/01/2019	471	3.5	CONTROL	1793.00	12/03/2019
20	213	1904385915	24/09/2014	29,54	0	04/01/2019	451	3.5	CE	1919.30	12/03/2019
21	193	1904385893	02/01/2016	38,28	2	14/01/2019	504	4	CONTROL	1450.40	12/03/2019