



Inducción de la lactancia en ganado Holstein con dosis reducidas de benzoato de estradiol y sin suplementar progesterona exógena



Juan González-Maldonado ^{a*}

Raymundo Rangel-Santos ^a

Gustavo Ramírez-Valverde ^b

Jaime Gallegos-Sánchez ^c

Lorenzo Beunabad-Carrasco ^d

Javier-Antillón Ruiz ^d

^a Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Carretera México- Texcoco. 56230. Chapingo, Estado de México. México.

^b Colegio de Postgraduados. Departamento de Estadística, Estado de México, México.

^c Colegio de Postgraduados. Departamento de Ganadería, Estado de México, México.

^d Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, México.

*Autor de correspondencia: jugomauabc@gmail.com

Resumen:

La inducción de la lactancia en el ganado es una forma alternativa de aumentar la vida productiva de las vacas con problemas reproductivos y productivos que, de lo contrario, serían sacrificadas. Se propone un protocolo alternativo de inducción de la lactancia. En este protocolo de 21 días se aprovecha la producción de progesterona endógena y utiliza dosis bajas de estradiol para estimular el crecimiento y la función de la ubre. Se inyectaron 500 mg de somatotropina en los días uno, ocho, catorce y veintiuno a vacas (n= 5) y vaquillas (n= 4)

Holstein. Se aplicó el benzoato de estradiol ($3-10 \text{ mg día}^{-1}$) desde el día uno hasta el día catorce. A los animales se les administró cloprostenol ($500 \mu\text{g}$) en la mañana y en la tarde del día 1, y del día 18 al 21 se les inyectó dexametasona (5 mg día^{-1}). Se ordeñaron a las vacas y vaquillas por primera vez el día 22. No se administró progesterona exógena en ningún momento del experimento, pero el protocolo de lactancia comenzó en la fase diestro del ciclo de celo y se inyectó GnRH para inducir la formación de un cuerpo lúteo accesorio. La inducción de la lactancia fue exitosa en todos los animales y la producción de leche varió de 18.3 a 25.5 kg día^{-1} . La producción endógena de progesterona en combinación con dosis reducidas de benzoato de estradiol es suficiente para inducir la lactancia en vacas Holstein.

Palabras clave: Bovinos, Esperanza de vida, Hormonas, Leche.

Recibido: 02/10/2020

Aceptado: 06/08/2021

En vacas que fallan en comenzar una nueva lactación después de un periodo seco se puede administrar hormonas exógenas para lograr la inducción artificial de la lactancia⁽¹⁾. Todavía existen puntos de vista encontrados sobre la inducción artificial de la lactancia en vacas secas para que vuelvan a producir leche. Por un lado, se debe de considerar que con frecuencia las vacas en las cuales se ha inducido la lactancia suelen padecer trastornos reproductivos causados por las múltiples hormonas requeridas para estimular el crecimiento de la ubre y su funcionamiento⁽²⁾. Por otro lado, inducir la lactancia en una vaca la provee de una oportunidad de seguir produciendo por más tiempo de lo esperado y así evitar el sacrificio⁽³⁾.

A las vacas se les da como suplementos tanto la progesterona como el estradiol para estimular el crecimiento de los alveolos y los ductos de la ubre⁽⁴⁾. Se administra la progesterona a las vacas por medio de las inyecciones y dispositivos intravaginales. Una alternativa para aumentar las concentraciones de progesterona en las vacas es la formación de un cuerpo lúteo accesorio⁽⁵⁾. En teoría, la progesterona endógena adicional producida por un cuerpo lúteo accesorio debería ser lo suficiente para mantener el desarrollo de la ubre durante la inducción de la lactancia⁽⁶⁾. No se encontraron datos sobre la dosis específica del estradiol requerida para inducir la lactancia. El objetivo del presente estudio es probar la hipótesis de que es posible inducir la lactancia en vacas por medio de dosis reducidas del estradiol y sin administrar la progesterona suplementaria.

Se llevó a cabo el estudio en dos fases. La primera fue una prueba piloto para recopilar información sobre la eficacia del protocolo para inducir la lactancia. En esta fase se usaron dos vacas Holstein de 6 a 7 años de edad con al menos dos partos y un año sin ordeño. Ambas experimentaron falla reproductiva a causa de abortos recurrentes, pero no las sacrificaron

debido a su alto valor genético. Para la inducción de la lactancia en éstas se realizó una modificación de métodos descritos anteriormente^(7,8).

Se sincronizaron los ciclos reproductivos de las dos vacas mediante dos inyecciones de 500 µg de cloprostenol (Celosil[®], MSD Animal Health) administradas a intervalos de 14 días. Después de la segunda inyección, se monitorearon las vacas cada 6 h mediante observación visual para detectar el celo. Se declararon en celo cuando aceptaban la monta por otra vaca. Cinco días después de detectar el celo, se escanearon los ovarios de las vacas por medio de la ultrasonografía (Aloka Prosund 2, transductor de 7,5 MHz, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Japón). Una vez confirmado la presencia de un cuerpo lúteo, se buscó la ubicación del folículo más grande y se administró a las vacas una inyección de 250 µg de acetato de gonadorelina (GnRH[®], Sanfer). Se escanearon los ovarios cada 12 h después de la inyección hasta registrar la desaparición del folículo identificado previamente. Una vez que el folículo más grande había desaparecido (dentro de las 48 h posteriores a la inyección de GnRH), se supuso la formación de un cuerpo lúteo accesorio⁽⁹⁾, y se inició el protocolo de la lactancia.

Para inducir la lactancia se utilizó somatotropina bovina recombinante (Lactotropina[®], Elanco), benzoato de estradiol (Benzoato de estradiol[®], Syntex), cloprostenol y dexametasona (Lapicor[®], Lapisa). En este protocolo de 21 días, se inyectaron las vacas con 500 mg de somatotropina en los días 1, 8, 14 y 21. Se aplicó el benzoato de estradiol (7.5 mg día⁻¹) desde el día 1 hasta al día 14. Se masajeó la ubre de cada animal por períodos de uno a dos minutos en la mañana y la tarde desde el día 16 hasta el 20. El cloprostenol (500 µg) se administró a las dos vacas en la mañana y la tarde del día 18. La dexametasona (5 mg día⁻¹) se inyectó desde el día 18 hasta el día 21. Las vacas se ordeñaron por la primera vez el día 22. Después del primer ordeño, se administró dosis adicionales de la somatotropina cada 14 días.

En la fase II los animales experimentales eran tres vacas y cuatro vaquillas. Las vacas habían tenido al menos dos partos y un año sin ordeño, pero no las sacrificaron por su alto valor genético. Las vaquillas fueron inseminadas al menos cinco veces sin tener una gestación exitosa. La causa común de la falla reproductiva en las vacas fueron los abortos recurrentes, mientras que en las vaquillas se observó un cuello uterino cerrado que impidió la entrada de semen al útero, además de infecciones uterinas persistentes.

El manejo reproductivo de los animales fue el mismo que en la fase I. Se aplicó el mismo protocolo utilizado para inducir la lactancia en la fase I, pero en la fase II se usaron diferentes dosis de benzoato de estradiol. Se asignaron los animales a uno de cuatro grupos diferentes (GI-GIV). El grupo GI consistió en una vaquilla de 2 años (671 kg) a la cual se le inyectó 3 mg día⁻¹ de benzoato de estradiol. El grupo GII consistió en una vaquilla de 4 años (651 kg) y una vaca de 8 años (580 kg) a las cuales se les administraron 5 mg día⁻¹ de benzoato de estradiol. El grupo GIII consistió en una vaquilla de 4 años (737 kg) y una vaca de 8 años

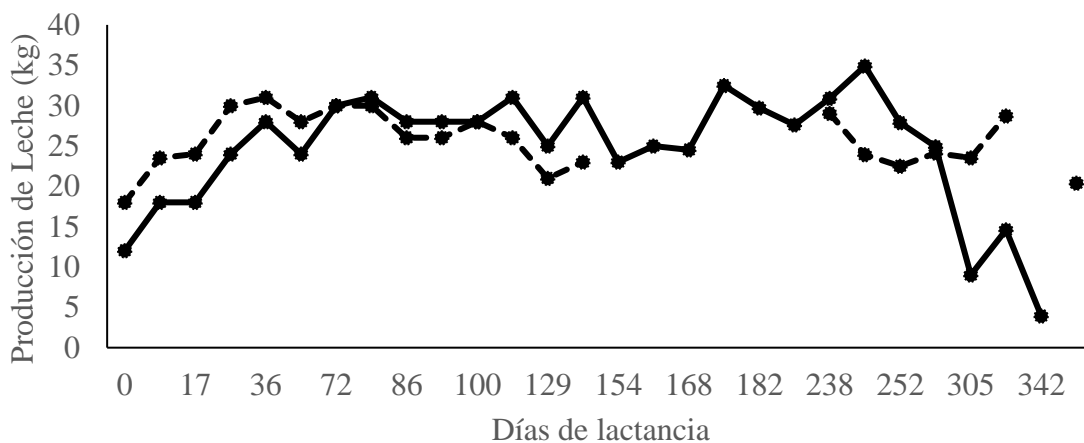
(844 kg) a las cuales se les administraron 7.5 mg día^{-1} de benzoato de estradiol. El grupo GIV consistió en una vaquilla de 3 años (753 kg) y una vaca de 8 años (691 kg) a las cuales se les inyectó 10 mg día^{-1} de benzoato de estradiol.

Antes del primer ordeño, se alimentó a los animales en las fases I y II con ensilaje de maíz *ad libitum* y 4 kg de concentrado comercial al día (Ganadero 18, Productos Agropecuarios Tepexpan, S.A. de C.V.; proteína 18%, grasa 4%, fibra 12%). Después del primer ordeño, las vacas y las vaquillas se ubicaron en el mismo corral y se alimentaron con una ración mixta durante todo el período experimental (21.9 kg de alfalfa fresca, 21.9 kg de ensilaje de maíz y 7.7 kg del concentrado comercial, una vez al día para cada animal).

La variable respuesta a medir fue la producción diaria de leche, la cual se midió una vez por semana desde el día 1 hasta el día 328 de ordeño. Sin embargo, para la vaquilla en el GI las mediciones terminaron a los 221 días en leche debido a su baja producción de leche.

La fase I fue una prueba piloto y no se incluyeron los datos generados en ella en el análisis estadístico. No obstante, en el apartado de resultados se muestra un análisis descriptivo de los datos de esta fase. El diseño experimental fue de medidas repetidas en un arreglo de bloques completos al azar, suponiendo una estructura auto-regresiva de primer orden entre los tiempos para la matriz de varianza-covarianza. Solo se utilizaron dos bloques: uno compuesta por las vaquillas (nunca paridas) y el otro por las vacas con más de dos partos. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico Infostat (2018). En la fase I se indujo la lactancia en las dos vacas, resultando en una producción de leche promedio de cada vaca de 25.5 ± 1.33 y $24.6 \pm 1.18 \text{ kg día}^{-1}$. El patrón de producción de leche a lo largo de la lactancia para ambas vacas de la fase I se muestra en la Figura 1.

Figura 1: Producción de leche en vacas Holstein inducidas a la lactancia sin suplementación de progesterona exógena



Vaca 1 (línea sólida) y vaca 2 (línea intermitente)

En la fase II, la producción de leche promedio fue de $20.06 \pm 0.73 \text{ kg día}^{-1}$ en el GII, $19.54 \pm 0.71 \text{ kg día}^{-1}$ en el GIII y $18.36 \pm 0.72 \text{ kg día}^{-1}$ en el GIV. La producción de la leche de la vaca y la vaquilla en el GIV fue más baja ($P \leq 0.05$) que la de las vacas y las vaquillas en los grupos GII y GIII, y entre estas últimos no hubo diferencia ($P > 0.05$) (Figura 2). La producción de leche de la vaquilla en el GI no fue comparada con el resto de los grupos experimentales, debido a la falta de repeticiones, pero su producción se muestra en la Figura 3.

Figura 2: Producción de leche en vacas y vaquillas Holstein inducidas a la lactancia sin suplementación de progesterona exógena e inyectadas con diferentes dosis de benzoato de estradiol (línea negra: 5 mg; línea gris: 7.5 mg; línea punteada: 10 mg día^{-1}) durante 14 días

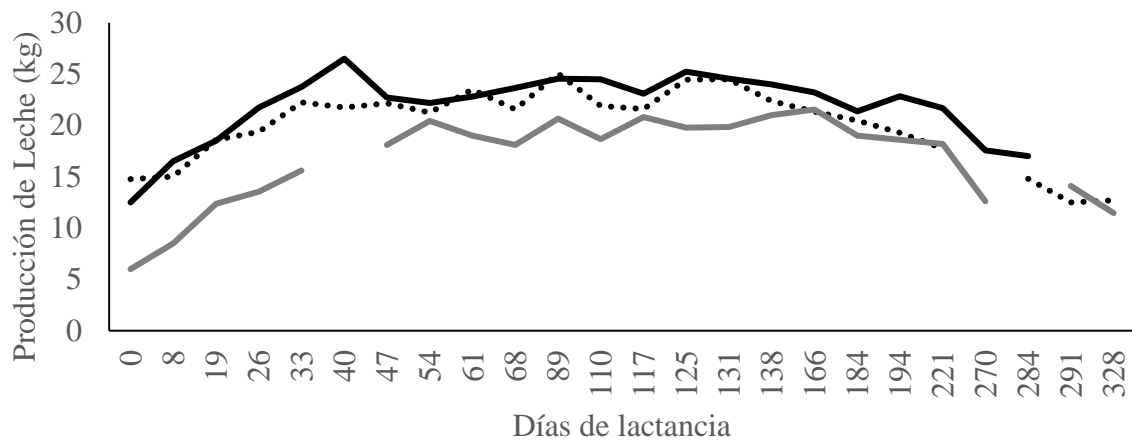
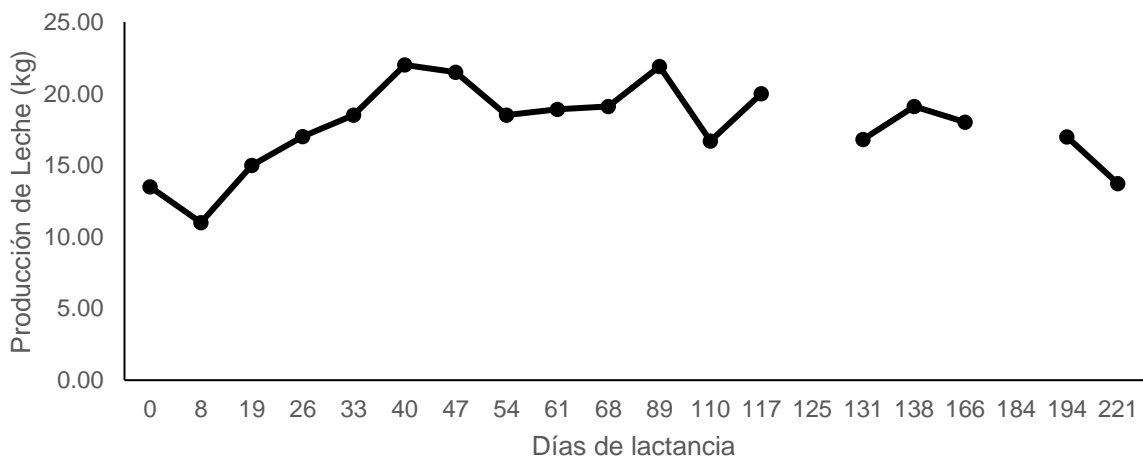


Figura 3: Producción de leche en una vaquilla Holstein inducida a la lactancia sin suplementación de progesterona exógena e inyectada con 3 mg día^{-1} de benzoato de estradiol durante 14 días



En el presente estudio se propuso una modificación de los métodos de inducción de la lactancia descritos previamente^(7,8). Las principales modificaciones son la ausencia de la aplicación de la progesterona exógena y la utilización de dosis más bajas de benzoato de estradiol y glucocorticoides. Además, las hormonas (estradiol y glucocorticoides) se recetaron por día y no por peso vivo del animal.

Los resultados muestran que la inducción de la lactancia se puede lograr sin suplementación con progesterona exógena y aplicando dosis reducidas de benzoato de estradiol. Los folículos ováricos y el cuerpo lúteo son las principales fuentes de estradiol y progesterona en el ganado no gestante. Por lo tanto, la manipulación de la producción endógena de estas hormonas para favorecer el desarrollo de la ubre, durante la inducción de la lactancia es un método prometedor. Lo anterior concuerda con un estudio que reporta una producción de leche mayor en vaquillas inducidas a la lactancia, después de un celo sincronizado, que en vaquillas inducidas a la lactancia en días aleatorios del ciclo de celo⁽¹⁰⁾. Probablemente la diferencia es debido a un efecto sinérgico entre las hormonas inyectadas y las hormonas esteroidales producidas de forma natural por los nuevos folículos y el cuerpo lúteo, después de la sincronización del celo.

Las inyecciones de estradiol y progesterona son necesarias para inducir la lactancia en bovinos⁽¹¹⁾. Por ejemplo, en un estudio se indujo la lactancia de manera exitosa en vaquillas usando solo benzoato de estradiol, pero con resultados no deseados en vacas⁽¹²⁾. En este estudio, la producción de leche promedio fue baja (3.4 a 9.6 L día⁻¹), independientemente de si se inyectó benzoato de estradiol solo o en combinación con progesterona. Se puede explicar estos bajos niveles de producción posiblemente por la falta de somatotropina bovina en el protocolo de inducción de la lactancia. Estudios previos han reportado niveles de producción de leche en vacas (18.9-28.4 kg día⁻¹) parecidos a los encontrados en el presente estudio, pero en estos estudios se inyectaron a las vacas con progesterona y aplicaron dosis más altas de benzoato de estradiol^(7,8). Los resultados del presente estudio parecen indicar que la progesterona endógena es suficiente como para estimular el desarrollo de la ubre y la producción de leche.

La inducción de la lactancia en los bovinos se hace por medio del benzoato de estradiol, y la dosis se calcula de acuerdo al peso vivo del animal⁽¹³⁾ o por día⁽¹⁴⁾, como en el presente estudio. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que consideren los niveles adecuados de benzoato de estradiol para estimular el crecimiento de la ubre y la producción de leche. En el presente estudio, los cuatro niveles de estradiol probados (3, 5, 7.5 y 10 mg día⁻¹) fueron eficaces en inducir la lactancia tanto en vacas como en vaquillas. Estos resultados contrastan con los de un estudio, en el cual se indujo la lactancia en bovinos mediante una inyección de 2.4 y 3.3 mg día⁻¹ de benzoato de estradiol (lo cual es similar a la dosis más baja utilizada en el presente estudio), pero bajo estas condiciones la producción de leche fue más baja (<7 L día⁻¹) que la producción observada en el presente estudio^(15,16). Las diferencias en la

producción de leche entre tal estudio y el presente podrían radicar en el uso de somatotropina bovina en el presente estudio.

La inyección de estradiol puede generar el desarrollo de quistes foliculares⁽¹⁷⁾, los cuales causan un comportamiento de celo indeseable y recurrente en el ganado. Este tipo de comportamiento se ha reportado en el ganado inducido a la lactancia^(15,18). Los animales que se utilizaron en el presente estudio solo mostraron un comportamiento de celo permanente una vez, durante la ejecución del protocolo de inducción a la lactancia. Sin embargo, una vez terminado el protocolo no se observó este comportamiento de forma anormal y recurrente. Por lo tanto, se puede suponer que el comportamiento reproductivo no se vio alterado por la aplicación del protocolo de inducción de la lactancia propuesto.

La gran oferta de vaquillas hoy en día facilita la decisión de sacrificar vacas con problemas productivos o reproductivos, y hace parecer innecesaria la implementación de protocolos de lactancia inducida en las granjas lecheras. Sin embargo, la decisión más fácil puede no ser la más adecuada. Los motivos para sacrificar a vacas se pueden relacionar con la reducción del bienestar animal, lo que hace al hombre el principal responsable de acortar la vida productiva de las vacas en las granjas lecheras⁽³⁾. La lactancia inducida de manera artificial provee una oportunidad de mejorar el manejo general de los hatos lecheros y alcanzar una mayor vida productiva para las vacas. Sin embargo, las trazas de hormonas en la leche de vacas inducidas a lactancia son una preocupación para la salud humana⁽¹⁹⁾. En las vacas inducidas la lactancia, las concentraciones de estradiol vuelven a niveles basales 8 días después de la última inyección. Además, no se han encontrado diferencias en las concentraciones de estradiol en sangre entre vaquillas lactantes, 17 días después del parto, y vaquillas inducidas a lactancia^(20,21). Desde luego, después de un período de 8 a 17 días, la leche de vacas inducidas a la lactancia puede usarse para alimentar humanos o terneros.

Otra ventaja del presente protocolo es el menor gasto requerido para comprar las hormonas. La falta de inyecciones de progesterona exógena y las dosis reducidas de benzoato de estradiol utilizadas en el protocolo lo hacen más asequible, y favorece en particular a los pequeños productores, a quienes les puede resultar difícil o demasiado costoso criar o comprar una vaquilla de reemplazo.

La desaparición del folículo más grande el día 5 del ciclo estral y después de la inyección de GnRH se interpretó como un signo de la formación de un cuerpo lúteo accesorio⁽⁹⁾. Sin embargo, la formación real de un cuerpo lúteo accesorio no se confirmó, y no se midieron las concentraciones de progesterona en sangre. Esto impide concluir que se produjo un incremento en las concentraciones de progesterona en sangre en los animales. De todas maneras, la inducción de la lactancia fue exitosa tanto en vacas como en vaquillas, y desde luego se puede afirmar que la progesterona endógena producida por uno o varios cuerpos

lúteos fue la suficiente para estimular el crecimiento de la ubre durante el protocolo de inducción de la lactancia.

La producción de leche durante la lactancia en el ganado está determinada por factores como la genética, la estación y el número de partos⁽²²⁻²⁴⁾. En un estudio de los efectos del número de partos y la época, en la producción de leche en vacas inducidas a la lactancia, se encontró una mayor producción en la quinta lactancia y durante el otoño e invierno⁽²⁴⁾. En un intento fallido para estudiar el efecto de la genética en la producción de leche en ovejas inducidas a la lactancia⁽²⁵⁾, se observó que la raza sí afectó el número de ovejas con respuesta positiva al protocolo de inducción a la lactancia. En el presente estudio, se indujeron a la lactancia a las vacas y vaquillas durante la misma temporada. El manejo y alimentación de ellas fue el mismo, dado que se ubicaron en el mismo corral durante todo el periodo experimental. Además, todas eran de la raza Holstein y se consideró el efecto del número de partos durante el análisis estadístico de la información. Por lo tanto, las diferencias entre los grupos experimentales en cuanto a la producción de leche se podrían relacionar con las diferentes respuestas de los animales al tratamiento hormonal⁽²⁵⁾ y su mérito genético respectivo para la producción de leche⁽²⁶⁾.

Los presentes resultados sugirieron que la producción endógena de progesterona en combinación con dosis reducidas de benzoato de estradiol es suficiente para inducir la lactancia en ganado Holstein. Sin embargo, el tamaño pequeño de muestra utilizado no permite extrapolar la eficacia del protocolo propuesto a un nivel comercial.

Literatura citada:

1. Maffi AS, Luz GB, Gasperin BG, Mattos RF, Xavier EG, Corrêa MN, *et al.* Induction of lactation: an economic study of tool for dairy heifers with successive reproductive failures. *Ciênc Rural* 2019;49(12):1-8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180661> .
2. Luz GB, Maffi AS, Xavier EG, Correa MN, Gasperin BG, Brauner CC. Endocrine profile and reproductive performance in heifers induced to lactation. *Acta Sci Vet* 2019;47:1658. 10.22456/1679-9216.92095.
3. De Vries A, Marcondes MI. Review: Overview of factors affecting productive lifespan of dairy cows. *Animal* 2020;14(S1): S155–64. 10.1017/S1751731119003264.
4. Magliaro AL, Kensinger RS, Ford SA, O'Connor ML, Muller LD, Graboski R. Induced lactation in nonpregnant cows: profitability and response to bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 2004;87(10): 3290-3297. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73465-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73465-7).

5. Howard JM, Manzo R, Dalton JC, Frago F, Ahmadzadeh A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2006;95(3-4):224-33. 10.1016/j.anireprosci.2005.10.010.
6. Erb RE. Harmonal control of mammogenesis and onset of lactation in cows—A Review. *J Dairy Sci* 1977;60(2):155-169. 10.3168/jds.s0022-0302(77)83849-6.
7. Freitas PRC, Coelho SG, Rabelo E, Lana ÂMQ, Artunduaga MAT, Saturnino HM. Artificial induction of lactation in cattle. *Rev Bras Zootec* 2010;39(10):2268-2272. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001000024>.
8. Mellado M, Nazarre E, Olivares L, Pastor F, Estrada A. Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. *Anim Sci* 2006;82(4):555-559. <https://doi.org/10.1079/ASC200656>.
9. Schmitt ÉJP, Diaz T, Barros CM, De La Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, *et al.* Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1996;74(5):1074-83. 10.2527/1996.7451074x.
10. Mohan K, Shridhar NB, Honnappa TG, Ramachandra SG, Nirmala GC, Jayakumar K. Induction of lactation in repeat breeding crossbred heifers. *Indian J Anim Sci* 2009;79: 379-380.
11. Paiano RB, Lahr FC, Poit DAS, Costa AGBVB, Birgel DB, Birgel EH. Biochemical profile in dairy cows with artificial induction of lactation. *Pesq Vet Bras* 2018;38(12): 2289-2292. 10.1590/1678-5150-PVB-5951.
12. Harness JR, Anderson RR, Thompson LJ, Early DM, Younis AK. Induction of lactation by two techniques: success rate, milk composition, estrogen and progesterone in serum and milk, and ovarian effects. *J Dairy Sci* 1978;61(12):1725-35. 10.3168/jds.S0022-0302(78)83794-1.
13. Stark A, Wellnitz O, Dechow C, Bruckmaier R, Baumrucker C. Colostrogenesis during an induced lactation in dairy cattle. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2015;99(2):356-366. 10.1111/jpn.12205.
14. Luz GB, Maffi AS, Xavier EG, Correa MN, Gasperin BG, Brauner CC. Induction of lactation in dairy heifers: milk production, inflammatory and metabolic aspects. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2020;72(2): 371-378. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11246>.

15. Fulkerson WH, McDowell GH. Artificial induction of lactation in cattle by use of dexamethasone trimethylacetate. *Aust J Biol Sci* 1975;28(2):183–187. 10.1071/bi9750183.
16. Fulkerson WJ. Artificial Induction of Lactation: A comparative study in heifers. *Aust J Biol Sci* 1978;31(1):65–72.
17. Gümen A, Sartori R, Costa FMJ, Wiltbank MC. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci* 2002;85(1):43-50. 10.3168/jds.S0022-0302(02)74051-4.
18. Lembowicz K, Rabek A, Skrzeczkowski L. Hormonal induction of lactation in the cow. *Br Vet J* 1982;138(3):203–8. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)31083-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)31083-7).
19. Malekinejad H, Rezaabakhsh A. Hormones in dairy foods and their impact on public health- A narrative review article. *Iran J Public Health* 2015;44(6):742–58.
20. Delouis C, Djiane J, Kann G, Terqui M, Head HH. Induced lactation in cows and heifers by short-term treatment with steroid hormones. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1978;18(3):721–34. <https://doi.org/10.1051/rnd:19780410>.
21. Narendran R, Hacker RR, Smith VG, Lun A. Hormonal induction of lactation: estrogen and progesterone in milk. *J Dairy Sci* 1979;62(7):1069–1075. 10.3168/jds.S0022-0302(79)83376-7
22. Lee JY, Kim IH. Advancing parity is associated with high milk production at the cost of body condition and increased periparturient disorders in dairy herds. *J Vet Sci* 2006;7(2):161–166. 10.4142/jvs.2006.7.2.161
23. Strucken EM, Laurenson YCSM, Brockmann GA. Go with the flow-biology and genetics of the lactation cycle. *Front Genet* 2015;6:1–11. 10.3389/fgene.2015.00118.
24. Mellado M, Antonio-Chirino E, Meza-Herrera C, Veliz FG, Arevalo JR, Mellado J, *et al.* Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 2011;94(9):4524–4530. 10.3168/jds.2011-4152.
25. Ramírez AB, Salama AAK, Caja G, Castillo V, Albanell E, Such X. Response to lactation induction differs by season of year and breed of dairy ewes. *J Dairy Sci* 2008;91(6):2299–2306. 10.3168/jds.2007-0687.
26. Kennedy J, Dillon P, O’Sullivan K, Buckley F, Rath M. The effect of genetic merit for milk production and concentrate feeding level on the reproductive performance of Holstein-Friesian cows in a grass-based system. *Anim Sci* 2003;76(2):297–308. <https://doi.org/10.1017/S1357729800053546>.