



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA CONCEPCIÓN  
DE MELLIZOS EN VACAS LECHERAS

**MACARENA SOLEDAD PIZARRO BORÉ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

**PROFESOR GUÍA: DR. MARIO DUCHENS**

SANTIAGO, CHILE  
2012



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA CONCEPCIÓN  
DE MELLIZOS EN VACAS LECHERAS

**MACARENA SOLEDAD PIZARRO BORÉ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : MARIO DUCHENS ARANCIBIA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARIA SOL MORALES SILVA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: RICHARD ARANCIBIA BERRIOS	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2012**

Qué difícil es comenzar el fin de esta memoria, sin sentir que podría dejar a alguien fuera.

Comenzaré dando las gracias a todas las personas que creyeron en mí y en mis capacidades, incluso más que yo misma.

**A mis tías y tíos:** Gracias por su apoyo incondicional, el estar ahí cuando no tenía quien me diera un abrazo, o un reto o una simple sonrisa, es invaluable su cariño.

**A mis amig@s:** Dicen por ahí, “de lo bueno poco”, ustedes son lo mejor que me pude haber encontrado, gracias por enseñarme a confiar, a reír, a relajarme, a disfrutar de cada momento. Espero algún día poder devolverles la mano por todo lo que han hecho por mí.

**A mis papás y hermanos:** Gracias por darme la oportunidad de seguir mi sueño. Por muy incierto que sea el futuro, sé que puedo contar con ustedes, con su apoyo y cariño incondicional. No existen las familias perfectas pero ciertamente ustedes son la combinación perfecta para mí. Los quiero mucho, donde sea que me encuentre siempre estarán en mi corazón.

**A mi profesor guía:** Dr. Duchens (alias: DOC). Doc, gracias por permitirme ser tesista suyo, encontré en usted un gran mentor, una persona que admiro mucho tanto por su calidad profesional como por su alta calidad humana. Ojalá todos tuvieran la fortuna de contar con un profesor tan entregado a sus alumnos, nada egoísta con sus conocimientos y dispuesto a sacrificar horas de trabajo en escuchar rollos y problemas ajenos. Espero no perder el contacto y decirle que puede contar conmigo, así como yo pude contar con usted en estos años.

Un gran abrazo  
Con cariño  
MACA

## RESUMEN

Junto al aumento de la producción en vacas lecheras observado en las últimas décadas, ha ocurrido un aumento en la frecuencia de partos melliceros. Tanto la gestación como el parto de mellizos no son deseados pues se asocian a mayores pérdidas embrio-fetales y una mayor incidencia de alteraciones en el parto y postparto. El objetivo del presente estudio fue determinar los factores de riesgo para la concepción de mellizos en vacas lecheras y a su vez, determinar la pérdida de gestaciones únicas y dobles entre los 30 y 60 días de gestación.

El estudio se realizó en dos lecherías de la zona central de Chile, con aproximadamente 340 y 350 vacas en ordeña y una producción estandarizada de 12.500 y 12.200 lt, respectivamente. El diagnóstico de gestación fue realizado por ultrasonografía, siendo el signo confirmatorio de preñez la presencia de 1 ó 2 embriones con latido cardíaco visible. Se recolectó información de 1.018 diagnósticos de gestación. Para cada diagnóstico se obtuvieron datos de: predio, número ordinal del parto (NOP; 1, 2, 3 y más), días en leche al momento de la inseminación fértil (DELI), tipo de inseminación (celo natural, inseminación a tiempo fijo), condición corporal al parto (CCP) en escala de 1 a 5, producción de leche el día de la inseminación fértil (PIA), producción de leche en promedio de los 14 días previos a la concepción (P14), producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia (P100), diagnóstico de gestación (única, mellizo) y confirmación de la gestación desde los 60 días (preñada, no preñada). Se realizó un análisis preliminar mediante pruebas de ji-cuadrado, donde aquellos factores que resultaron relevantes fueron incluidos en un modelo final, que constituyó una regresión logística multivariada utilizando el programa estadístico INFOSTAT y considerando como variables explicatorias: PIA, NOP y DELI. Se obtuvieron las razones de riesgo (odd ratios, OR) con sus intervalos de confianza al 95% (IC95%)

La incidencia de gestaciones dobles varió fuertemente entre predios, 15,9% contra 8,3% ( $p=0,0003$ ). El paso de primer (9%) a segundo parto (14%) fue el factor más influyente sobre el aumento de mellizos ( $p=0,04$ ). La mayor incidencia de gestaciones dobles se presentó en el rango de DELI de entre 100 y 150 días (17,6%) siendo significativamente diferente de los rangos  $\leq 100$  y  $>150$  días ( $p=0,03$ ). La condición corporal al parto ( $p=0,16$ ) y el tipo de inseminación ( $p=0,13$ ) no presentaron diferencias significativas entre únicos y

mellizos. Para la P100 se observaron diferencias significativas ( $p=0,009$ ), aumentando la incidencia de mellizos en la medida que aumenta la producción, siendo de un 18,2% sobre los 5000 lt. Para la P14 se observó que la mayor incidencia de mellizos correspondió al grupo con producción sobre los 40 lt ( $p=0,009$ ) a su vez, para la variable PIA se observó un aumento en la incidencia de mellizos a medida que la producción superó los 40 lt ( $p=0,04$ ) llegando a un máximo de 17,8% sobre los 50 lt. La pérdida de gestaciones única (6,5%) y mellicera (8,5%) no presentaron diferencias significativas ( $p=0,36$ ); al desglosar la pérdida por número ordinal de parto se obtuvo que la pérdida de mellizos en vacas de primer parto (21,4%) fue significativamente diferente ( $p=0,001$ ) que la pérdida de gestaciones únicas (5,0%).

La regresión logística mostró que al comparar el número de la lactancia, las hembras de tercer y más partos presentaron 5,06 veces más posibilidades de gestar mellizos que vacas de primer parto (IC 95%: 1,37-18,72  $p=0,01$ ). Al analizar el efecto de los DELI sobre la concepción de mellizos no se observaron diferencias significativas entre vacas que quedaron gestantes antes de 100 días con aquellas que quedaron gestantes entre 100 y 150 días (OR=1,79; IC95%: 0,66 - 4,90;  $p= 0,25$ ) y las que iniciaron gestación después de los 150 días (OR=2,22; IC95%: 0,81 – 6,10;  $p=0,12$ ). Finalmente, la producción de leche el día de la inseminación resultó ser el factor más determinante sobre la ocurrencia de una gestación mellicera; así, en comparación con el grupo de menor producción (<35 lt), vacas con producciones de leche entre los 35 y 42 lt presentan 6,53 veces más riesgo de gestar mellizos (IC95%: 0,79-54,04;  $p=0,08$ ); entre los 43 y 49 lt la probabilidad de mellizos fue 6,77 veces mayor que el grupo de menor producción (IC95%: 0,8-56,92;  $p=0,07$ ) y sobre los 50 lt el riesgo de una gestación mellicera es 14,81 veces la del grupo de menor producción (IC95%: 1,63-134,3;  $p= 0,01$ ).

## SUMMARY

Whereas production in dairy cows has risen in recent decades, there has been an increase in the frequency of twinning. Both, pregnancy and birth of twins are undesirable due to an increase in embryo-fetal loss and higher incidence of abnormalities at birth and postpartum. The aim of this study was to determine risk factors for twinning in dairy cows and to determine the loss of single and twin pregnancies between the 30th and 60th days of gestation.

The study was conducted in two dairy farms in central Chile, with 340 and 350 milking cows and a standardized production of 12.500 and 12.200 liters respectively. Pregnancy was diagnosed with ultrasonography, and confirmed by the presence of 1 or 2 embryos with visible heartbeats. Information was collected from 1018 pregnancy diagnosis. For each diagnosed pregnancy the following data were obtained: dairy farm, number of lactation (NOL, 1, 2, 3 and more), days in milk at fertile insemination (DIMF), type of insemination (natural oestrus, fixed-time insemination), body condition at calving (BCC) on a scale of 1 to 5, milk production on day of insemination (PIA), production of milk on average at 14 days before conception (P14), cumulative milk production at 100 days of lactation (P100), pregnancy diagnosis (single, twin) and confirmation of pregnancy at 60th day (pregnant, not pregnant). Preliminary analysis was performed using chi-square test, where the relevant factors were included. The final model was a multivariate logistic regression, using the statistical program INFOSTAT. The explanatory variables were PIA, NOL and DIMF. Odds ratios (OR) were obtained with confidence intervals at 95% (IC 95%).

The incidence of twin pregnancies vary significantly between farms: 15.9% versus 8.3% ( $p = 0.0003$ ). The biggest difference was between primiparous (9%) and multiparous (14%) being this statistically significant ( $p = 0.04$ ). The highest incidence of twin pregnancies occurred in the range of 100 to 150 DIMF (17.6%) being significantly different from  $\leq 100$  and  $> 150$  days ( $p = 0.03$ ). Body condition at calving ( $p = 0.16$ ) and type of insemination ( $p = 0.13$ ) did not differ significantly between single and twins pregnancies. A significant increase of the twin pregnancies incidence was observed along with the increase of P100 ( $p = 0.009$ ), being 18.2% at the 5000 lt.

For P14 the highest incidence of twins was in the groups above 40 lt ( $p = 0.009$ ); for the variable PIA there was an increase in the incidence of twins as production exceeded 40 lt ( $p = 0.04$ ), reaching a peak of 17.8% over the 50 lt. The loss of single (6.5%) and twins (8.5%) pregnancies did not differ significantly ( $p = 0.36$ ). If those pregnancy losses are divided by the ordinal number of lactation, the loss of twins in first calving cows (21.4%) are significantly different ( $p = 0.001$ ) than the loss of singleton pregnancies (5.0%).

Comparing the number of lactation with a logistic regression, cows with third and more births are 5.06 times more likely to gestate twins compared to first calving cows (95% CI: 1.37 to 18.72  $p = 0.01$ ). When analyzing the effect of the DIMF on conception of twins there was no significant differences between cows pregnant at 100 days with those that were pregnant between 100 and 150 days (OR = 1.79, 95% CI 0.66 - 4.90,  $P = 0.25$ ) and gestations started later than 150 days (OR = 2.22, 95% CI 0.81 to 6.10,  $P = 0.12$ ). Finally, the production of milk at the day of insemination was found to be the most determinant factor on the occurrence of twin's pregnancy. In comparison with the group of lower production (<35 lt.), cows with milk yields between 35 and 42 lt. have 6.53 times the risk of gestating twins (95% CI: 0.79 to 54.04,  $P = 0.08$ ); between 43 and 49 lt. the likelihood of twins was 6.77 times the lower production group (95% CI 0.8 to 56.92,  $P = 0.07$ ) and above 50 lt the risk of twins pregnancy is 14.81 times the lower production group (95% CI 1.63 -134.3,  $P = 0.01$ ).

## ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	8
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1.- Generalidades.....	9
2.2.- Dinámica folicular .....	10
2.3.- Ovulaciones múltiples: Factores de riesgo .....	13
2.4.- Pérdida embrionaria.....	17
III.- OBJETIVO GENERAL.....	19
IV.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
V.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
5.1.- Población en estudio: .....	20
5.2.- Recolección y análisis de datos:.....	21
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
6.1.- Descripción general .....	24
6.2.- Distribución de gestaciones melliceras:.....	25
6.2.1.- Predio .....	25
6.2.2.- Número ordinal de parto.....	25
6.2.3.- Días en leche al momento de la inseminación fértil.....	26
6.2.4.- Manejos hormonales.....	28
6.2.5.- Condición corporal al momento del parto .....	28
6.2.6.- Producción de leche.....	29
6.3.- Pérdida de gestaciones únicas y melliceras.....	32
6.4.- Análisis de datos agrupados .....	33
6.5.- Modelo final.....	37
VII.- IMPLICANCIAS .....	39
VIII.- CONCLUSIONES .....	40
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXO.....	45



## I.- INTRODUCCIÓN

Los bovinos son una especie unípara, esto quiere decir que la mayoría de las veces la gestación termina con el nacimiento de una cría, y en muy baja frecuencia ocurre el nacimiento de dos o más crías, denominadas mellizos. La ocurrencia de un parto mellicero en general no es deseada pues reduce la rentabilidad del sistema (Beerepoot *et al.*, 1992; Kinsel *et al.*, 1998; López-Gatius y Hunter, 2005), al tener una serie de efectos negativos sobre la hembra, como distocia, retención de membranas fetales, metritis, endometritis y una mayor pérdida de condición corporal en el post parto (Kinsel *et al.*, 1998). Sobre los terneros nacidos mellizos los efectos de su condición se reflejan en más mortalidades neonatales y una mayor presentación de enfermedades digestivas y respiratorias durante la crianza (Silva del Río *et al.*, 2006).

En las últimas décadas se ha podido evidenciar un aumento en los partos de mellizos en los sistemas lecheros de alta producción (Kinsel *et al.*, 1998), llegando en algunos casos a un 20% de incidencia (Wiltbank *et al.*, 2006).

Las causas por las cuales una vaca queda preñada de mellizos no se encuentran del todo claras. Algunos estudios han determinado diferentes niveles de asociación entre la concepción de mellizos y la producción de leche, siendo las vacas de mayor producción las que tendrían mayor probabilidad de quedar preñada con mellizos; otras asociaciones se han encontrado con el número ordinal de parto, la época de concepción, la presencia de quistes ováricos (Lopez-Gatius *et al.*, 2005) y la aplicación de protocolos de sincronización (Kinsel *et al.*, 1998). Otro aspecto que se ha descrito como impacto de una gestación mellicera es una mayor tasa de mortalidad embrionaria y fetal (Silva del Río *et al.*, 2009); sin embargo, otro estudio, realizado en ganado de carne, muestra que no existen diferencias significativas entre la pérdida de embriones entre una vaca única y melliza (Echternkamp *et al.*, 1990).

En este estudio se analizó la información obtenida de dos lecherías de la zona central de Chile, con el fin de determinar el grado de asociación entre los diferentes factores descritos como posiblemente asociados a la concepción de mellizos. También se pretende comparar, cuántas de las gestaciones diagnosticadas como dobles, terminan en la pérdida del concepto en relación a las gestaciones únicas.

## II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.- Generalidades:

La hembra bovina es considerada como poliéstrica típica o no estacional, es decir cicla durante todo el año sin afectarse por el fotoperiodo. El ciclo estral dura en promedio 21 días, pudiendo encontrar ciclos normales de entre 17 y 25 días. Una gestación normal tiene una duración aproximada de 280 días (278-293); la mayoría de las gestaciones culmina con el nacimiento de una sola cría (Jainudeen y Hafez, 2002).

En las últimas dos décadas se ha observado, junto al aumento en la producción en vacas lecheras, un aumento de la frecuencia de partos melliceros (Kinsel *et al.*, 1998; López-Gatius *et al.*, 2005). La ocurrencia de un parto mellicero en general no es deseado pues se encuentra asociado con una serie de problemas en el momento del parto, como son distocia y mortalidad de terneros y también se ha observado un incremento en ciertas alteraciones del post parto, tales como las retenciones de membranas fetales, metritis, desplazamiento del abomaso, menor consumo de alimento y una mayor pérdida de condición corporal (Nielen *et al.*, 1989; Kinsel *et al.*, 1998; Bell y Roberts, 2007).

Podría pensarse que el nacimiento de mellizos es deseado pues aumenta el número de crías por hembra, pero finalmente el número efectivo de hembras disponibles para reemplazos no aumenta (Nielen *et al.*, 1989). Sin embargo, según Gregory *et al.* (1996) la producción en kilos de ternero por vaca parida, a los 200 días, fue hasta un 50 % mayor en aquellas vacas que parieron mellizos.

Otro aspecto a considerar es que la distribución de las frecuencias de sexos en los partos de mellizos tiene una relación aproximada de 1:2:1 para los pares HH:MH:MM, respectivamente (Nielen *et al.*, 1989). Durante la gestación de mellizos macho – hembra, ocurre una serie de sucesos que terminan en una fusión placentaria, donde la anastomosis de los vasos corio-alantoídeos permite el paso de hormonas, como la hormona anti-mülleriana y células desde el macho hacia la hembra durante el periodo de diferenciación sexual. Debido a que la diferenciación sexual se produce en el macho alrededor del día 40 de gestación, 20 días antes que en la hembra, esta hormona causa diferentes grados de alteración en el desarrollo del sistema reproductivo de la hembra, lo que llevará a que la futura hembra sea infértil. Esta alteración es conocida como

Freemartinismo y afecta a más del 90% de las hembras nacidas de partos mellizos macho- hembra; por lo tanto la hembra nacida junto con un macho no servirá como reemplazo (Camargo y Páez, 2009).

Para la comprensión de la ocurrencia de una gestación mellicera se hace necesario la revisión de los siguientes puntos: dinámica folicular, ovulaciones múltiples y sus factores de riesgo y pérdida embrionaria.

## **2.2.- Dinámica folicular:**

El crecimiento folicular en el bovino ocurre bajo un patrón de ondas, denominadas ondas foliculares, así la mayoría de los ciclos estrales en los bovinos están compuestos por 2 ó 3 ondas foliculares (Adams *et al.*, 2008). Se conoce como emergencia de una onda, el desarrollo de un grupo de folículos de más de 4 mm de diámetro, en cantidad variable para cada onda (Wiltbank *et al.*, 2011). El desarrollo de las ondas foliculares ocurre en ambos ovarios y es altamente dependiente de gonadotrofinas, especialmente de la hormona folículo estimulante (FSH) (Mihm *et al.*, 2002). La síntesis y secreción de FSH es regulada a nivel hipotalámico por la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y es inhibida por factores ováricos como el estradiol ( $E_2$ ) e inhibina (Wiltbank *et al.*, 2011).

Luego de la emergencia de una onda, los folículos continúan su crecimiento a velocidades similares por aproximadamente dos días. Es durante este periodo que la concentración de FSH circulante comienza a disminuir (Adams *et al.* 2008) y la mayoría de los folículos detiene su crecimiento y se atresian. En la mayoría de los casos sólo un folículo continúa su desarrollo, convirtiéndose en un folículo dominante (FD), proceso denominado desviación (Mihm *et al.*, 2002). En general la desviación ocurre cuando alguno de los folículos alcanza los 8,5 mm de diámetro y durante este proceso ocurre un aumento en la expresión de receptores de la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Wiltbank *et al.*, 2011).

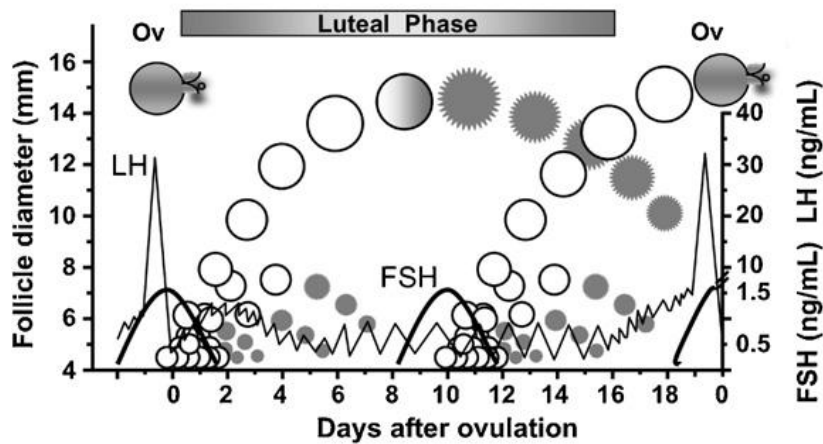
El folículo dominante aumenta notoriamente la producción de  $E_2$  incluso antes que la FSH llegue al nivel más bajo; las altas concentraciones de  $E_2$  mantienen bajos los niveles de FSH evitando la emergencia de una nueva onda folicular (Mihm *et al.*, 2002).

Por lo general el folículo dominante de la primera onda no persiste por más de 3 ó 4 días ya que la progesterona proveniente del cuerpo lúteo (CL) del folículo anteriormente ovulado, regula negativamente la pulsatilidad de LH (Mihm *et al.*, 2002), la que es fundamental para la diferenciación final y adquisición de capacidad ovulatoria (Adams *et al.*, 2008).

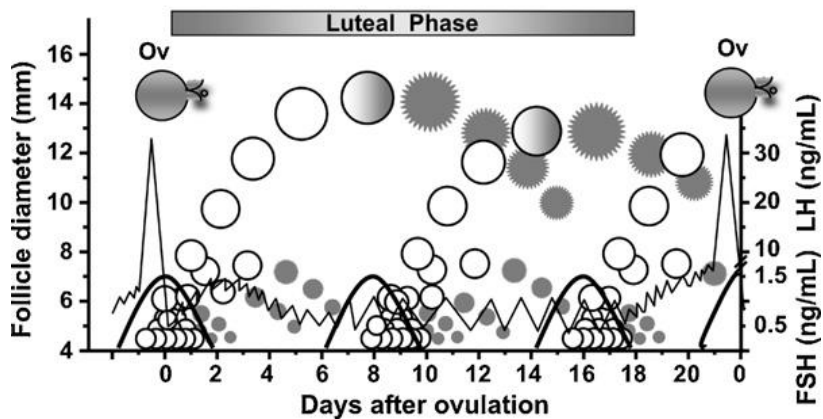
La disminución en el  $E_2$  circulante lleva a una nueva alza de FSH, permitiendo la emergencia de una nueva onda y selección de un nuevo FD, mientras el folículo anterior regresa. Si no ocurre la luteólisis durante la dominancia del segundo folículo, éste se atresia y ocurre la emergencia de una tercera onda (Mihm *et al.*, 2002). De otra manera, al ocurrir la luteólisis el folículo dominante ovula, ya que los altos niveles de  $E_2$  inducen un alza preovulatoria de GnRH que gatilla un *peak* de LH y de FSH, permitiendo la diferenciación final y la ovulación (Wiltbank *et al.*, 2011). En la figura 1 se muestra un esquema que resume la dinámica folicular.

Otro aspecto importante de la dinámica folicular es que el desarrollo de ondas ocurre durante todos los periodos reproductivos. Existe desarrollo folicular incluso durante la gestación, en donde los niveles insuficientes de LH no permiten la diferenciación final por lo que ocurre la atresia del folículo dominante. En cambio, durante el post parto temprano se ha asociado la pérdida de la condición corporal con la liberación de cantidades importantes de progesterona ( $P_4$ ) desde el tejido adiposo, la cual resultaría en concentraciones sub-luteales de  $P_4$  y prevención de la ovulación (Wiltbank *et al.*, 2011).

### 2-wave interovulatory interval



### 3-wave interovulatory interval



**Figura 1.** Dinámica folicular y secreción de gonadotropinas durante un ciclo estral de dos y tres ondas. Tomado de: Adams *et al.* (2008). Los folículos subordinados y el folículo dominante son representados por círculos blancos (viables) y sombreados (atrésicos). Un *peak* de FSH (línea gruesa) precede la emergencia de cada onda. Un aumento en las concentraciones de LH circulante (línea delgada) precede a la ovulación. Antes del alza de LH y posterior a la misma transcurre un periodo que se caracteriza por una alta frecuencia en la pulsatilidad de LH, como resultado de las bajas concentraciones de progesterona (e.g. el periodo de luteólisis y luteogénesis respectivamente).

La producción de leche se ha descrito como un factor que afecta el desarrollo normal de una onda folicular. Así, en un estudio realizado por Wiltbank *et al.* (2011) se demostró que vacas de alta producción tienen menores concentraciones de E<sub>2</sub> circulante y poseen folículos preovulatorios de mayor tamaño. Esto se debe a que estas vacas tienen un mayor flujo sanguíneo al hígado, lugar donde se metabolizan e inactivan los esteroides ováricos, lo que resulta en menores niveles de E<sub>2</sub> circulante (Sangristavong *et al.*, 2002) y retraso en la ovulación, pues la mayor metabolización de E<sub>2</sub> implica que el folículo deber crecer adicionalmente para lograr los niveles suficientes de E<sub>2</sub> para gatillar el *peak* preovulatorio de GnRH/LH. Esto explicaría la presencia de folículos preovulatorios de mayor tamaño.

Una vez comprendidos los aspectos generales de la dinámica folicular es importante mencionar que los mellizos pueden ser clasificados como monocigóticos o dicigóticos. Los mellizos monocigóticos provienen de la fecundación de un ovocito, el cual se separa durante el proceso de segmentación resultando dos individuos genéticamente idénticos. Los mellizos dicigóticos resultan de la fecundación de dos ovocitos liberados en el mismo ciclo estral (Silva del Rio *et al.*, 2006). Al comparar el DNA de pares de mellizos mediante PCR, se determinó que sólo un 4,7 % de los mellizos son monocigóticos (Silva del Rio *et al.*, 2006); por lo tanto, los mellizos en vacas lecheras se encuentran principalmente asociados a ovulaciones múltiples (Nielen *et al.*, 1989; Silva del Rio *et al.*, 2006).

### **2.3.- Ovulaciones múltiples: Factores de riesgo:**

La ocurrencia de una ovulación múltiple se relaciona con un fenómeno denominado codominancia, el cual ocurre por la selección de dos o más folículos dominantes en una onda folicular. Esto correspondería a una falla en el proceso de desviación (Ginther *et al.*, 2003).

Las causas por las cuales se produce este fenómeno no están del todo claras, pero se cree que cambios en el medioambiente endocrino podrían estar relacionados con la ocurrencia de una codominancia. En un estudio realizado por Fricke y Wiltbank (1999), se plantea que niveles de FSH levemente aumentados al momento de la desviación permitirían el desarrollo de más de un folículo, esto posiblemente asociado a los menores niveles de estrógenos circulantes. Esto es consistente con lo planteado por Wiltbank *et al.*

(2011), en cuanto a que las vacas en las cuales ocurrió la selección de más de un folículo dominante presentaban mayores niveles de FSH en las 24 hr previas al momento de la desviación.

Asimismo, otros estudios muestran que al observar ondas foliculares desarrolladas en un ambiente con bajos niveles de  $P_4$ , se presenta una incidencia de ovulación múltiple de entre un 60% y 75%. Esto estaría asociado a que menores niveles de  $P_4$  permitirían mayores niveles de FSH en circulación (Lopez *et al.*, 2005a; Wiltbank *et al.*, 2006; 2011).

En un estudio realizado por Lopez *et al.* (2005b), se compararon los niveles hormonales y perfiles de crecimiento folicular en vacas lactantes que presentaron 1, 2 y 3 folículos dominantes en la onda. Se tomaron los datos en el momento previo a la desviación (48 hr), durante la desviación y posterior a la misma (48 hr). Todos los datos fueron normalizados para el momento de la desviación. Los resultados mostraron que aquellas vacas que desarrollaron más de un folículo dominante presentaron un incremento significativo en los niveles de FSH y LH previo a la desviación, al mismo tiempo que poseían menores niveles de inhibina y  $P_4$ . También se encontró un incremento prematuro en los niveles de  $E_2$  en vacas codominantes, lo que podría deberse al mayor número de folículos involucrados y quizás a una diferenciación temprana de los folículos al fenotipo dominante. Por otro lado, los menores niveles de inhibina podrían estar explicando el incremento en FSH.

Estudios en vacas lecheras de alta producción (35 - 45 kg/d) han descrito rangos de ovulaciones múltiples que van entre un 14 y un 20,2% (Fricke y Wiltbank, 1999). Las vacas lecheras de alta producción presentan bajos niveles de  $P_4$  y de  $E_2$ , esto asociado a un mayor metabolismo de estas hormonas a causa de una mayor circulación hepática, la cual se ha relacionado al alto consumo de alimento que realizan estas vacas (Fricke y Wiltbank, 1999; Lopez *et al.*, 2005b; Wiltbank *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Sangristavong *et al.* (2002), se observó una alta correlación entre el consumo de alimento y la producción de leche en vacas lecheras. Como el hígado es el principal sitio de metabolización de hormonas esteroidales ( $E_2$  y  $P_4$ ), al haber un incremento en el consumo de alimento, y debido a la mayor circulación hepática resultante (*liver blood flow-LBF*), habrá un incremento en la tasa de *clearance* metabólico

(MCR) de estas hormonas. Los resultados obtenidos muestran que vacas lactantes poseen mayor circulación hepática que las no lactantes, encontrándose una circulación hepática de 1.183 lt/hr en vacas lactantes *versus* 757 lt/hr en vacas no lactantes. Otra parte del estudio fue determinar los niveles de hormonas esteroidales, donde se encontró que las vacas lactantes poseían niveles significativamente menores de  $P_4$  y  $E_2$  que las vacas no lactantes. Finalmente se plantea que el tener individuos expuestos a un plano nutricional constantemente elevado generaría un efecto crónico, en donde aunque el animal no se encuentre consumiendo alimento, el flujo sanguíneo hacia el hígado se mantendrá alto y por lo tanto la tasa de *clearance* metabólico también estará aumentada (Sangristavong *et al.*, 2002).

Se ha observado, por algunos autores, una relación entre el nivel productivo de la vaca, la duración del estro y la presencia de ovulaciones múltiples. Un estudio realizado durante un periodo de 10 años determinó que el principal contribuyente en el incremento en la incidencia de mellizos era la producción de leche (Kinsel *et al.*, 1998). Posteriormente al realizar un seguimiento de las ovulaciones por ultrasonografía transrectal, se observó que las vacas con producción de leche sobre el promedio presentaron rangos de doble ovulación de un 20,2%, comparado con un 6,9% de aquellas bajo el promedio (Fricke y Wiltbank, 1999), sin embargo otros autores (Lopez-Gatiús *et al.*, 2005), no han encontrado un efecto positivo de la producción de leche respecto a las dobles ovulaciones. Así, un incremento de 1 kg en la producción disminuye la probabilidad de ovulación múltiple en 0,97.

Un estudio posterior comparó la duración promedio del estro, mediante la utilización de un sistema de monitoreo continuo de las montas realizadas (*HeatWatch System*), observándose que aquellas vacas cuya producción láctea se encontraba sobre el promedio del rebaño (~40 kg/día) presentaban celos de aproximadamente 6,2 hr, lo que es en promedio 4,7 hr menos que las vacas que se encontraban por debajo de los 40 kg/día (Wiltbank *et al.*, 2006). Al parecer la alta producción de leche lleva a una menor concentración de  $E_2$  en circulación lo que explicaría la menor duración del estro (Lopez *et al.*, 2004; Wiltbank *et al.*, 2006).

El número ordinal de parto (NOP) se ha implicado como un factor relacionado con los partos de mellizos (Nielen *et al.*, 1989), siendo la proporción de mellizos de 1% para



vaquillas y de un 4,1% en vacas de más de 5 partos (Kinsel *et al.*, 1998). Asimismo vacas que han tenido partos previos de mellizos, mostraron tener mayor riesgo de gestar mellizos nuevamente (Nielen *et al.*, 1989), posiblemente debido a la presencia de otros factores asociados (Kinsel *et al.*, 1998).

Los tratamientos hormonales utilizados ampliamente en protocolos de sincronización podrían tener incidencia en la concepción de mellizos. Según un estudio de Kinsel *et al.*, (1998), las hembras que recibieron tratamientos con prostaglandinas o GnRH presentaron hasta 2,2 veces más probabilidades de parir mellizos.

Se ha observado que la probabilidad de mellizos se incrementa con cada día en lactancia adicional al momento de la inseminación (Silva del Río *et al.*, 2009). Dentro de la producción de leche, Lopez *et al.* (2005a) determinaron que el nivel de producción de los 14 días previos al celo, se encontraba asociado con un incremento en la presentación de ovulaciones múltiples, donde la mayor incidencia se observó en producciones de sobre los 40 kg/día, mientras que en estudios previos se encontró relación entre la producción el día de la inseminación y los dos días anteriores, con la presencia de una ovulación doble (Fricke y Wiltbank, 1999).

Como se puede ver se ha descrito una gran cantidad de factores que podrían tener relación con una gestación múltiple; la importancia relativa de cada uno de ellos es difícil de determinar, por lo que hasta el momento solo existen hipótesis al respecto.

Aunque se conoce el impacto de la condición corporal al parto en el rendimiento posterior de la hembra, no existen publicaciones que indiquen una relación con la gestación de mellizos. Se podría presumir que la condición corporal o los cambios en condición corporal después del parto, podrían relacionarse a alteraciones en la dinámica folicular que culminen en ovulaciones dobles (Lopez-Gatius *et al.*, 2003).

#### **2.4.- Pérdida embrionaria:**

La pérdida de la gestación es uno de los factores económicos más importante al cual se enfrenta la industria lechera (Lopez-Gatius *et al.*, 2004). Una situación no deseada con las gestaciones dobles es el incremento de la mortalidad embrionaria y fetal (Silva del Río *et al.*, 2009).

Debido a la ocurrencia de pérdida embrionaria temprana, se hace difícil determinar con exactitud el porcentaje de ovulaciones dobles que terminan en una gestación mellicera. Por otro lado, luego de una ovulación doble puede comenzar una gestación única, ya sea que sólo un ovocito es fecundado o que uno de los embriones muera y el otro sobreviva (Silva del Río *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Silva del Río *et al.* (2009), se determinó que el riesgo de pérdida de la gestación entre el primer diagnóstico (25-40 días post IA) y la reconfirmación de la preñez (48 - 82 días post IA), fue mayor para vacas gestantes de mellizos (24,5%) que vacas gestantes de una cría (8%). Al analizar la producción de leche cercana al momento de la inseminación, ésta constituyó un factor de riesgo para la pérdida de gestaciones únicas y no para la pérdida de gestaciones dobles (Silva del Río *et al.*, 2009).

Lopez-Gatius y Hunter (2005) monitorearon la gestación de mellizos mediante la realización semanal de ultrasonografía transrectal, hasta los 90 días de gestación. Se determinó que el mayor porcentaje de pérdidas embrionarias se produce entre los 35 y 40 días presentándose con mayor frecuencia en embriones ubicados en el mismo cuerno. Sin embargo, Echterkamp *et al.* (1990) no encontraron relaciones significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre la ocurrencia de una ovulación múltiple, tanto unilateral como bilateral, y una mayor mortalidad embrionaria, logrando mayores tasas de concepción en aquellas vacas multiovulares. Según Silva del Río *et al.* (2009), la pérdida de gestaciones no tuvo relación con la ubicación del o los conceptos en el útero.

En un estudio previo de Lopez-Gatius *et al.* (2004), se realizó un seguimiento diario de la gestación mediante ultrasonografía transrectal y se determinó la distribución de las pérdidas de gestación. Así, se determinó que el 75% de las pérdidas embrionarias ocurrió entre los 45 y 60 días de gestación. Un aspecto interesante es que la pérdida de

gestaciones únicas ocurrió antes que la pérdida de gestaciones melliceras. El riesgo de pérdida fue prácticamente nulo para gestaciones únicas luego de los 60 días de gestación; al parecer las gestaciones melliceras requieren de más tiempo para que la preñez se establezca con firmeza, por lo que sería recomendable incluir un tercer diagnóstico de gestación posterior a los 90 días en el caso de una gestación doble.

Se puede apreciar que hay gran cantidad factores aparentemente involucrados en la ocurrencia de una gestación gemelar. Sin embargo, hay otra serie factores que estarían menos involucrados en este fenómeno, como es la condición corporal al parto.

Es así, que en este estudio se busca establecer si los factores más nombrados como relevantes y la condición corporal al parto, presentan relación con la ocurrencia de una concepción mellicera en vacas lecheras de la zona central de Chile.

### **III.- OBJETIVO GENERAL**

Establecer los factores de riesgo asociados a la concepción de mellizos en vacas lecheras, en predios de la zona central de Chile

### **IV.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la relación entre nivel productivo de la hembra en diferentes momentos de la lactancia y una gestación doble.
- Determinar la relación existente entre los días de lactancia al momento de la inseminación y una gestación doble.
- Determinar la relación existente entre el número ordinal de parto y la condición corporal al parto, con la concepción de mellizos.
- Analizar la relación entre manejos hormonales previos a la concepción y una gestación mellicera.
- Determinar el porcentaje de pérdida de la preñez comparando gestaciones dobles y únicas, entre los 30 y 60 días de gestación.

## V.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1.- Población en estudio:

El estudio se realizó en dos lecherías ubicadas en las Regiones Metropolitana y de O'Higgins. La Lechería N°1 cuenta con aproximadamente 340 vacas en leche, y con una producción estandarizada de 12.500 lt por lactancia; la Lechería N°2, con alrededor de 350 vacas en leche y con una producción estandarizada de 12.200 lt. La ordeña se realiza tres veces al día.

En términos generales los animales se mantienen en un sistema intensivo de producción, con confinamiento en sistemas de alojamiento de cubículos techados con cama de arena y piso de cemento. Para la alimentación se utilizan alimentos voluminosos tales como: heno de alfalfa, ensilaje de avena y ensilaje de maíz, los que son suplementados con concentrados y aditivos. Se utilizan distintas raciones según grupo de lactancia, las que son formuladas bajo los estándares del National Research Council (NRC, 2001) y repartidas con carro mezclador varias veces al día.

Respecto al manejo reproductivo de los predios, los partos ocurren en maternidades individuales o corrales especiales, observados por el personal encargado y con asistencia inmediata si fuese necesario. Los terneros son separados de las madres inmediatamente después del parto. Se realizan controles ginecológicos a las vacas, según el predio entre los 3 y 24 días después del parto. Las inseminaciones se realizan a partir de los 50 días de lactancia, en celos naturales o inducidos con prostaglandina F<sub>2</sub> alfa. Aquellas vacas que no han recibido una inseminación hasta el día 75 aproximadamente, son asignadas a un protocolo hormonal para la inseminación a tiempo fijo.

Aquellas vacas que no repiten celo son examinadas mediante ultrasonografía transrectal a partir de los 30 días de la inseminación. La técnica comprende el examen del cuerpo del útero y de ambos cuernos uterinos, desde el cuerpo al ápice. La presencia de un embrión con latido cardíaco es el signo confirmatorio de la gestación. Una vez detectado un embrión, se continúa el examen para determinar la eventual existencia de un segundo embrión. Las vacas son sometidas a un segundo examen desde aproximadamente los 60 días de gestación para determinar la continuación de la preñez. Las vacas que no resultan preñadas en cualquiera de los dos son reinseminadas sucesivamente, hasta

lograr la preñez o hasta que se determine su eliminación de la reproducción por infertilidad u otra causa (producción, sanidad mamaria, conformación de ubre, entre otras).

## **5.2.- Recolección y análisis de datos:**

La recolección de los datos se realizó directamente en los predios en estudio. La información fue rescatada de los sistemas de registros presentes en cada plantel, ya fueran libros de visitas veterinarias o programas computacionales intraprediales, tales como DairyComp® y DairyPlan®.

Durante un periodo de 6 meses se obtuvo un total de 1.018 registros útiles correspondientes a diagnósticos de gestación de ambos predios, abarcando entre enero del 2010 a abril del 2011. Para cada registro se recolectó una serie de datos de interés entre los que se encuentran: predio, número ordinal de parto (NOP), fecha de concepción, días en leche al momento de la inseminación fértil (DEL), tipo de inseminación (celo natural, inseminación a tiempo fijo), condición corporal al parto (BCS) medida en una escala de 1 (caquéctica) a 5 (obesa), producción de leche el día de la inseminación fértil (PIA), producción de leche en promedio de los 14 días previos a la concepción (P14), producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia (P100), diagnóstico de gestación (única, mellizo) y confirmación de la gestación (preñada, no preñada).

Para la producción de leche el día de la inseminación fértil y producción de leche en promedio de los 14 días previos a la concepción se cuenta con un total de 363 y 354 registros, respectivamente. Para la condición corporal al parto se cuenta con 974 registros útiles.

La base de datos fue generada en una planilla de Excel sobre la cual se realizaron los posteriores análisis. La información fue analizada utilizando el programa estadístico INFOSTAT®. En primer lugar se realizó una clasificación y agrupación de los datos de interés, los cuales fueron dispuestos en tablas y posteriormente se determinó su importancia relativa con respecto a cada variable analizada. Este análisis se efectuó mediante el test de ji-cuadrado. Posteriormente, la información fue analizada a través de una regresión logística univariada, de la cual los datos que presentaron importancia y

diferencias significativas en la primera fase de análisis fueron incluidos en el modelo final. El resto de las variables fueron excluidas evitando así un efecto de sobreparametrización.

El modelo final constituyó una regresión logística binaria multivariada, con el propósito de determinar el impacto de cada uno de los factores analizados sobre la variable dependiente (diagnóstico ecográfico de mellizos desde los 30 días de gestación).

Debido a la gran dispersión de los datos y la dificultad de manejo de las variables continuas se prosiguió a una categorización de estas variables, de esta forma se constituyeron las siguientes categorías:

- Número ordinal de parto (NOP): agrupación de lactancias formando tres categorías 1, 2, y 3 y más lactancias
- Días en lactancia (DEL): se conformaron tres categorías: 1 =  $\leq 100$ ; 2 = 101-150; 3 =  $>150$  DEL.
- Condición corporal al parto (BCS): la medición de la condición corporal se agrupó en: 1 =  $\leq 3$ ; 2 = 3,25; 3 =  $>3,25$
- Producción de leche promedio de los 14 días previos a la inseminación (P14): 1 =  $\leq 35$  lt.; 2 = 36 – 40 lt.; 3 = 41 – 49 lt.; 4 =  $\geq 50$  lt
- Producción de leche el día de la inseminación (PIA): 1 =  $\leq 35$  lt.; 2 = 36 – 42 lt.; 3 = 43 – 49; 4 =  $\geq 50$  lt.)
- Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia (P100): 1 =  $<3000$  lt.; 2 = 3000 - 3999 lt.; 3 = 4000 - 4999 lt; 4 =  $\geq 5000$  lt.

El modelo utilizado para el análisis final fue el siguiente:

$$p = \frac{1}{1 + e^{(-\alpha - \beta_h N_h - \beta_k P_k - \beta_m D_m)}}$$

Donde,

$Y$  = Gestación (0: Única; 1: Mellizos)

$p$  = Probabilidad de que  $Y = 1$

$\alpha$  = Intercepto

$\beta_h$  = Parámetro de NOP

$N_h$  = Efecto del h-ésimo NOP

$\beta_k$  = Parámetro de producción de leche al día de la inseminación

$P_k$  = Efecto de la k-ésima producción de leche al día de la inseminación

$\beta_m$  = Parámetro de DEL al momento de la IA

$D_m$  = Efecto del m-ésimo DEL al momento de la IA

Los resultados obtenidos se expresan con sus respectivas las razones de riesgo (*Odds ratio*, OR) y con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%; LI 95% y LS 95%).



## VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1.- Descripción general:

En la tabla 1 se resumen las características de cada predio y se nombran las variables analizadas en el presente estudio.

**Tabla 1.** Características generales de los predios en estudio.

	<b>PREDIO 1</b>	<b>PREDIO 2</b>
<b>VACAS EN LECHE</b>	340	350
<b>PRODUCCIÓN ESTANDARIZADA 305 DÍAS (lt)</b>	12.500	12.200
<b>ORDEÑAS DIARIAS</b>	3	3
<b>USO bST</b>	No	Si
<b>VARIABLES ANALIZADAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NOP ( 1, 2, ≥3)</li> <li>• DELI (≤100, 101-150, &gt;150)</li> <li>• BCS (≤ 3; 3,25; &gt;3,25)</li> <li>• P100 (&lt;3000 lt.; 3000 - 3999 lt.; 4000 - 4999 lt; ≥ 5000 lt)</li> <li>• P14 (≤35 lt.;36 – 40 lt.;41 – 49 lt.; ≥50 lt)</li> <li>• PIA (≤35 lt.; 36 – 42 lt.; 43 – 49; ≥50 lt.)</li> <li>• TIPO IA ( celo- IATF)</li> <li>• PÉRDIDA DE GESTACIÓN</li> </ul>	

## 6.2.- Distribución de gestaciones melliceras:

### 6.2.1.- Predio

De un total de 1.018 gestaciones, se encontró un 13% de gestaciones gemelares donde la distribución para cada predio se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Frecuencia de gestaciones dobles en dos predios de la zona central de Chile.

PREDIO	DIAGNÓSTICO GESTACIÓN	
	(n)	MELLIZOS
1	(95/597)	15,9% <sup>a</sup>
2	(35/421)	8,3% <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>(130/1018)</b>	<b>13%</b>

a,b: porcentajes con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Al comparar la distribución de diagnósticos gemelares entre predios, se observa una mayor incidencia de gestaciones dobles en el predio n°1 ( $p = 0,0003$ ). La incidencia total de mellizos está en concordancia con lo reportado por la literatura, donde Kinsel *et al.* (1998) y Lopez-Gatius *et al.* (2005) señalan que con el transcurso de los años ha habido un aumento de los partos melliceros, mientras que Fricke y Wiltbank (1999) encontraron un aumento en la incidencia de ovulaciones múltiples, llegando a entre 14% y 20,2% en predios con producciones sobre los 35 y 45 kg/d, respectivamente, por lo que se asume un aumento en la incidencia de gestaciones melliceras.

### 6.2.2.- Número ordinal de parto

Uno de los factores descritos por Lopez-Gatius *et al.* (2005) y Nielen *et al.* (1989), que incidiría en la presentación de ovulaciones múltiples y, por lo tanto, en el riesgo de una gestación melliza, es el número ordinal de parto, como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Frecuencia de diagnósticos gemelares por predio, según el número ordinal de parto (NOP= 1, 2, ≥3).

	<b>PREDIO 1</b>	<b>PREDIO 2</b>	
<b>NOP</b>	<b>(n) MELLIZOS</b>	<b>(n) MELLIZOS</b>	<b>TOTAL MELLIZOS</b>
1	(22/169) 13%	(6/160) 3,8% <sup>a</sup>	(28/329) 9% <sup>a</sup>
2	(30/162) 18,5%	(6/100) 6% <sup>a</sup>	(36/262) 14% <sup>b</sup>
≥3	(43/266) 16,2%	(23/161) 14,3% <sup>b</sup>	(66/427) 15% <sup>b</sup>
<b>Promedio por predio</b>	<b>(95/597) 15,9%</b>	<b>(35/421) 8,3%</b>	<b>(130/1018) 13%</b>

a,b: porcentajes dentro de columnas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Se observan diferencias en cuanto a la frecuencia de la gestación de mellizos entre predios. Al analizar los datos en conjunto, se presenta un aumento significativo ( $p = 0,04$ ) en la incidencia de gestaciones melliceras al pasar de primer a segundo parto. A pesar de que en el predio n° 1 no se observan diferencias significativas al comparar los diferentes NOP, en el predio n° 2 se observa un aumento de la frecuencia de mellizos altamente significativo, en la medida que se incrementa el número ordinal de parto ( $p = 0,0009$ ). Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Nielen *et al.* (1989), en donde el número de lactancia se encontraba altamente relacionado con la presencia de mellizos; a su vez, Wiltbank *et al.* (2000) plantean que el mayor cambio se produce en el segundo parto con respecto al primer parto.

Estos cambios tendrían relación con el nivel productivo que alcanza la hembra en su segundo y tercer parto, pues a mayor número ordinal de parto mayor es la producción de leche. Así, al analizar las producciones de los predios para cada lactancia se observa que en promedio las vacas de primer parto producen 35 lt, mientras que las de segundo y tercer parto producen 41 y 39 lt respectivamente.

### **6.2.3.- Días en leche al momento de la inseminación fértil**

El momento de la lactancia en el cual se inicia la gestación es un factor determinante en la probabilidad de mellizos. Según Silva del Río *et al.* (2009), con cada día en lactancia adicional al momento de la inseminación artificial, se incrementa la probabilidad de

mellizos. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos al analizar los días en leche al momento de la concepción

**Tabla 4.** Diagnósticos de mellizos según los días en leche (DEL) al momento de la concepción.

	<b>DIAGNÓSTICO DE MELLIZOS</b>
<b>DEL</b>	<b>(n) Mellizos</b>
≤ 100	(61/513) 11,9% <sup>a</sup>
100 – 150	(43/245) 17,6% <sup>b</sup>
> 150	(26/260) 10% <sup>a</sup>
<b>TOTAL GENERAL</b>	<b>(130/1018) 12,8%</b>

a,b: porcentajes con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Se observa un aumento significativo en la incidencia de mellizos ocurre durante el segundo periodo de lactancia analizado, lo que coincide con lo mencionado por Silva del Río *et al.* (2009) y Lopez-Gatius *et al.* (2005); sin embargo, este aumento no se aprecia al pasar sobre los 150 DEL. Esto puede asociarse a los cambios metabólicos que ocurren durante las diferentes etapas de la lactancia. Al comienzo de la lactancia, las hembras se encuentran bajo un balance energético negativo en el cual se inhibe el crecimiento folicular, lo que es planteado por Butler (2003). Esto explicaría que, a pesar de la alta producción de leche durante este periodo no se presente la mayor incidencia de mellizos. Posteriormente, junto con recuperarse el balance energético, aumentar notoriamente el consumo de alimento y presentar una alta producción, se aprecia la mayor presentación de gestaciones dobles ( $p = 0,03$ ). Esto coincidiría con lo planteado por Butler (2003) y por Wiltbank *et al.* (2000) en el sentido que el alto consumo de alimentos se asocia con una mayor metabolización hepática de esteroides, la cual sería un mecanismo determinante de la ocurrencia de una doble ovulación. Finalmente se observa que durante el último tercio las gestaciones gemelares vuelven a disminuir (Tabla 4), lo que podría estar asociado a una disminución en la producción láctea durante este periodo de la lactancia.

#### **6.2.4.- Manejos hormonales**

La aplicación de manejos hormonales para la sincronización de celos o sincronización de ovulaciones, fue descrito por Kinsel *et al.* (1998) como un factor de riesgo para una ovulación doble. Al analizar los datos obtenidos en el presente estudio sobre el tipo de inseminación, ya sea en celo detectado o a tiempo fijo, se observó que de las inseminaciones fértiles realizadas en vacas con celo observado un 13,4% (116/863) correspondieron a gestaciones melliceras, mientras que del total de inseminaciones fértiles realizadas a tiempo fijo sólo un 9% (14/155) terminó en una gestación doble ( $p > 0,05$ ). Esto no es consistente con lo informado por Kinsel *et al.* (1998), donde las hembras que recibieron tratamientos con prostaglandinas o GnRH, presentaron hasta 2,2 veces más probabilidades de parir mellizos. Las diferencias pueden deberse a que en el estudio realizado por Kinsel *et al.* (1998) se realizó una diferenciación de animales, en dos grupos: con y sin quistes ováricos previos. De esta forma se observó que la menor incidencia de mellizos se presentó en aquellas vacas que recibieron tratamientos hormonales y que presentaron quistes previos a estos tratamientos. En el presente estudio, la falta de información confiable sobre el diagnóstico de quistes ováricos no permitió realizar la comparación, por lo que no se conoce el grado de ocurrencia de quistes y por lo tanto su efecto sobre la incidencia de una doble ovulación.

#### **6.2.5.- Condición corporal al momento del parto**

Respecto a la relación entre la condición corporal al parto y la incidencia de gestaciones dobles, en la literatura consultada, no se encontraron estudios donde se analice esta relación. Sin embargo, en un estudio realizado por Lopez *et al.* (2005a), se determinó que la mayor pérdida de condición corporal entre el parto y los 60 días en leche se relaciona con un mayor grado de vacas anovulatorias a los 70 días en lactancia; a su vez, aquellas hembras que se recuperan de forma espontánea de la condición anovulatoria presentaron un 46,3% de dobles ovulaciones. La relación entre la condición corporal al parto y la incidencia de gestaciones dobles observada en el presente estudio se muestra en la Tabla 5. Se aprecia que no hay diferencia en la presentación de gestaciones melliceras según la condición corporal al parto ( $p = 0,16$ ). Es probable que esto tenga relación con el momento en el cual se midió la condición corporal, ya que las gestaciones se inician en diferentes momentos de la lactancia en rangos que van entre los 50 e incluso más de 400

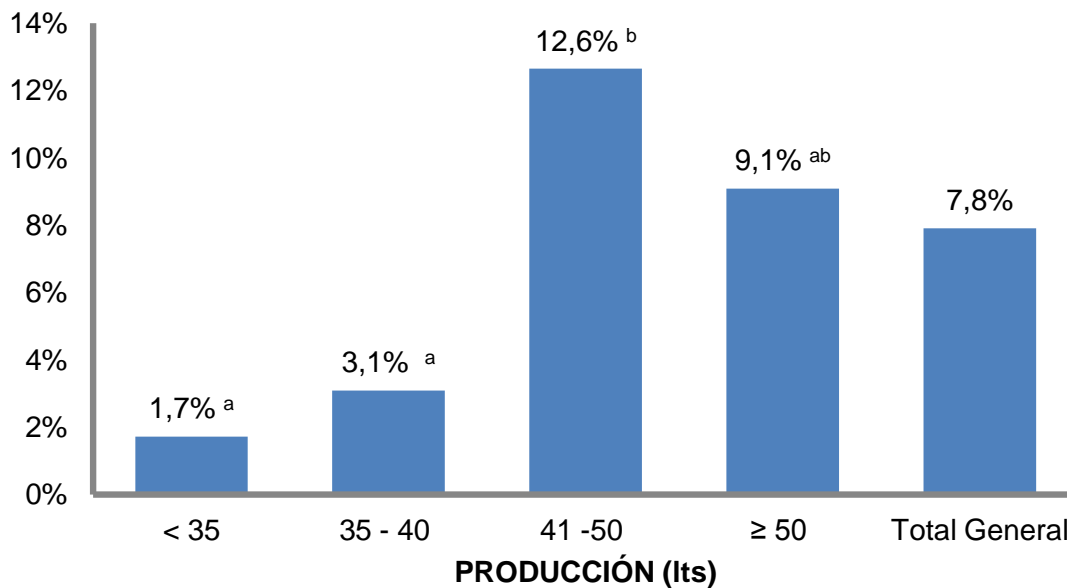
días en leche, por lo que la condición corporal medida cerca de la fecha de parto no tendría relación con un gestación iniciada con posterioridad. Por otro lado, según Lopez-Gatius *et al.* (2003), es el cambio en la condición corporal después del parto, el factor más determinante en el rendimiento posterior de la hembra, no la condición corporal medida en un momento determinado.

**Tabla 5.** Distribución de los diagnósticos de gestación según la condición corporal (BCS) al parto.

BCS	DIAGNÓSTICO GESTACIÓN	
	(n) MELLIZOS	
≤ 3,0	(29/189)	15,3%
3,25	(14/161)	8,7%
> 3,25	(82/624)	13,1%
<b>Total General</b>	(125/974)	<b>12,8%</b>

#### 6.2.6.- Producción de leche

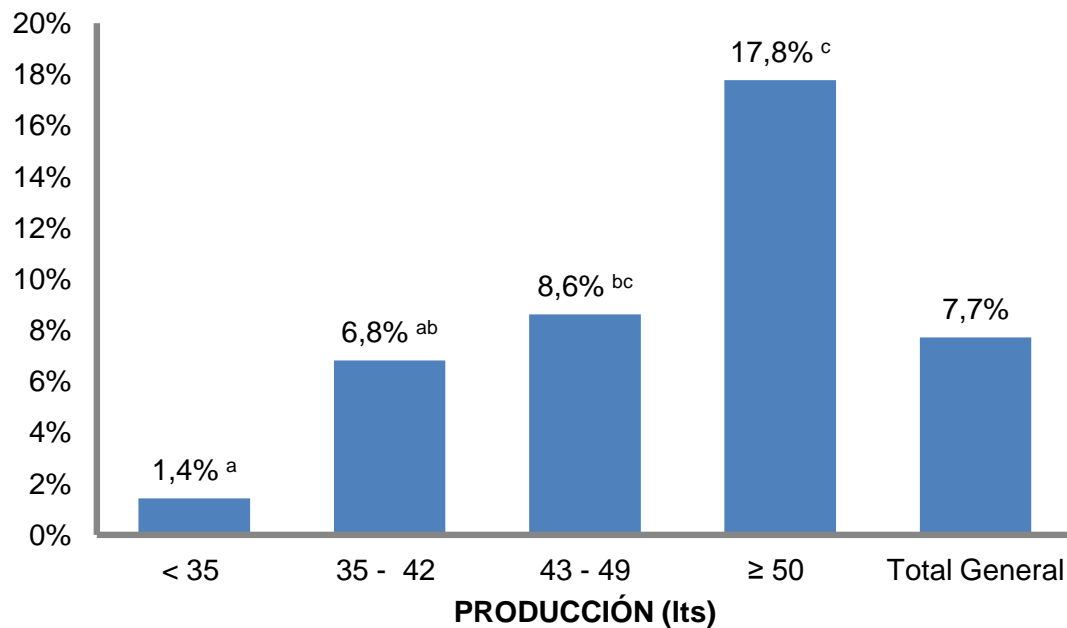
La producción de leche es mencionado por muchos autores como un factor determinante en la presentación de ovulaciones múltiples, sin embargo, en diferentes estudios se han utilizado distintas formas de medir la producción de leche; así, Lopez *et al.* (2005a) utilizaron la producción promedio de los 14 días previos a la fecha de inseminación, Fricke y Wiltbank (1999) midieron la producción láctea de los 2 días previos a la inseminación y Nielen *et al.* (1989) usaron la producción acumulada a los 100 días de lactancia. Frente a esto, en este estudio se consideraron tres mediciones de producción, similares a las ya mencionadas (Figuras 2 y 3, Tabla 6).



**Figura 2.** Distribución de los diagnósticos de mellizos según la producción de leche promedio de los 14 días previos a la fecha de concepción.

a,b,: porcentajes con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Se observa que a medida que aumenta la producción acumulada de los 14 días previos a la concepción, se produce un aumento significativo en la incidencia de mellizos; el mayor cambio ocurre en aquellos grupos en el cual el promedio de producción se encuentra sobre los 40 lt, lo que es consistente con lo reportado por Lopez *et al.* (2005a).



**Figura 3.** Distribución de diagnósticos de mellizos según la producción de leche el día de la inseminación.

a,b,c: porcentajes con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Al analizar cómo se distribuyen los mellizos según la producción láctea el día de la inseminación, se puede observar que a medida que aumenta la producción mayor es la incidencia de mellizos, el mayor aumento se aprecia al superar los 42 lt, manteniendo una tendencia al alza a medida que aumenta la producción.

**Tabla 6.** Distribución de los diagnósticos de gestación según la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia (P100)

	<b>DIAGNOSTICO GESTACIÓN</b>
<b>P100 (lt)</b>	<b>(n) MELLIZOS</b>
< 3000	(5/47) 10,6% <sup>ab</sup>
3000-3999	(21/263) 7,9% <sup>a</sup>
4000-4999	(53/400) 13,3% <sup>ab</sup>
≥5000	(40/220) 18,2% <sup>bc</sup>
<b>Total general</b>	<b>(119/930) 12,8%</b>

a,b,c: porcentajes con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )



Al analizar los diferentes grupos de producción se observa que, a medida que se incrementa el nivel productivo la incidencia de mellizos aumenta ( $p = 0,009$ ), ocurriendo un cambio significativo al comparar el segundo y cuarto grupo de producción ( $p = 0,0007$ ). Esto es consistente con lo planteado por Nielen *et al.* (1989), donde las vacas gestantes de mellizos presentaron mayores producciones acumuladas a los 100 días de lactancia. Sin embargo, según Nielen *et al.* (1989) este efecto se pierde a lo largo de la lactancia, no encontrándose diferencias al comparar las producciones estandarizadas a los 305 días.

Todos los resultados obtenidos con respecto a la producción de leche en los diferentes momentos analizados, concuerdan con los obtenidos por Nielen *et al.* (1989), Fricke y Wiltbank (1999) y Lopez *et al.* (2005), quienes observaron que a medida que la producción de leche aumenta, es mayor la ocurrencia de gestaciones gemelares. En cambio, en un estudio realizado por Lopez-Gatius *et al.* (2005), se determinó que el riesgo de tener ovulaciones múltiples fue menor en vacas de mayor producción. Así, por cada kg de aumento en la producción, el riesgo de mellizos disminuía en 3%.

### 6.3.- Pérdida de gestaciones únicas y melliceras:

Al comparar la pérdida de gestación entre predios, se observa que en el Predio n° 1 se pierde un 5% de las gestaciones, mientras que en el Predio n° 2 se pierde un 9,3% de las gestaciones ( $p = 0,03$ ). En la Tabla 7 se desglosan los resultados analizados por número ordinal de parto y si se trata de gestaciones únicas o dobles.

**Tabla 7.** Pérdida de gestaciones únicas y gemelares según número ordinal de parto (NOP)

NOP	(n) UNICAS	(n) MELLIZOS
1	(15/301) 4,9% <sup>a</sup>	(6/28) 21,4% <sup>bA</sup>
2	(17/226) 7,5%	(2/36) 5,5% <sup>B</sup>
≥3	(26/361) 7,2%	(3/66) 4,5% <sup>B</sup>
<b>Total general</b>	(58/888) 6,5%	(11/130) 8,5%

a,b: porcentajes dentro de filas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

A,B: porcentajes dentro de columnas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

El mayor porcentaje de pérdida se produce en las vacas gestantes de mellizos, pero las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p = 0,39$ ), resultado que no concuerda con lo mencionado por Silva del Río *et al.* (2009) en donde las vacas gestantes de mellizos presentaron de forma significativa, mayores pérdidas que las con gestación única ( $p < 0,01$ ). Al analizar el número de lactancia la diferencia se hace significativa, encontrándose que en vacas de primera lactancia las pérdidas son significativamente mayores en el caso de una gestación doble ( $p = 0,001$ ). Asimismo, dentro de las gestaciones de mellizos se aprecia que las vacas de primera lactancia presentan mayores pérdidas que el resto de los grupos ( $p = 0,02$ ) situación que no se encontró en el caso de gestaciones únicas ( $p = 0,4$ ). Esta diferencia podría estar asociada a que las vacas de primera lactancia corresponden a hembras que aún no han alcanzado su máximo desarrollo; por tanto, son vacas más pequeñas y que poseen una menor capacidad uterina, motivo por el cual no sería posible mantener una gestación doble (Von Vandesplasseche *et al.*, 1979).

Esto no es consistente con lo reportado en un estudio paralelo<sup>1</sup> en el cual se analizan varios factores que estarían afectando la gestación y que por lo tanto derivan en la pérdida de ésta; en dicho estudio, no se diferenció el tipo de gestación en única o mellizos. Así, se determinó que para la variable número ordinal de parto, las vacas de más de un parto poseen 3,74 veces más probabilidades de sufrir de pérdida embrio-fetal que vacas de primer parto.

Por último, no se puede descartar la posible ocurrencia de alguna falla en el diagnóstico de gestación, en donde podrían haber mellizos diagnosticados como únicos y que por lo tanto estarían aumentando el porcentaje de pérdida de las gestaciones clasificadas como únicas.

#### **6.4.- Análisis de datos agrupados:**

Para la realización de la regresión logística se tomaron los datos de cada variable y se analizaron univariadamente con respecto a la variable dependiente (diagnóstico de

---

<sup>1</sup> Páez, Santiago. 2011. Factores que afectan la pérdida embrionaria - fetal (30 – 60 ds) en vacas Holstein en Chile central. Memoria de título. En curso

mellizos) en donde, toma valor 0 la ausencia de mellizos y toma valor 1 la presencia de una gestación doble. Los resultados obtenidos para cada variable son presentados en las Tablas 8 y 9.

**Tabla 8.** Resultado de la regresión logística univariada para cada variable, con respecto a la variable dependiente (diagnóstico de mellizos).

PARÁMETROS	OR	IC 95% LI	IC 95% LS	P
<b>PREDIO</b>				
Predio 1	Ref			
Predio 2	0,48	0,32	0,72	0,0004
<b>BCS<sup>1</sup></b>				
≤ 3,0	Ref			
3,25	0,53	0,27	1,03	0,0621
> 3,25	0,83	0,53	1,32	0,4401
<b>NOP<sup>2</sup></b>				
1	Ref			
2	1,71	1,01	2,89	0,0439
3 y más	1,97	1,23	3,14	0,0046
<b>DEL<sup>3</sup></b>				
<100	Ref			
100 – 150	1,58	1,03	2,41	0,0352
> 150	0,82	0,51	1,34	0,4325

1: Condición corporal al momento del parto (BCS)

2: Número ordinal de parto (NOP)

3: Días en lactancia al momento de la concepción (DEL)

La variable predio constituye un factor relevante para la concepción de mellizos, ya que en el predio n° 2 la probabilidad de ocurrencia de gestaciones gemelares es un 48% de la observada en el predio n° 1. Esto puede deberse a las diferencias existentes en el manejo específico de cada rebaño como son: intensidad de manejos hormonales, alimentación, utilización de somatotrofina bovina (bST) la cual produce un aumento en el consumo de alimento y por lo tanto un aumento en la producción de leche (Bauman *et al.*, 1999).

En el presente estudio se observó que el predio que utiliza de forma rutinaria la bST, presentó menor incidencia de gestaciones gemelares, lo que no concuerda con lo esperado, sin embargo debido a la falta de información confiable con respecto a la aplicación de bST durante el periodo de estudio no fue posible determinar el efecto de su utilización sobre la ocurrencia de una ovulación múltiple.

La condición corporal al parto no se presenta como un factor de riesgo, pues los animales con condiciones corporales más altas presentaron una fuerte tendencia ( $p = 0,06$ ) a tener menores probabilidades de gestar mellizos, situación que podría tener relación con una escasa relación entre la condición corporal al momento del parto y una gestación doble iniciada con posterioridad.

El número ordinal de parto (NOP) se muestra como el primer factor de riesgo para una gestación doble, observándose que a medida que aumenta el número de lactancia mayor es la probabilidad de mellizos, de esta forma al comparar vacas de primer parto con vacas de dos y de tres o más partos la razón de riesgo (OR) fue de 1,71 para las hembras de segundo parto mientras que para el grupo de tercer y más partos fue de 1,97, esto quiere decir que las hembras segundo y de tercer o más partos presentan más probabilidades de quedar gestantes de mellizos que las hembras de primer parto. Esto es consistente con lo reportado por autores como Nielen *et al.* (1989), Fricke y Wiltbank, (1999), Wiltbank *et al.* (2000) y Lopez-Gatius *et al.* (2005); donde se encontró que el número de lactancia es uno de los factores epidemiológicos críticos, asociados con una doble ovulación.

En el caso de los días en leche (DEL) al momento de la concepción se observó que el mayor determinante sobre la ocurrencia de mellizos fue el periodo entre los 100 y 150 días en leche, donde se aprecia que al quedar gestante en este periodo las probabilidades de concebir mellizos aumentan en un 58% comparado con hembras que iniciaron la gestación antes de los 100 días de lactancia, mientras que comenzar una gestación posterior a los 150 días reduce el riesgo en un 18%. Esto es consistente con lo reportado por Lopez-Gatius *et al.* (2005) en donde durante los periodos de lactancia temprana (< 100 días) y tardía (> 150 días) el riesgo de una ovulación doble se reduce en un 50% y 20% respectivamente; así también en otro estudio realizado por Silva del Río *et al.* (2009), se reportó que la probabilidad de gestar mellizos se incrementa con cada día adicional al momento de la concepción.

**Tabla 9.** Resultado de la regresión logística univariada para las variables de producción, con respecto a la variable dependiente (diagnóstico de mellizos).

PARÁMETROS	OR	IC 95% LI	IC 95% LS	P
<b>P100<sup>1</sup></b>				
< 3000	REF			
3000-3999	0,73	0,26	2,04	0,547
4000-4999	1,28	0,49	3,39	0,615
≥5000	1,87	0,69	5,02	0,2159
<b>P14<sup>2</sup></b>				
< 35	REF			
36-40	1,82	0,18	17,91	0,6081
41-50	8,26	1,08	62,82	0,0415
≥ 50	5,7	0,57	57,19	0,1391
<b>PIA<sup>3</sup></b>				
< 35	REF			
35-42	5,05	0,63	40,69	0,1283
43-49	6,57	0,82	52,49	0,0758
≥50	14,92	1,8	123,91	0,0123

1: Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia, en litros (P100)

2: Producción de leche promedio de los 14 días previos a la concepción, en litros (P14)

3: Producción de leche el día de la inseminación fértil, en litros (PIA)

La producción de leche acumulada a los 100 días (P100) de lactancia no presentó efecto sobre la ocurrencia de gestaciones melliceras ( $p > 0,05$ ). Esto no es consistente con lo reportado por Nielen *et al.* (1989) en donde se describe una asociación directa entre la producción de leche acumulada a 100 días de lactancia y la gestación de mellizos.

La producción de leche promedio de los 14 días previos a la fecha de concepción (P14) presentó una influencia significativa sobre la variable dependiente, encontrándose que a medida que la producción se ubica sobre los 40 litros (41-50 lt) las probabilidades aumentaron en 8,26 veces ( $p = 0,041$ ). El superar los 50 lt de producción mantiene la tendencia, aumentando en 5,7 veces la probabilidad de gestar mellizos, esto es similar a lo presentado por Lopez *et al.* (2005a) en donde las vacas con producciones sobre los 45

lt presentaron 3 veces más ovulaciones dobles que aquellas que produjeron entre 35 y 40 lt.

La producción láctea el día de la inseminación (PIA) se muestra como el factor más influyente sobre la ocurrencia de una gestación doble. Se observa un notorio efecto del aumento de la producción de leche sobre la variable dependiente, así, comparando el grupo de menor producción (< 35 lt) con cada intervalo superior de producción hay un aumento del riesgo de concebir mellizos. Tendencia que ya se nota en el grupo con producciones entre los 43 y 49 lt (OR = 6,57). El mayor aumento se produce con valores sobre los 50 lt en que el riesgo es 14,9 veces mayor ( $p = 0,01$ ) que el grupo de menor producción. Esta relación concuerda con lo descrito por Fricke y Wiltbank (1999) en donde determinaron que el grupo de mayor producción (> 40 lt) presentaba 3 veces más probabilidades de tener una ovulación múltiple al compararlo con el grupo de menor producción.

#### **6.5.- Modelo final:**

Finalmente, en base a los datos obtenidos del análisis univariado se construyó el modelo final para la regresión logística multivariada, considerando como variables explicadoras: producción de leche el día de la inseminación, número ordinal de parto y días en leche al momento de la concepción, los resultados se presentan en la Tabla 10.

En este modelo integrado, donde el efecto de un factor es corregido o ajustado por los otros factores se determinó que: el número ordinal de parto es un factor influyente especialmente para las hembras de tres y más partos, las que presentan 5 veces más probabilidades de gestar mellizos que las hembras de primer parto. Por otro lado el parámetro días en leche deja de constituir un factor de riesgo, esto puede deberse a la existencia de colinearidad (e.g: momento de la gestación y desarrollo fetal) con alguno de los factores analizados. La producción de leche al momento de la inseminación se muestra como el principal factor determinante de una concepción mellicera, presentándose tendencias a que el aumento de la producción incrementa el riesgo, lo que se hace significativo al superar los 50 lt de producción.

**Tabla 10.** Resultados de la regresión logística multivariada para las variables significativas obtenidas del análisis univariado, con respecto a la variable dependiente (diagnóstico de mellizos).

PARÁMETROS	OR	IC 95% LI	IC 95% LS	P
<b>PIA<sup>1</sup></b>				
< 35	REF			
35-42	6,53	0,79	54,04	0,0818
43-49	6,77	0,8	56,92	0,0784
≥50	14,81	1,64	134,03	0,0165
<b>NOP<sup>2</sup></b>				
1	REF			
2	1,94	0,43	8,83	0,3912
3 y más	5,06	1,37	18,72	0,0151
<b>DEL<sup>3</sup></b>				
< 100	REF			
100 – 150	1,79	0,66	4,9	0,256
> 150	2,22	0,81	6,1	0,1208

1: Producción de leche el día de la inseminación fértil, en litros (PIA)

2: Número ordinal de parto (NOP)

3: Días en lactancia al momento de la concepción (DEL)

La pérdida del efecto de los días en lactancia al momento de iniciar la gestación sobre la ocurrencia de mellizos, puede explicarse debido a la existencia de una estrecha relación entre los días en lactancia y la producción (Anexo n °1) de esta forma, cuando se realizó el análisis de cada variable de forma independiente se habría generado confusión entre el efecto de los DEL con el efecto del nivel de producción. Al analizar las variables ajustadas por el resto de los factores esta confusión desaparece quedando que el efecto de la producción al momento de la inseminación es el principal factor de riesgo para una gestación mellicera.

## VII.- IMPLICANCIAS

Debido al aumento constante en los niveles de producción láctea en lecherías de alta producción y manejo intensivo, como las de la zona central de Chile, debería esperarse que la incidencia de gestaciones gemelares se mantenga o aumente, pues, como se mencionó con anterioridad, el principal factor de riesgo para la concepción de mellizos es la producción de leche al momento de la inseminación. Adicionalmente, el número ordinal del parto es otro importante factor de riesgo para la concepción de mellizos, encontrándose el mayor riesgo en vacas de 3 y más partos, que son las de mayor producción. Por esto, se hace difícil tratar de disminuir la incidencia gestaciones gemelares manejando estos factores, ya que justamente son los que se relacionan con altas producciones y buena eficiencia productiva y económica en este tipo de sistemas.

Por esta razón, y conociendo los efectos de los partos melliceros sobre el rendimiento posterior, se hace más factible y realista el tratar de identificar a las vacas que gestan mellizos y manejarlas apropiadamente. En este sentido, frente al diagnóstico de mellizos pueden establecerse dos opciones: interrumpir la gestación (manual o con manejos hormonales) o permitir que la gestación continúe y establecer un manejo diferencial para estas hembras durante el secado, parto y parto. En relación a la primera opción, Andreu-Vázquez *et al.* (2011) señalan que la pérdida de gestaciones fue similar para aquellas hembras sometidas a la reducción manual y para las hembras que no fueron intervenidas. Sin embargo esto sólo fue así en el caso de la reducción de gestaciones de mellizos ubicados en diferentes cuernos uterinos, el riesgo de pérdida completa de la gestación es 8 veces mayor para gestaciones de mellizos en el mismo cuerno uterino.

Considerando la mayor pérdida en caso de gestaciones dobles, se hace recomendable realizar un segundo diagnóstico de la gestación, alrededor del día 45 a 60 para confirmar la continuación de la preñez, pero además para determinar el número de fetos presentes, ya que en gestaciones es posible que ocurra la pérdida de un solo feto. Finalmente, se hace conveniente que se hagan protocolos diferenciales para el periodo de transición parto, atención al parto y de manejo post parto.



## VIII.- CONCLUSIONES

- No existe relación entre la condición corporal al parto y la ocurrencia de una gestación mellicera, esto asociado al lapsus de tiempo que transcurre desde el parto hasta el momento de la concepción
- La utilización de protocolos de sincronización no presentó relación con la ocurrencia de una gestación doble.
- Los días en leche al momento de la inseminación no corresponde a un factor de riesgo para la concepción de mellizos, sin embargo al analizarlo aisladamente se observa una tendencia al incremento de las gestaciones dobles durante la lactancia media (100-150 días)
- El número ordinal de parto es un factor de riesgo importante para la concepción de mellizos, estando más propensas las vacas de 3 y más partos.
- De los tres parámetros de producción analizados, la producción el día de la inseminación es el único factor de riesgo para una gestación doble.
- Sin ser significativamente diferente, la pérdida de gestaciones únicas y melliceras fue mayor en el caso de gestaciones melliceras. Sin embargo existen diferencias significativas entre la pérdida de gestaciones únicas y melliceras, en vacas de primer parto.

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

- **ADAMS, G.P; JAISWAL, R; SINGH, J; MALHI, P.** 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72 – 80.
- **ANDREU-VÁZQUEZ, C; GARCIA-ISPIERTO, I; LÓPEZ-BEJAR, M; DE SOUSA, N.M; BECKERS, J; LÓPEZ-GATIUS, F.** 2011. Clinical implications of induced twin reduction in dairy cattle. *Theriogenology* 76: 512 - 521.
- **BAUMAN, D.E; EVERETT, R.W; WEILAND, W.H; COLLIER, R.J.** 1999. Production responses to bovine somatotropin in Northeast (USA) dairy herds. *Journal of Dairy Science* 82: 2564 -2573.
- **BEEREPoot, G.M.M; DYKHUIZEN, A; NIELEN, M; SCHUKKEN, H.** 1992. The economics of naturally occurring twinning in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 75: 1044-1051.
- **BELL, M; ROBERTS, D.** 2007. Effect of twinning on the feed intake, performance and health of dairy cows. *Livestock Science* 107: 274-281.
- **BUTLER, W.** 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* 83: 211 – 218.
- **CAMARGO, E; PÁEZ, E.** 2009. Freemartinismo o quimerismo XX/XY en bovinos: Revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*: 7-12.
- **DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W.** InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 336 p.
- **ECHTERNKAMP, S.E; GREGORY, K.E; DICKERSON, G.E; CUNDIFF, L; KOCH, R; VAN VLECK, L.** 1990. Twinning in cattle: II.-Genetic and environmental effects on ovulation rate in puberal heifers and postpartum cows and the effect of ovulation rate on embryonic survival. *Journal of Animal Science* 68: 1877-1888.
- **FRICKE, P; WILTBANK, M.** 1999. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 52: 1133-1143.

- **GINTHER, O; BEG, M; DONADEU, F; BERGFELT, D.** 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 78: 239 – 257.
- **GREGORY, K.E; ECHTERNKAMP, S.E; CUNDIFF, L.V.** 1996. Effects of twinning on dystocia, calf survival, calf growth, carcass traits, and cow productivity. *Journal of Animal Science* 74: 1223-1233.
- **JAINUDEEN, M; HAFEZ, E.** 2002. Bovinos y Búfalos In: Hafez, E (Ed). *Reproducción e Inseminación artificial en animales*. 7° ed. Mc Graw Hill. DF, Mexico. p. 163 - 176.
- **KINSEL, M; MARSH, W; RUEGG, P; ETHERINGTON, W.** 1998. Risk factors for twinning in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81: 989-993.
- **LOPEZ, H; SATTER, L; WILTBANK, M.C.** 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81: 209 – 223.
- **LOPEZ, H; CARAVIELLO, D; SATTER, L; FRICKE, P; WILTBANK, M.** 2005a. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 2783 - 2793.
- **LOPEZ, H; SARTORI, R; WILTBANK, M.C.** 2005b. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 72: 788 – 795.
- **LOPEZ-GATIUS, F; YÁNIZ, J; MADRILES-HELM, D.** 2003. Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta-analysis. *Theriogenology* 59: 801 – 812.
- **LOPEZ-GATIUS, F; SANTOLARIA, P; YÁNIZ, J; GARBAYO, J; HUNTER, R.** 2004. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 39: 429 – 433.
- **LOPEZ-GATIUS, F; HUNTER, R.** 2005. Spontaneous reduction of advanced twin embryos: its occurrence and clinical relevance in dairy cattle. *Theriogenology* 63: 118 - 125.

- **LOPEZ-GATIUS, F; LÓPEZ-BEJÁR, M; FENECH, M; HUNTER, R.** 2005. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology* 63: 1298 -1307.
- **MIHM, M; CROWE, M; KNIGHT, P; AUSTIN, E.** 2002. Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 191 – 200.
- **NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).** 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 7<sup>TH</sup> revised edition. National Academy Press. 408 p.
- **NIELEN, M; SCHUKKEN, Y; SCHOLL, D; WILBRINK, H; BRAND, A.** 1989. Twinning in dairy cattle: a study of risk factors and effects. *Theriogenology* 32: 845 - 862.
- **SANGRISTAVONG, S; COMB, D; SARTORI, R; ARMENTANO, L; WILTBANBK, M.C.** 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85: 2831 – 2842.
- **SILVA DEL RÍO, N; KIRKPATRICK, B; FRICKE, P.** 2006. Observed frequency of monozygotic twinning in Holstein dairy cattle. *Theriogenology* 66: 1292-1299.
- **SILVA DEL RÍO, N; COLLOTON, J; FRICKE, P.** 2009. Factors affecting pregnancy loss for single and twin pregnancies in a high-producing dairy herd. *Theriogenology* 71: 1462-1471.
- **VON VANDEPLASSCHE, M; BUTAYE, R; BOUTERS, R.** 1979. The twin capacity of the uterus in heifers and cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 86: 470 - 473.
- **WILTBANK, M; FRICKE, P; SANGRISTAVONG, S; SARTORI, R; GINTHER, O.** 2000. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 2998 – 3007.
- **WILTBANK, M; LÓPEZ, H; SARTORI, R; SANGSRITAVONG, S; GÜMEN, A.** 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65: 17-29.

- **WILTBAKN, M; SARTORI, R; HERLIHY, M; VASCONCESLOS, J; NASCIMENTO, A; SOUZA, A; AYRES, H; CUNHA, A; KESKIN, A; GUENTHER, J; GUMEN, A.** 2011. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 76: 1568 – 1582.

## ANEXO

**Anexo 1:** Curva de lactancia, obtenida de uno de los predios en estudio. Se muestra la relación entre los días en lactancia con el nivel de producción.

