



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
REPRODUCCIÓN

EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN E
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO (IATF) CON O SIN
PROGESTERONA EN VACAS LECHERAS ALTAS PRODUCTORAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

SILVANO FLORES DOMÍNGUEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DOCTOR JOEL HERNÁNDEZ CERÓN, FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTOR:
DOCTOR CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR, FMVZ-UNAM
DOCTOR CARLOS FERNANDO ARÉCHIGA FLORES, PMDCPSA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Evaluación de dos protocolos de sincronización e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) con o sin progesterona en vacas lecheras altas productoras.

Resumen

La inclusión de progesterona en los programas de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo (Ovsynch) y la reducción del periodo de dominancia del folículo ovulatorio han favorecido el porcentaje de concepción (PC) en el ganado lechero. En el presente estudio se comparó el PC entre vacas inseminadas mediante el programa Ovsynch y vacas inseminadas con un programa Ovsynch complementado con progesterona. Se utilizaron 275 vacas, las cuales se pre-sincronizaron con dos inyecciones de PGF2 α con intervalo de 14 días a partir de los 32 ± 3 días posparto (DPP); doce días después de la segunda inyección de PGF2 α se asignaron a los siguientes tratamientos: Ovsynch (n=144) recibieron GnRH; siete días después se inyectó PGF2 α ; 56 h más tarde recibieron GnRH y se inseminaron 16 h después. PRID5d (n=131) recibieron GnRH y un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (PRID Delta) durante cinco días; al retirar el dispositivo, se aplicó PGF2 α y 24 h después se administró una segunda inyección de PGF2 α ; 56 h posterior al retiro del dispositivo se aplicó la segunda dosis de GnRH y las vacas se inseminaron 16 h después. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación rectal entre 45 y 50 días posinseminación. Se comparó el PC mediante análisis de regresión logística. Las variables independientes fueron: tratamiento (PRID 5d vs Ovsynch), producción láctea ($\leq 40L$ vs $> 40L$), técnico inseminador (1 vs 2), tipo de puerperio (normal vs. anormal) y número de partos (primíparas vs. múltiparas). El PC fue similar ($P = 0.25$) entre los tratamientos (21 vs 27%; PRID5d y Ovsynch, respectivamente). No se observó efecto de la producción de leche, del técnico inseminador, del tipo de puerperio, ni del número de partos sobre el PC; asimismo, no se encontró un efecto de la interacción de estas variables con el tratamiento en el PC ($P > 0.1$). Se concluye que el porcentaje de concepción no difirió entre vacas de primer servicio inseminadas mediante el programa básico de

Ovsynch y un programa de Ovsynch que incluyó la inserción de un dispositivo liberador de progesterona durante cinco días.

PALABRAS CLAVE: Ovsynch, Progesterona, Fertilidad, Vacas lecheras.

ABSTRACT

Progesterone administration during synchronization of ovulation and timed artificial insemination protocols and shortening of dominance period of the ovulatory follicle have improved conception rate (CR) in dairy cattle. The objective of this study was to compare conception rates of dairy cows after timed-insemination using the Ovsynch protocol versus a modified Ovsynch protocol that includes five days of progesterone administration through a progesterone-releasing intravaginal device. Holstein cows (n=275) were pre-synchronized with a prostaglandin injection at 32 ± 3 days postpartum (DPP); and a subsequent injection 14 days after (46 ± 3 DPP); twelve days after (58 ± 3 DPP), cows were randomly assigned to two treatments: Group Ovsynch (n=144) received GnRH, followed 7 days later by PGF2 α and then GnRH 56 h after PGF2 α and cows were inseminated 16 h later. Group PRID5d (n=131), received GnRH and a progesterone-releasing intravaginal device was located (PRID Delta), which remained in place five days. Cows received an intramuscular injection of PGF2 α at the time of PRID removal and a second injection of PGF2 α 24 h later. At 56 h following PRID removal, the next injection of GnRH was given and cows were inseminated 16 h later. Pregnancy diagnosis was performed by palpation per rectum within 45 to 50 d postinsemination. Conception rate within treatments was compared by logistic regression analysis. Independent variables were: treatment (Ovsynch vs PRID5d), milk yield (≤ 40 kg vs > 40 kg), AI technician (1 vs 2), postpartum type (normal vs abnormal) and parity (primiparous vs multiparous). Conception rate was similar ($P = 0.25$) within treatments (27 vs 21%; Ovsynch and PRID5d, respectively). There was no effect of milk yield, AI technician, postpartum type or parity on CR; likewise, the interaction of these variables with the treatment did not affect the CR ($P > 0.1$). In conclusion, the results of the present study indicate that conception rates were similar in dairy cows inseminated by an Ovsynch program or a modified Ovsynch that included a progesterone-releasing intravaginal device during 5 days.

KEY WORDS: Ovsynch, Progesterone, Fertility, Dairy cows.

Contenido

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	5
1. Introducción	7
2. Revisión de literatura.	9
2.1 Desarrollo folicular en la vaca.	9
2.2 Regresión del cuerpo lúteo y ovulación.	10
2.3 Sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo.	12
2.4 IATF y fertilidad.	13
2.5 Factores de variación en la respuesta a los programas de IATF.	17
2.5.1 Ciclicidad.	17
2.5.2 Concentraciones sanguíneas de progesterona.	19
2.5.3 Días del ciclo estral.	21
2.5.4 Luteólisis.	23
2.5.5. Infecciones uterinas.	24
2.5.6 Manejo de los protocolos.	26
3. Material y Métodos.	27
3.1 Manejo del hato.	27
3.2 Diseño del experimento.	27
3.3 Análisis estadístico.	28
4. Resultados.	29
5. Discusión.	30
6. Agradecimientos.	33
7. Literatura citada.	34

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de la sincronización de la ovulación con el programa Ovsynch: día 0 primera inyección de GnRH (induce la ovulación o luteinización del folículo dominante, inicio de una nueva oleada folicular); día 7 inyección de PGF2 α (Luteólisis del CL), día 9 segunda inyección de GnRH (induce la ovulación del folículo
- Figura 2. Variante del programa Ovsynch utilizado en vacas anéstricas. Este programa incluye la inserción intravaginal de un dispositivo liberador de progesterona, el cual permanece *in situ* entre la primera inyección de GnRH y la PGF2 α .
- Figura 3. Cosynch; variante del programa Ovsynch en donde la inseminación artificial se hace al momento de la segunda inyección de GnRH. El tiempo que transcurre entre la aplicación de la PGF2 α y la segunda dosis de GnRH puede ser de 48 o 72 horas.
- Figura 4. Variante del Cosynch en el cual se utiliza un dispositivo intravaginal liberador de progesterona, entre la primera inyección de GnRH y la PGF2 α .
- Figura 5. Esta es una variante del programa Ovsynch, en la cual se reduce el intervalo entre la primera GnRH y la PGF2 α de cinco a siete días. En el día 0, se administra la primera inyección de GnRH y se inserta en la vagina un dispositivo liberador de progesterona; día 5, se retira el dispositivo

intravaginal liberador de progesterona y se inyecta una PGF2 α ; día 6, se aplica una segunda dosis de PGF2 α ; día 7, se inyecta la segunda dosis de GnRH; 16 h después se insemina a tiempo fijo (día 8).

- Figura 6. Descripción esquemática de los tratamientos. 29
- Cuadro 1. Odds ratio para la probabilidad de gestación dependiente del tratamiento, producción de leche, técnico inseminador, tipo de puerperio y número de partos. 30

1. Introducción

La baja eficiencia en la detección de estros que padecen los hatos lecheros, ha motivado el desarrollo de programas de inseminación artificial sin la necesidad de detectar a las vacas en estro. El primer programa validado con estas características se conoce como Ovsynch y ha servido como base para crear otros esquemas. Este programa comienza con la inyección de GnRH en el diestro temprano (día cero), seguida de la inyección de PGF2 α (día siete); posteriormente se administra la segunda dosis de GnRH (día nueve) y se insemina 16 horas después. La primera inyección de GnRH induce la ovulación o la luteinización de los folículos ≥ 8 mm de diámetro, lo cual sincroniza la emergencia de la oleada folicular, de tal forma que al momento de inyectar la PGF2 α las vacas continúan en diestro y tienen un folículo preovulatorio en un estado similar de desarrollo; con la segunda inyección de GnRH se induce la ovulación, la cual está sincronizada con la inseminación artificial (Pursley *et al.*, 1997).

La proporción de vacas gestantes del total inseminado [porcentaje de concepción (PC)] obtenido en estos programas es similar al logrado cuando se insemina en el estro observado, ya sea natural o sincronizado con PGF2 α (Pursley *et al.*, 1997). Sin embargo, la ventaja del programa de Ovsynch consiste en que se inseminan a todas las vacas que entran al programa mientras que con los programas de inseminación a estro observado sólo se inseminan a las vacas que se detectan en estro (entre 40 y 60% del total elegible) (Senger, 1994; Pursley *et al.*, 1997).

No obstante la perfección en la concepción fisiológica del programa Ovsynch, los resultados en los hatos lecheros no son los óptimos. Dentro de los factores más importantes que determinan los resultados están: la etapa del ciclo estral en la que se inicia la sincronización de la oleada folicular (Watts y Fuquay, 1985; Alnimer *et al.*, 2009), las características del folículo ovulatorio (Ginther *et al.*, 2003; Gümen *et al.*, 2003), la ciclicidad de las vacas que se enrolan en el programa, las concentraciones de progesterona durante el programa (Bisinotto *et al.*, 2010a; Wiltbank *et al.*, 2012a), así como factores de manejo los cuales determinan que no todas las vacas que inician el programa lo terminen correctamente (Pursley y Whitter, 2011).

Dentro de las modificaciones que se han hecho al programa básico de Ovsynch para optimizarlo destaca la inclusión de progesterona (Bridges *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010; Rabaglino *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012). La combinación con progesterona ha favorecido la fertilidad hasta en diez puntos porcentuales (Bisinotto *et al.*, 2010), lo cual se relaciona con un mejor ambiente para el desarrollo del folículo ovulatorio (Ayres *et al.*, 2013); además, la incorporación de progesterona puede inducir un estro fértil en hembras que están en anestro o en la fase de transición del anestro a la ciclicidad (McDougall *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha buscado disminuir el periodo de dominancia del folículo ovulatorio mediante el acortamiento del tiempo entre la primera inyección de GnRH y la administración de la PGF2 α . Así, se desarrolló un programa en el cual a las vacas se les inserta un dispositivo intravaginal liberador de progesterona durante cinco días. El día de la inserción reciben la primera inyección de GnRH y al momento de retirar el dispositivo se les inyecta PGF2 α , la cual se repite 24 h después (Bridges *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012). La segunda inyección de GnRH se realiza 56 h posterior al retiro del dispositivo y se insemina 16 h después.

De acuerdo con la información mencionada anteriormente, el programa con progesterona generaría mejores resultados que el programa básico de Ovsynch; sin embargo, no hay suficientes estudios de campo en los cuales se contrasten dichos programas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue comparar el porcentaje de concepción entre vacas de primer servicio inseminadas mediante el programa básico de Ovsynch y un programa de Ovsynch con cinco días de progesterona.

2. Revisión de la literatura

Uno de los sueños de los fisiólogos de la reproducción bovina de los años 60 era desarrollar un método que permitiera la inseminación artificial sin la detección previa del estro. Con el advenimiento de la PGF2 α en los años 70, los investigadores pensaron que ese momento había llegado; sin embargo, no fue así porque el intervalo entre la inyección de la PGF2 α y la presentación del estro era muy variable entre las vacas, por tanto la fertilidad cuando se inseminaba a tiempo fijo era baja. Con el uso de la ecografía transrectal en la segunda mitad de década de los 80, se caracterizó la dinámica folicular y se descubrió que el tiempo de presentación del estro, y en consecuencia el momento de la ovulación, dependía de la etapa de la oleada folicular en que se encontraba la vaca al momento de la inyección de la PGF2 α . Se concluyó que la única manera de reducir la variación en la presentación del estro era mediante la sincronización del desarrollo folicular, para que al momento de la inyección de la PGF2 α hubiera un folículo con las mismas características en todas las vacas tratadas.

En los años 90 se desarrollaron programas que facilitaron la sincronización de las oleadas foliculares, lo cual dio origen a los programas de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo (IATF), que conocemos actualmente.

2.1 Desarrollo folicular en la vaca

La hembra bovina nace con aproximadamente 200 mil folículos, de los cuales muy pocos se activan e inician su crecimiento, y la mayor parte de ellos degenera, proceso conocido como atresia, en diferentes etapas del desarrollo (Erickson, 1966; Lucy, 2007). Al nacimiento, los folículos están en la fase más elemental y se conocen como folículos primordiales. Posteriormente estos folículos se activan y se transforman en folículos primarios y luego en secundarios; hasta este momento los folículos no tienen antro (etapa preantral) y su desarrollo es independiente de las gonadotropinas (LH y FSH). Cuando los folículos forman el antro se conocen como folículos terciarios y su desarrollo es dependiente de las gonadotropinas (etapa antral) (Hyttel *et al.*, 1997).

El crecimiento folicular en la etapa antral ocurre en forma de oleadas y cada oleada

comienza con un aumento en las concentraciones séricas de FSH, lo cual promueve el crecimiento de un grupo de cinco a ocho folículos de ~4 mm de diámetro; este proceso se conoce como reclutamiento (Ahmad *et al.*, 1997). Posteriormente, un solo folículo continúa creciendo (folículo dominante), con ello las concentraciones de estradiol 17 β e inhibina se incrementan, lo cual suprime las concentraciones séricas de FSH. La disminución de las concentraciones de FSH provocan atresia de los folículos subordinados, pues ellos dependen totalmente de esta hormona, mientras que el folículo dominante continúa su desarrollo debido a que en esta fase es estimulado por la LH (Lucy, 2007). El folículo dominante subsiste de cuatro a seis días y si no llega a ovular, sufre atresia. Después de la atresia del folículo dominante bajan los niveles de estrógenos e inhibina, se observa un incremento de las concentraciones de FSH y se inicia una nueva oleada folicular (Lucy, 2007).

El folículo dominante que está presente cuando el cuerpo lúteo sufre regresión, continúa su desarrollo, madura y ovula, en respuesta al incremento de la frecuencia de secreción de la LH y al pico preovulatorio de esta hormona. Durante el ciclo estral se presentan de dos a tres oleadas foliculares (Ahmad *et al.*, 1997; Jaiswal *et al.*, 2004). En las vacas lecheras en lactación es mayor la proporción de vacas con dos oleadas foliculares que las vacas con tres oleadas (Jaiswal *et al.*, 2009)

2.2 Regresión del cuerpo lúteo y ovulación

En los rumiantes, el útero regula la vida media del cuerpo lúteo mediante la secreción de la prostaglandina F2 α (PGF2 α); así, cuando la gestación no se establece, el endometrio secreta PGF2 α para destruir el cuerpo lúteo y con ello se presenta una nueva oportunidad de concepción. La PGF2 α llega al ovario a través de una vía sanguínea local, lo cual evita su degradación en los pulmones. Dicha vía está constituida por el plexo útero-ovárico. Esta red de vasos sanguíneos permite el paso de la PGF2 α de la vena uterina a la arteria ovárica (McCracken *et al.*, 1999). El mecanismo por el cual la PGF2 α atraviesa las paredes de los vasos sanguíneos no está claro; durante años se resumía todo a un mecanismo de contracorriente, sin embargo, hay evidencias de que este proceso está regulado por una proteína transportadora de la PGF2 α (Tysseling *et al.*, 1998). En las vacas con la patología

del desarrollo conocida como aplasia segmentaria, en la cual no se desarrolla un cuerno uterino, presentan un cuerpo lúteo persistente cuando la ovulación ocurre del lado donde no hay cuerno uterino.

Durante el diestro, la progesterona inhibe la síntesis de la $\text{PGF2}\alpha$ mediante la supresión de la formación de receptores para estradiol tanto en el hipotálamo como en el endometrio. Al final del diestro, después de un periodo de 12 a 14 días de exposición a progesterona, los receptores para esta hormona se agotan (downregulation), lo cual promueve la síntesis de receptores para estradiol. El estradiol producido en el folículo dominante estimula la síntesis de receptores para oxitocina en el endometrio; al mismo tiempo en el hipotálamo se activa la secreción de oxitocina. La oxitocina, tanto de origen hipotalámico como lúteo, desencadena la secreción de $\text{PGF2}\alpha$. Para provocar la luteólisis, la $\text{PGF2}\alpha$ se debe secretar en episodios (pulsos) con intervalos de seis a ocho horas, requiriéndose de cinco a seis episodios para destruir totalmente al cuerpo lúteo (McCracken *et al.*, 1999). Si la $\text{PGF2}\alpha$ no sigue este patrón de secreción, fracasa la luteólisis. Además de la $\text{PGF2}\alpha$ de origen uterino, el cuerpo lúteo también produce $\text{PGF2}\alpha$, la cual aumenta el efecto luteolítico. La falta de sensibilidad a la $\text{PGF2}\alpha$ que se observa en los cuerpos lúteos inmaduros (primeros cinco días después de la ovulación) obedece a que en este periodo el cuerpo lúteo todavía no produce $\text{PGF2}\alpha$ (Smith y Meidan, 2014).

Después de la luteólisis los niveles de progesterona llegan a niveles basales, lo cual permite el incremento de la frecuencia de secreción pulsátil de la LH, con lo cual el folículo dominante continúa su maduración para convertirse en folículo ovulatorio (McCracken *et al.*, 1999). En un ciclo estral, el tiempo que transcurre entre la luteólisis y la presentación del estro es muy constante entre las vacas debido a la poca variación que hay en las características del folículo dominante al momento de la luteólisis. Por el contrario, cuando se induce la luteólisis con $\text{PGF2}\alpha$ en un programa de campo, las vacas están en diferentes días del diestro, lo cual determina que haya vacas con folículos en diferentes etapas de desarrollo. En este contexto, el periodo comprendido de la luteólisis a la presentación del estro, es muy variable. Así, una vaca con un folículo maduro (diestro temprano) al momento de la administración de la $\text{PGF2}\alpha$ tardará menos tiempo en presentar el estro que una

vaca que tiene folículos en las primeras etapas de desarrollo (diestro medio) (Diskin *et al.*, 2002).

El único camino para reducir la variación en el tiempo de presentación del estro en las vacas tratadas con $\text{PGF2}\alpha$, es minimizando la variación de la etapa del desarrollo de los folículos al momento de la inyección de la $\text{PGF2}\alpha$ (Weems *et al.*, 2006).

Después de la inyección de una dosis luteolítica de $\text{PGF2}\alpha$, naturales o sintéticas, las concentraciones de progesterona alcanzan niveles basales entre 24 y 36 horas. Alrededor de cinco por ciento de las vacas con cuerpos lúteos funcionales no sufren regresión lútea, por causas desconocidas. Además, en los primeros cinco días el cuerpo lúteo no es susceptible al efecto luteolítico de la $\text{PGF2}\alpha$ (McCracken *et al.*, 1999; El-Zarkouny *et al.*, 2004).

2.3 Sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo

Se han desarrollado tratamientos que promueven la homogeneización de la población folicular entre las vacas. Después de la ovulación en un ciclo estral bajan las concentraciones de las hormonas inhibidoras de la secreción de la FSH (inhibina y estradiol) y se observa un incremento posovulatorio de FSH, el cual provoca el reclutamiento folicular y con ello el inicio de la primera oleada folicular. Entre los días 6 y 7 después del pico preovulatorio de LH se observa en todas las vacas un folículo dominante de características muy similares. En condiciones de campo, la inducción de la ovulación de los folículos dominantes con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) provoca el inicio sincronizado de una nueva oleada folicular, tal y como ocurre después de la ovulación en el ciclo estral normal (Pursley *et al.*, 1995). Entre 36 y 48 horas después de la inyección de GnRH comienza la nueva oleada folicular. Cabe recordar que la GnRH ocasiona una secreción de LH parecida a preovulatoria, la cual provoca la ovulación y/o luteinización del folículo dominante (Diskin *et al.*, 2002). También se puede provocar la atresia del folículo dominante mediante la administración de estradiol o progesterona, hormonas que disminuyen la frecuencia de los pulsos de LH, condición que induce la atresia del

folículo dominante y el inicio de una nueva oleada folicular (Anderson *et al.*, 1994; Bo *et al.*, 1995; Diskin *et al.*, 2002).

En los programas de sincronización e inseminación a tiempo fijo (Ovsynch o IATF) las vacas se sincronizan con PGF2 α (presincronización) cada 14 días, a partir del día 30 o 35 posparto, con el propósito de que al momento de iniciar la sincronización de la ovulación estén en el diestro temprano (Gümen *et al.*, 2012). La sincronización de la ovulación inicia 12 días después de la última inyección de PGF2 α ; comienza con la inyección de GnRH (día cero), seguida de la inyección de PGF2 α (día siete); posteriormente se administra la segunda dosis de GnRH (día nueve) y se insemina 16 horas después (Pursley *et al.*, 1995). La primera inyección de GnRH induce la ovulación o la luteinización de los folículos ≥ 8 mm de diámetro, iniciándose una nueva oleada folicular, condición similar a la observada después de la ovulación espontánea. Dado que la primera inyección de GnRH se realiza en el diestro temprano, al momento de la inyección de PGF2 α , las vacas continúan en diestro y la mayoría de ellas tiene un folículo con un grado de desarrollo similar. La segunda inyección de GnRH induce la ovulación del folículo dominante, la cual está sincronizada con el momento de la inseminación (figura 1). Se han desarrollado diversas variantes del programa original; en las figuras 3 a 5 se muestran algunas de ellas.

La presincronización con inyecciones sistemáticas de PGF2 α antes de la primera inyección de GnRH es necesaria para alcanzar resultados óptimos. Si las vacas no entran al programa de presincronización y reciben la primera inyección de GnRH en cualquier día del diestro, es probable que algunas muestren estro antes de la segunda inyección de GnRH (Gümen *et al.*, 2012).

2.4 IATF y fertilidad

La proporción de vacas gestantes del total inseminado (PC) es similar entre las vacas inseminadas a estro observado y las inseminadas a tiempo fijo (Bisinotto y Santos, 2012). Sin embargo, la diferencia de fertilidad en estos programas radica en la tasa de preñez (TP), es decir, en la proporción de vacas gestantes del total elegible para inseminarse en un periodo equivalente a la duración de un ciclo estral

(21 días). La tasa de preñez es mayor en los programas de IATF que en los programas de inseminación a estro observado. Esto obedece a que en los programas de inseminación a estro observado se insemina alrededor de 50% de las vacas (eficiencia en la detección de estros de 50%), mientras que en la IATF se insemina al 100% de las vacas elegibles, lo que arroja una mayor TP. De esta forma, si el PC es de 30% y la eficiencia en la detección de estros es de 50%, la TP será de 15%. En el programa de IATF con el mismo PC (30%), pero inseminando todas las vacas (eficiencia en la detección de estros de 100%), la TP será de 30%. De acuerdo con estos números el programa de IATF ofrece en doble de TP que los programas tradicionales basados en la detección del estro). Esta diferencia en la tasa de preñez podría justificar económicamente dichos programas de inseminación a tiempo fijo. En un estudio reciente hecho en México, se estimó la consecuencia económica de los cambios en la tasa de preñez en un hato lechero de manejo intensivo mediante la metodología Montecarlo y se encontró que por cada punto porcentual que se incremente la tasa de preñez en el rango de 15 a 20%, se genera un ingreso adicional de \$748.00 por vaca al año (Ríos *et al.*, 2011).

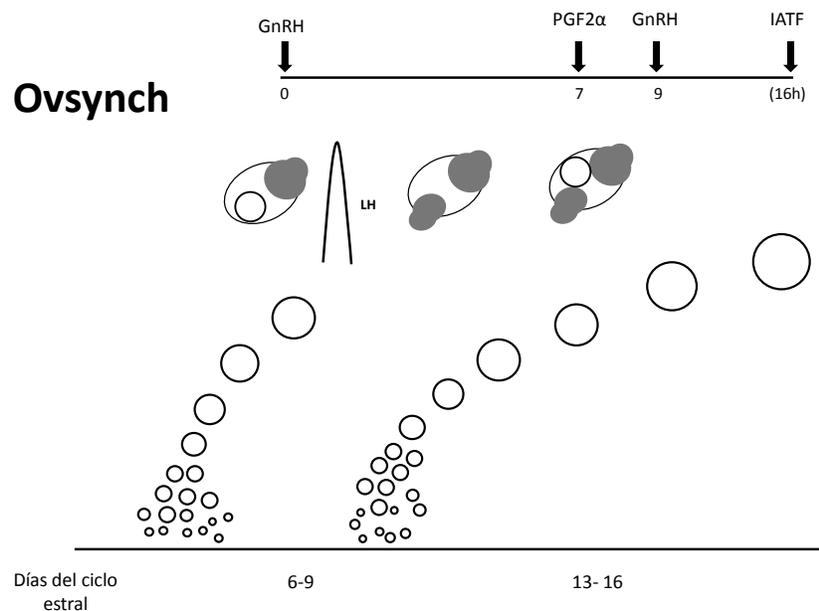


Figura 1. Representación esquemática de la sincronización de la ovulación con el programa Ovsynch: día 0 primera inyección de GnRH (induce la ovulación o

luteinización del folículo dominante, inicio de una nueva oleada folicular); día 7 inyección de PGF2 α (Luteólisis del CL), día 9 segunda inyección de GnRH (induce la ovulación del folículo dominante), inseminación a tiempo fijo a las 16 h de la última inyección (Día 10).

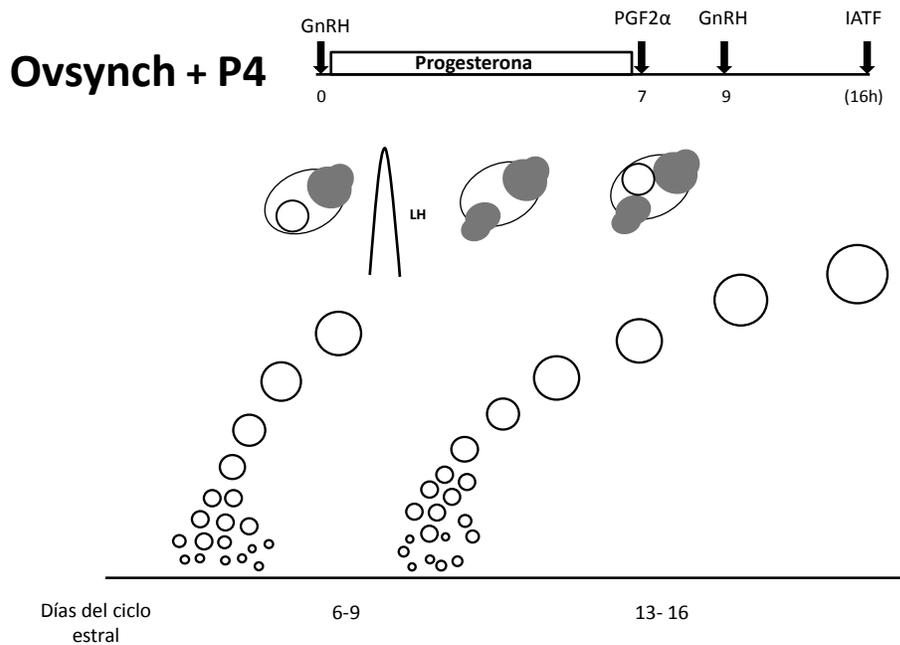


Figura 2. Variante del programa Ovsynch utilizado en vacas anéstricas. Este programa incluye la inserción intravaginal de un dispositivo liberador de progesterona, el cual permanece *in situ* entre la primera inyección de GnRH y la PGF2 α .

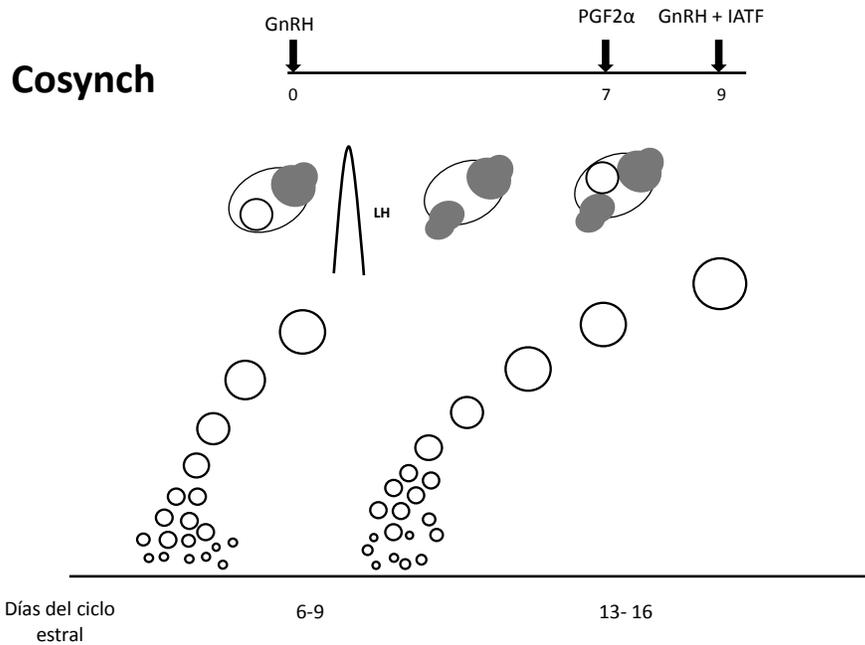


Figura 3. Cosynch; variante del programa Ovsynch en donde la inseminación artificial se hace al momento de la segunda inyección de GnRH. El tiempo que transcurre entre la aplicación de la PGF2 α y la segunda dosis de GnRH puede ser de 48 o 72 horas.

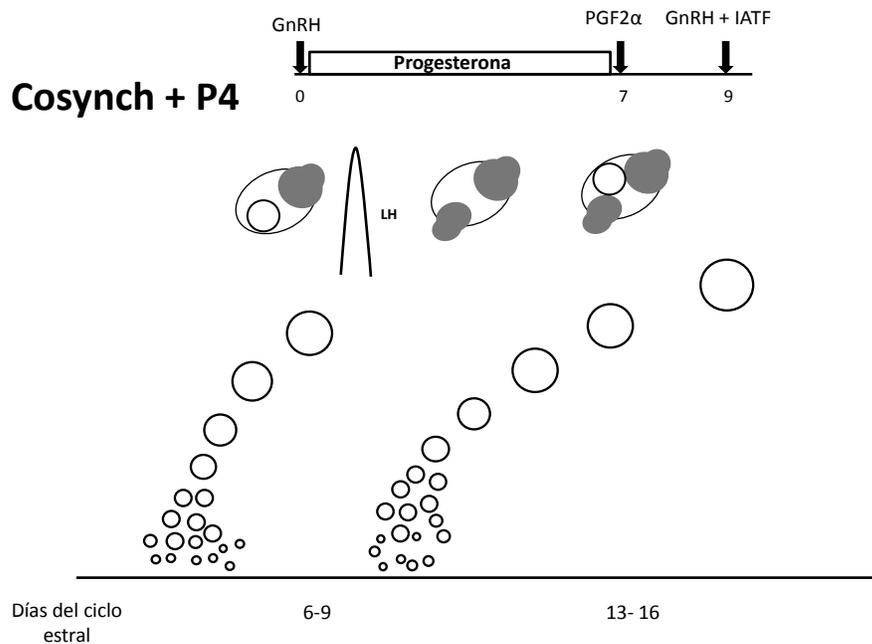


Figura 4. Variante del Cosynch en el cual se utiliza un dispositivo intravaginal liberador de progesterona, entre la primera inyección de GnRH y la PGF2 α .

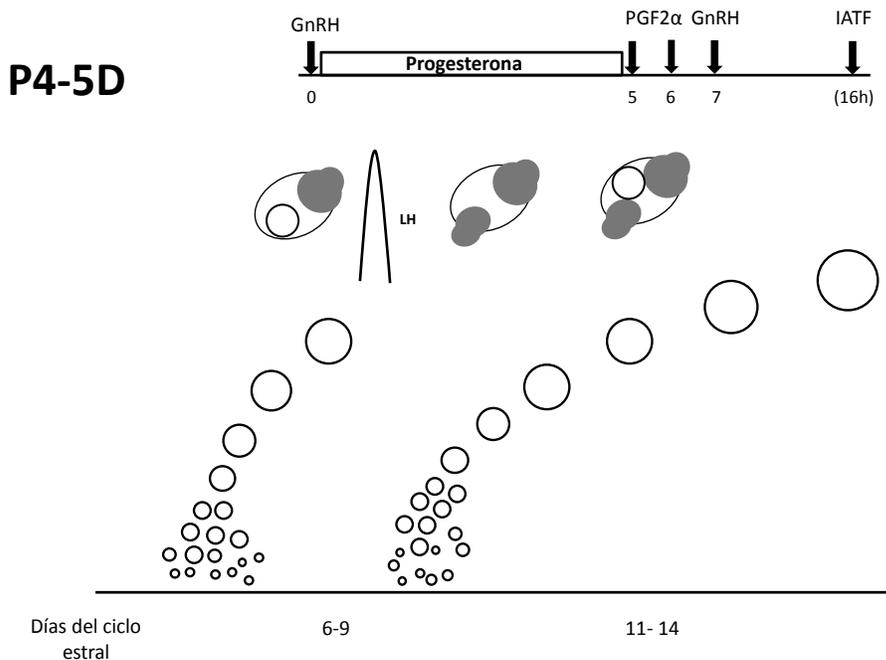


Figura 5. Esta es una variante del programa Ovsynch, en la cual se reduce el intervalo entre la primera GnRH y la PGF2 α de cinco a siete días. En el día 0, se administra la primera inyección de GnRH y se inserta en la vagina un dispositivo liberador de progesterona; día 5, se retira el dispositivo intravaginal liberador de progesterona y se inyecta una PGF2 α ; día 6, se aplica una segunda dosis de PGF2 α ; día 7, se inyecta la segunda dosis de GnRH; 16 h después se insemina a tiempo fijo (día 8).

2.5 Factores de variación en la respuesta a los programas de IATF

2.5.1 Ciclicidad

Los mejores resultados en los programas de IATF se consiguen cuando las vacas tratadas están ciclando. Lo ideal es que durante el puerperio el útero involucre y el eje hipotálamo-hipófisis-ovario reanude las secreciones cíclicas de hormonas

gonadotrópicas/gonadales, lo que da lugar a la primera ovulación postparto y ciclos estrales regulares a intervalos de 21 días (Roche, 2006; Peter *et al.*, 2009), estos procesos se completan dentro de las primeras seis semanas posteriores al parto. Peter y Bosu (1988) observaron que alrededor del noventa por ciento de las vacas presentan su primera ovulación postparto durante este periodo. Sin embargo, la incidencia de vacas que no son detectadas en estro en los sistemas intensivos de producción de leche se encuentra entre un rango de 10 a 40% a los 60 días postparto (Rhodes *et al.*, 2003). Actualmente, alrededor del 50% de las vacas presentan ciclos estrales postparto anormales, lo que resulta en un intervalo parto-primera inseminación mayor y una disminución en la tasa de concepción (Opsomer *et al.*, 1998; Garnsworthy *et al.*, 2009).

En la mayoría de los hatos lecheros el programa reproductivo se inicia con la inyección sistemática de PGF2 α cada 14 días a partir del día 30 postparto (presincronización), y se insemina a todas las vacas que son detectadas en estro después de la segunda o tercera inyección de PGF2 α . Cuando las vacas no muestran estro durante el programa de presincronización se someten a un protocolo de IATF.

Entre 20 y 30% de las vacas altas productoras no reanudan su actividad cíclica en los primeros 60 días postparto, si estas vacas se someten a un programa de IATF serán inseminadas con mínimas probabilidades de concepción (Cerri *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2006; Hillegass *et al.*, 2008). Además, las vacas que llegan a quedar gestantes, tienen mayor probabilidad de perder la gestación (Santos *et al.*, 2004; Chebel *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2006). Debido a que en la mayor proporción de las vacas altas productoras el reinicio de la actividad ovárica se produce de manera tardía, los métodos que inducen la aparición de estros en vacas anéstricas, son necesarios para mejorar el desempeño reproductivo en las explotaciones lecheras.

Una alternativa para mejorar la sincronización sin afectar la longitud de los programas de IATF es la suplementación de progesterona durante los protocolos (Ribeiro *et al.*, 2012). La utilización de progesterona mejora los porcentajes de concepción en animales inseminados artificialmente ya que con ésta se evita la

formación de un CL de vida corta (Breuel *et al.*, 1993), y por lo tanto, el CL de la ovulación precedida por el tratamiento de progesterona tendrá una actividad normal que permite el desarrollo y mantenimiento de la gestación (Díaz *et al.*, 2002). La utilización de progesterona o progestágenos se realiza por un periodo de 5 a 10 días junto con alguna hormona (GnRH o estradiol) que produzca la atresia del folículo dominante y el surgimiento de una nueva oleada folicular (Diskin *et al.*, 2002; Lucy *et al.*, 2004; Baruselli *et al.*, 2004).

El uso de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona entre las inyecciones de GnRH y PGF2 α mantienen elevadas las concentraciones de progesterona en sangre, con lo que se previene la conducta estral prematura, el pico preovulatorio de LH, y la ovulación (Wiltbank *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012) (Figura 2). Estos dispositivos deben ser usados durante los protocolos de IATF para mejorar la fertilidad de vacas lecheras cuando el ciclo estral no está presincronizado (El-Zarkouny *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010), o cuando no se detecta a las vacas en estro entre la segunda inyección de PGF2 α de la presincronización y el inicio del programa de IATF (Meléndez *et al.*, 2006; Chebel *et al.*, 2010). Adicionalmente, la suplementación de progesterona puede beneficiar a vacas con concentraciones endógenas bajas de esta hormona durante el desarrollo del folículo ovulatorio. El uso de la suplementación de progesterona en lugar de la presincronización puede ser ayudar, además, a disminuir el periodo de dominancia folicular del folículo ovulatorio, lo cual beneficia el PC (Ribeiro *et al.*, 2012).

2.5.2 Concentraciones sanguíneas de progesterona

Las bajas concentraciones plasmáticas de progesterona durante el crecimiento del folículo preovulatorio, es uno de los factores más importantes que afecta la fertilidad de vacas lecheras altas productoras (Bisinotto *et al.*, 2010b; Wiltbank *et al.*, 2011). En diferentes estudios se ha observado una disminución en el porcentaje de concepción después de la inseminación artificial en vacas que carecían de un cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo de sincronización (Bridges *et al.*, 2008; Denicol *et al.*, 2012). Es importante mencionar que las vacas lecheras de alta producción con un cuerpo lúteo funcional pueden presentar concentraciones

plasmáticas bajas de progesterona, debido a que tienen una tasa elevada de eliminación de las hormonas esteroideas por vía hepática, lo que influye de manera negativa en la fertilidad (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003; Bisinotto *et al.*, 2013); por esta razón se piensa que la inclusión de progesterona dentro de los programas reproductivos de inseminación a tiempo fijo genera mejores resultados en la fertilidad de las vacas lecheras (Stevenson *et al.*, 2006; Bisinotto *et al.*, 2010b; Wiltbank *et al.*, 2011; Colazo *et al.*, 2013).

Las bajas concentraciones de progesterona provoca periodos de dominancia folicular más largos que conllevan a una disminución de la competencia de los ovocitos y a anomalías del desarrollo embrionario (Revah y Butler, 1996; Wiltbank *et al.*, 2006), y por lo tanto a una disminución en el porcentaje de concepción (Fonseca *et al.*, 1983; Sartori *et al.*, 2004). Además, los bajos niveles séricos de progesterona se asocian con cambios en el patrón de desarrollo folicular, lo cual tiene una relación con un incremento en la tasa de los partos gemelares (López *et al.*, 2005).

Existen estudios que sugieren que en vacas altas productoras las concentraciones circulantes de progesterona, en la mayoría de los casos, son insuficientes para favorecer la ovulación de un folículo que libere un ovocito con alto potencial para que se desarrolle un embrión viable (Fonseca *et al.*, 1983; Sartori *et al.*, 2004). La progesterona tiene un efecto significativo en el desarrollo del folículo ovulatorio, lo cual es mediado por el efecto de la progesterona en la regulación en la frecuencia de los pulsos de LH; se ha visto una relación entre el aumento de las concentraciones de progesterona y la disminución en la frecuencia de pulsos de LH (Endo *et al.*, 2012). El incremento de la frecuencia de la secreción pulsátil de LH durante el diestro están asociados con alteraciones en el tiempo de dominancia del folículo ovulatorio, la calidad del ovocito y supervivencia del futura embrión (Cerri *et al.*, 2011). Además del efecto de la progesterona sobre el desarrollo del folículo ovulatorio, la suplementación con progesterona puede mejorar la sincronización del ciclo estral y la ovulación en vacas que tienen un CL al inicio del programa de inseminación a tiempo fijo (Chebel *et al.*, 2010).

Wiltbank *et al.*, (2011) y Colazo *et al.*, (2013), observaron que el incremento de las concentraciones séricas de progesterona antes de la IATF aumenta el porcentaje de concepción, disminuye las pérdidas de gestaciones entre el día 29 al 57 post-inseminación, además, reduce la incidencia de ovulación múltiple (Bisinotto *et al.*, 2015). Sin embargo, las respuestas de fertilidad a la administración de progesterona durante los protocolos de IATF han sido inconsistentes; en la mayoría de los casos se han observado un efecto benéfico de la presencia de un cuerpo lúteo al inicio de los programas (Bisinotto *et al.*, 2011).

Adicional a lo anterior, la suplementación de progesterona evita la luteólisis prematura, lo cual también se puede reflejar en un incremento del porcentaje de concepción (Bisinotto *et al.*, 2015).

2.5.3 Día del ciclo estral

El día del ciclo estral en el cual se inicia el protocolo del Ovsynch determina la tasa de ovulación con la primer inyección de GnRH, lo cual afecta la sincronización de la ovulación después de segunda inyección de GnRH, así como, el tamaño del folículo ovulatorio y, en consecuencia, el porcentaje de concepción.

Para que la oleada folicular se sincronice y el programa de IATF genere buenos resultados, es necesario que después de la primera inyección de GnRH ovule el folículo dominante. El tratamiento con GnRH, en las vacas que están en diferentes días del ciclo estral, induce la ovulación entre 50 y 70% de las vacas (Pursley *et al.*, 1995; Bisinotto y Santos, 2012). La mayor respuesta ovulatoria se logra cuando el tratamiento se realiza entre los días 6 a 7 del ciclo estral (Wiltbank *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Vasconcelos *et al.* (1999) en donde iniciaron el protocolo en días conocidos del ciclo estral (1-4, 5-9, 10-16, 17-21 d) se obtuvo un porcentaje global de ovulación de 64% después de la primer inyección de GnRH, con una variación significativa debida al día del ciclo estral en el cual se inyectó la GnRH. Así, las vacas con la menor tasa de ovulación fueron las del grupo que inició el protocolo entre los días 1-4 del ciclo estral (23%), mientras que las vacas inyectadas entre los días 5 a 9 tuvieron la más alta tasa de ovulación (96%). Con el propósito de que las vacas reciban la primera inyección de GnRH en dichos días, es necesario

que estén enroladas en un programa de presincronización. Es conveniente reiterar que si se inicia un programa de IATF en animales que estén en diferentes etapas del diestro (temprano, medio o tardío) los resultados serán pobres.

Moreira *et al.* (2001) realizaron un trabajo en donde aplicaron dos inyecciones de PGF2 α con un intervalo de catorce días, y comenzaron el protocolo de Ovsynch doce días después de la segunda inyección de PGF2 α , con lo cual mejoraron la tasa de gestación. Esta respuesta se presenta debido a que las vacas se encuentran en la etapa temprana del diestro al momento de iniciar el protocolo de inseminación a tiempo fijo. Por su parte, Galvão *et al.* (2007) compararon dos intervalos de presincronización previo a la primera inyección de GnRH (14 vs 11 días); y obtuvieron mejores resultados en fertilidad en el grupo de vacas con menor intervalo, lo cual se debe a que hay una mayor proporción de vacas con cuerpo lúteo al momento de la inyección de la PGF2 α del Ovsynch.

Es importante mencionar que existe un efecto entre el día del ciclo estral y el tamaño del folículo ovulatorio, lo que influye directamente en la tasa de gestación después de la inseminación artificial. Cuando las vacas son tratadas en la fase temprana o tardía del ciclo estral, los folículos ovulatorios son grandes, mientras que las vacas tratadas en la fase media del ciclo estral (días 5-13) tienen folículos ovulatorios pequeños (Vasconcelos *et al.*, 1999). Las vacas que ovulan folículos grandes tienen menor probabilidad de quedar gestantes en comparación con vacas que ovulan folículos pequeños (Vasconcelos *et al.*, 1999; Gümen *et al.*, 2003).

En conclusión, los protocolos de IATF son más eficientes cuando se inician entre los días 6 a 7 del ciclo estral (Wiltbank *et al.*, 2006), ya que en esta etapa del ciclo estral tienen una probabilidad mayor de ovular en respuesta a la GnRH exógena (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006), y tienen una reducida ocurrencia de luteólisis espontánea antes del final del protocolo de IA (Moreira *et al.*, 2001; El-Zarkouny *et al.*, 2004). Además de un mayor porcentaje en la sincronización del estro, con lo cual se asegura que el desarrollo del folículo ovulatorio se lleva a cabo en presencia de concentraciones elevadas de progesterona y se limita la duración del folículo dominante, todos estos son factores importantes que afectan

directamente la fertilidad (Cerri *et al.*, 2009; Bisinotto *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010).

2.5.4 Luteólisis

El cuerpo lúteo (CL) es de los pocos órganos que tienen una fase de crecimiento, desarrollo y regresión. El CL alcanza su tamaño máximo entre el séptimo y octavo día del diestro. En esta fase se incrementan las concentraciones de progesterona, llegando a su máximo nivel al día 13 del ciclo (Taylor y Rajamahendran, 1991), y se mantienen elevadas hasta el día 17-18 (Britt *et al.*, 1981; Moore y Thatcher, 2006). Dentro de los protocolos convencionales de IATF, el tiempo que transcurre entre la inducción de la ovulación del folículo dominante con GnRH y la inducción de la luteólisis con PGF2 α , es suficiente para que el CL formado por la inyección de GnRH sea sensible a la PGF2 α (CL entre los días 6 y 7) (Nascimento *et al.*, 2014). Aún cuando los cuerpos lúteos inducidos con la inyección de GnRH teóricamente son sensibles a la PGF2 α , se ha observado falla en la luteólisis en un rango del 5 al 30% (luteólisis incompleta) (Moreira *et al.*, 2000; Gumen *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2007; Brusveen *et al.*, 2009), lo cual ocasiona que las vacas presenten concentraciones suprabasales de progesterona al momento de la inseminación.

Por otra parte, para evitar que ovulen folículos con demasiados días de dominancia, se ha buscado acortar el tiempo entre la primera inyección de GnRH y la administración de la PGF2 α . Así, se desarrolló un programa en el cual a las vacas se les inserta un dispositivo intravaginal liberador de progesterona durante cinco días. El día de la inserción reciben la primera inyección de GnRH y al momento de retirar el dispositivo se les inyecta PGF2 α , la cual se repite 24 h después (Bridges *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012). La repetición de la PGF2 α tiene como propósito asegurar la luteólisis, ya que la dosis luteolítica estándar de PGF2 α no es suficiente para provocar la regresión lútea en cuerpos lúteos inmaduros (día 4 a 5 posovulación).

Nascimento *et al.* (2014) llevaron a cabo un estudio en el cual aplicaron distintos tratamientos con PGF2 α [dosis normal (25 μ g), dos inyecciones con diferencia de 8 h, una sola inyección con una dosis doble (50 μ g)] en vacas con un cuerpo lúteo de

la edad equivalente a las vacas del presente estudio, y en ambos casos la luteólisis fue incompleta. Este fenómeno puede influir en la fertilidad de los programas de IATF.

2.5.5 Infecciones uterinas

En el ganado lechero las infecciones uterinas clínicas y subclínicas afectan la eficiencia reproductiva, lo que se ve reflejado en un intervalo parto-concepción más largo, disminución en el porcentaje de concepción al primer servicio, reducción en la tasa de inseminación y aumento del periodo del parto a la primera ovulación (Lima *et al.*, 2013).

La contaminación postparto del lumen uterino es prácticamente inevitable. Alrededor de 80 a 100% de las vacas presentan una carga bacteriana en las primeras dos semanas postparto (Sheldon *et al.*, 2006). El riesgo de infección se incrementa en vacas con partos gemelares, muerte fetal, distocia y retención placentaria (LeBlanc, 2008). Entre las bacterias patógenas más comunes se encuentran *Escherichia coli*, *Truperela pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica* y *Proteus spp.*, la presencia de estas bacterias causa endometritis clínica o subclínica y moco vaginal purulento (Sheldon *et al.*, 2009), lo que compromete la función uterina, además de alterar los centros de control de liberación de las hormonas GnRH y LH (hipotálamo e hipófisis), y por consecuencia se retrasa la primera ovulación posparto (Peter y Bosu, 1988; Mateus *et al.*, 2003; Peter *et al.*, 2009). Los efectos secundarios de la infección uterina en el tracto reproductivo puede desencadenar una respuesta inflamatoria e inmune (Sheldon y Dobson, 2004) que compromete el bienestar animal y puede causar subfertilidad, y en el peor de los casos infertilidad.

Las infecciones causan daños en las distintas capas del útero, lo que se asocia con un bajo rendimiento reproductivo. De igual manera, la presencia de *T. pyogenes* o bacterias anaerobias son un factor de riesgo que reducen la fertilidad. La endometritis causa infertilidad durante el tiempo que la infección está presente, y después de controlar la enfermedad es muy común que se presente un periodo de subfertilidad (Sheldon y Dobson, 2004).

Alrededor del 80% de las vacas son capaces de afrontar y resolver por sí solas la contaminación bacteriana, sin embargo, aproximadamente el 20% restante desarrollan un cuadro de metritis dentro de los 21 días postparto. En vacas con persistencia de bacterias patógenas mayor a tres semanas se desarrolla un cuadro de endometritis clínica (LeBlanc, 2008; Walsh *et al.*, 2011). Recientemente se han diagnosticado casos de endometritis subclínica (ES), la cual afecta entre 20 y 50% de las vacas y disminuye la fertilidad en el primer servicio. En las vacas que padecen endometritis subclínica y son enroladas a los programas de IATF en el primer servicio postparto se observa una reducción del porcentaje de concepción [gestaciones en el día 60 (sanas= 40% vs ES= 25%) y se incrementa la pérdida de gestaciones entre el día 32 y 60 de preñez (sanas= 9.6% vs ES=44%) (Lima *et al.*, 2013).

Fourichon *et al.* (2000) realizaron un meta análisis de 23 estudios y encontraron que vacas que padecieron endometritis después del parto aumentaron 15 días en promedio los días abiertos, lo que disminuye en 31% la probabilidad de que estas vacas se encuentren gestantes a los 150 días en leche, y se reduce la tasa de gestación en 16%. Por otro lado, las vacas que son tratadas con éxito tienen tasas de concepción 20% más bajas en comparación con animales sanos y de este número aproximadamente 3% de las vacas que desarrollan alguna infección uterina son eliminadas de las explotaciones lecheras (Sheldon *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2011).

La PGF2 α tiene un papel importante dentro de la prolongación del anestro después de una infección uterina, ya que las altas concentraciones circulantes de esta hormona en las primeras tres semanas postparto sirven como una señal del útero, que retarda el inicio de la ciclicidad ovárica hasta que la infección puerperal ha sido controlada o eliminada (Peter y Bosu, 1990; Peter *et al.*, 2009).

Además de los efectos sobre la fertilidad, las infecciones uterinas se asocian con una disminución en los niveles de producción láctea y pérdidas económicas por conceptos de infertilidad (intervalo entre partos, número de servicios, baja expresión de estros, etc.) y costo de los tratamientos (Sheldon y Dobson, 2004).

2.5.6 Manejo de los protocolos

Los programas de IATF requieren un manejo sistemático de las vacas y de diferentes hormonas en horarios específicos (am y pm) por parte del personal, esto puede crear conflictos en los horarios de trabajo de los hatos lecheros. Además, durante el verano, los productores prefieren realizar el manejo de las vacas por la mañana, con el fin de reducir el estrés calórico. Por estas razones en muchos casos no se respeta el intervalo de 16 horas que se necesita entre la segunda inyección de GnRH y la inseminación dentro del protocolo de Ovsynch (Jordan *et al.*, 2002). Generalmente se manejan varios grupos de animales que están en diferentes lotes, ya que cada semana se enrolan nuevas vacas al programa. En este contexto, el riesgo de error en la administración de los tratamientos es alto si no se cuenta con un personal bien entrenado y comprometido con el trabajo. Se estima que 20% de las vacas enroladas en programas de IATF no terminan el protocolo correctamente, lo cual se debe a aspectos de manejo de los hatos con grandes poblaciones de vacas en producción (Jordan *et al.*, 2002).

De acuerdo con la revisión de la literatura, el programa con progesterona generaría mejores resultados que el programa básico de Ovsynch; sin embargo, no hay suficientes estudios de campo en los cuales se contrasten dichos programas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue comparar el porcentaje de concepción entre vacas de primer servicio inseminadas mediante el programa básico de Ovsynch y un programa de Ovsynch con cinco días de progesterona.

3. Material y Métodos

3.1 Manejo del hato

El estudio se realizó entre los meses de octubre de 2013 y enero de 2014, en un hato lechero ubicado en Aguascalientes, Ags. El clima de la región es semiseco, con una temperatura media anual de 17.4°C y una precipitación pluvial media de 526 mm.

El establo cuenta con 3200 vacas Holstein en producción, se ordeña tres veces al día y la producción media por lactación es de 9500 kg. Las vacas están en corrales con cubículos de libre acceso y áreas de piso de tierra. Las vacas se alimentan dos veces al día con una ración totalmente mezclada, la cual cumple con los requerimientos recomendados en el NRC (2001).

3.2 Diseño del experimento

Se utilizaron 275 vacas de diferente número de partos, de condición corporal mayor de 2 (escala de 1 a 5). Todas las vacas fueron presincronizadas con dos inyecciones i.m. de PGF2 α (Enzaprost®, Ceva Salud Animal, México) con intervalo de 14 días a partir de los 32 \pm 3 días posparto (DPP); doce días después de la segunda inyección de PGF2 α (58 \pm 3 DPP), se asignaron de forma aleatoria a los siguientes tratamientos: Ovsynch (n=144) recibieron una inyección i.m. de GnRH (Cevarelin®, Ceva Salud Animal, México) a las 8 am; siete días después las vacas recibieron una inyección i.m. de PGF2 α (Enzaprost®) (65 \pm 3 DEL; 8 am); 56 h más tarde recibieron una segunda inyección i.m. de GnRH (67 \pm 3 DEL; 4 pm) y se inseminaron a tiempo fijo 16 h después (68 \pm 3 DEL; 8 am). Grupo PRID 5d (n=131) recibieron una inyección i.m. de GnRH (Cevarelin®) a las 8 am y un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (PRID Delta®, Ceva Salud Animal, México), el cual permaneció *in situ* durante cinco días; al momento de retirar el dispositivo (63 \pm 3 DPP; 8 am) se aplicó una inyección i.m. de PGF2 α y 24 h después se administró una segunda inyección i.m. de PGF2 α ; 56 h después de retirar el dispositivo se aplicó la segunda dosis de GnRH (65 \pm 3 DPP 4 pm) y se inseminó a tiempo fijo 16 h después (66 \pm 3 DPP; 8am). (Figura 6).

Después de la segunda inyección de PGF2 α durante la presincronización, a todas las vacas se les colocó un parche para la detección de la monta y se determinó la proporción de vacas que mostraron estro. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación rectal entre 45 y 50 días posinseminación.

3.3 Análisis estadístico

Se comparó el PC mediante un análisis de regresión logística con el programa JMP (versión 9.0 de SAS). Las variables independientes fueron: tratamiento (PRID 5d vs Ovsynch), producción láctea (≤ 40 kg vs > 40 kg), técnico inseminador (1 vs 2), tipo de puerperio (normal vs anormal) número de partos (primíparas vs multíparas) y respuesta estral después de la segunda inyección de PGF2 α de la presincronización (si vs no).

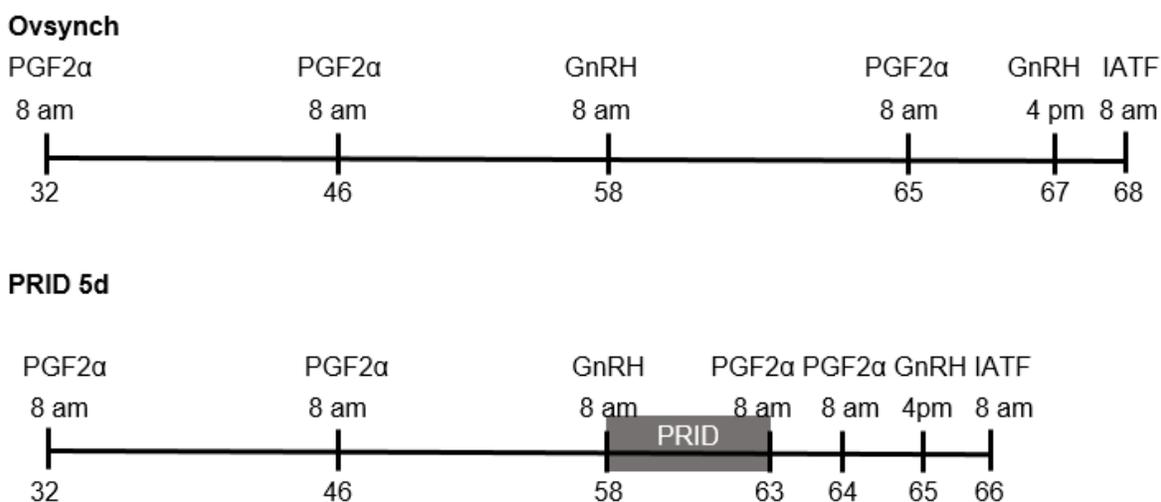


Figura 6. Descripción esquemática de los tratamientos.

4. Resultados

El porcentaje de concepción fue similar entre los tratamientos (21 vs 27%; PRID5d y Ovsynch, respectivamente). No se observó efecto de la producción de leche, del número de partos, del técnico inseminador, ni del tipo de puerperio sobre el porcentaje de concepción (cuadro 1); asimismo, no se encontró un efecto de la interacción de estas variables con el tratamiento en el PC ($P > 0.1$).

La proporción de vacas que mostraron estro después de la inyección de PGF2 α previa al inicio de la sincronización de la ovulación (primera inyección de GnRH) fue similar entre los tratamientos [78 (102/131) vs 77% (111/144), PRID y Ovsynch, respectivamente]. La presentación del estro previo a la primera inyección de GnRH no afectó el PC (cuadro 1) y no hubo interacción de esta variable con el tratamiento ($P > 0.1$).

Cuadro 1. Odds ratio para la probabilidad de gestación dependiente del tratamiento, producción de leche, técnico inseminador, tipo de puerperio y número de partos.

Tratamiento	n	PC	Odds ratio	IC 95%		P
Ovsynch	144	27	Referencia			
PRID	131	21	0.720	0.408	1.273	0.2586
Número de Parto						
Múltiparas	166	20	Referencia			
Primíparas	109	31	1.507	0.787	2.884	0.2160
Producción Láctea						
> 40 kg	101	19	Referencia			
≤ 40 kg	174	28	1.507	0.652	2.603	0.4539
Inseminador						
2	155	21	Referencia			
1	120	28	1.383	0.777	2.462	0.2705
Puerperio						
Patológico	50	26	Referencia			
Normal	225	24	0.787	0.379	1.634	0.5209
Estro PGF2 α *						
No	62	16	Referencia			
Si	213	27	1.723	0.811	3.660	0.1571

5. Discusión

En el presente estudio se esperaba que la inclusión de progesterona en el grupo PRID5d mejorara la fertilidad; sin embargo, el PC fue similar al obtenido con el programa básico de Ovsynch. Por otra parte, la fertilidad global lograda en ambos tratamientos es igual a la obtenida en programas de sincronización similares (Meléndez *et al.*, 2006) y coincide, también, con la obtenida en la inseminación a esto observado (Flores *et al.*, 2013; Orozco *et al.*, 2014).

Se preveía que las vacas en el protocolo de PRID5d tuvieran mayor PC que las vacas que no recibieron progesterona, ya que la evidencia experimental así lo indicaba. En diversos estudios, la administración de progesterona durante la sincronización de la oleada folicular y la maduración del folículo ovulatorio ha mejorado el PC (Stevenson *et al.*, 2006; Bridges *et al.*, 2008; Wiltbank *et al.*, 2012b). Asimismo, las vacas que están ciclando y que tienen un cuerpo lúteo al momento de la primera inyección de GnRH tienen mayor fertilidad que aquellas vacas que están en anestro (Stevenson *et al.*, 2008; Bisinotto *et al.*, 2010). No obstante, en el presente estudio las vacas que recibieron progesterona no mostraron mayor PC. La causa de estos resultados se desconoce; sin embargo, en los siguientes párrafos se exponen algunas posibilidades.

El tiempo de dominancia del folículo ovulatorio en los programas de Ovsynch influye en la fertilidad. La ovulación de folículos muy pequeños, es decir folículos que alcanzan la dominancia muy cerca del momento de la inducción de la regresión lútea, pueden generar concentraciones bajas de estradiol e incremento de la regresión prematura del cuerpo lúteo del ciclo estral subsiguiente (fases lúteas cortas) y pérdidas de gestaciones (Vasconcelos *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005; Dadarwal *et al.*, 2013). Por el contrario, la ovulación de folículos con periodos largos de dominancia (folículos demasiado grandes) también afectan la fertilidad, posiblemente debido a que los ovocitos liberados tienen menor competencia para desarrollar embriones viables (Vasconcelos *et al.*, 1999; Townson *et al.*, 2002; Bleach *et al.*, 2004; Cerri *et al.*, 2009). En protocolos tanto en ganado de carne (Bridges *et al.*, 2008; Kasimanickam *et al.*, 2009; Dadarwal *et al.*, 2013) como de leche (Rabaglino *et al.*, 2010; Bisinotto *et al.*, 2010 y 2013), la reducción del periodo

de dominancia del folículo ovulatorio mediante la disminución de dos días entre la primera inyección de GnRH y la administración de PGF2 α (7 versus 5 días) y el alargamiento del proestro de 56 h a 72 h (periodo entre la PGF2 α y la segunda inyección de GnRH), ha favorecido el PC. La ausencia de una mejora del PC en el presente trabajo probablemente radica en que el periodo entre la PGF2 α y la segunda inyección de GnRH fue de 56 h mientras que en los estudios citados fue de 72 h. Esta diferencia temporal pudo haber influido en las características del folículo ovulatorio dando como consecuencia la ovulación de un folículo de menor tamaño, lo cual se asocia con reducción de la fertilidad (Mussard *et al.*, 2007; Bridges *et al.*, 2010; Dadarwal *et al.*, 2013).

Por otra parte, una desventaja de la reducción del periodo entre la primera inyección de GnRH y la administración de PGF2 α (5 días) es que el cuerpo lúteo formado después de la ovulación inducida con la GnRH sea resistente al efecto de la PGF2 α (Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2014). Aún en el programa básico de Ovsynch en el que transcurren 7 días entre la GnRH y la PGF2 α , se ha observado falla en la luteólisis en un rango del 5 al 30% (luteólisis incompleta) (Moreira *et al.*, 2000; Gumen *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2007; Brusveen *et al.*, 2009), lo cual ocasiona que las vacas presenten concentraciones suprabasales de progesterona al momento de la inseminación. Concentraciones de progesterona mayores de 0.3 a 0.5 ng/mL al momento de la inseminación están relacionadas con bajos porcentajes de concepción (Souza *et al.*, 2007; Brusveen *et al.*, 2009). Se han evaluado tratamientos con dos inyecciones de PGF2 α con diferencia de 8 h o una sola inyección con una dosis doble de PGF2 α en vacas con un cuerpo lúteo de la edad equivalente a las vacas del presente estudio, y en ambos casos la luteólisis ha sido incompleta (Nascimento *et al.*, 2014). Aunque en el presente trabajo las vacas del grupo PRID5d recibieron dos inyecciones de PGF2 α con 24 horas de diferencia, no se debe descartar que una falla en la luteólisis haya impedido que las vacas de este grupo mostraran un incremento de la fertilidad.

Es posible, también, que la ausencia de un efecto positivo en las vacas que recibieron el PRID Delta se deba a que la complementación con progesterona favorece la ciclicidad y la fertilidad especialmente en vacas que aún no han iniciado

su actividad ovárica posparto (Bisinotto *et al.*, 2013; Wiltbank y Pursley, 2014). En el presente trabajo, la proporción de vacas que mostraron estro después de la inyección de PGF2 α previa a la sincronización de la ovulación fue similar entre grupos (77 vs 78%; Ovsynch y PRID5d, respectivamente), lo cual indica que una alta proporción de ellas estaba ciclando y tendrían, hipotéticamente, un cuerpo lúteo al inicio del programa Ovsynch. En estas condiciones, el efecto esperado por la adición de progesterona en el protocolo de sincronización pudo ser insignificante. En un siguiente estudio, se tendrían que comparar ambos protocolos en vacas anéstricas.

El PC en ambos tratamientos es consistente con el obtenido en programas de sincronización similares (Meléndez *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2009; Bisinotto *et al.*, 2013). De igual manera, el PC de los programas evaluados es similar al obtenido cuando las vacas se inseminan después de la observación del estro (Flores *et al.*, 2013; Orozco *et al.*, 2014). No obstante, los programas evaluados en el presente estudio generaron una tasa de preñez del doble a la obtenida en el mismo hato en vacas contemporáneas que se inseminaron cuando fueron detectadas en estro. La tasa de preñez es un parámetro reproductivo más completo, ya que comprende la eficiencia en la detección de estros y el PC (Ferguson y Galligan, 1999). Así, en el presente estudio durante los primeros 70 días posparto, 40% de las vacas contemporáneas elegibles para inseminarse se detectaron en estro y se sirvieron, mientras que en los programas de inseminación a tiempo fijo evaluados se inseminó al 100% de las vacas elegibles. Con estos números, la tasa de preñez global del presente trabajo fue de 24% mientras que en las vacas inseminadas a estro observado fue de 12% (se consideró en esta estimación el promedio del PC de los dos tratamientos: 24%). Cabe mencionar que la tasa de preñez en México fluctúa de 12 a 15% (Hernández-Cerón y Gutiérrez, 2007) y es similar a lo observado en Estados Unidos (De Vries, 2006; Galvão *et al.*, 2013). Esta diferencia en la tasa de preñez podría justificar económicamente dichos programas de inseminación a tiempo fijo. En un estudio reciente hecho en México, se estimó la consecuencia económica de los cambios en la tasa de preñez en un hato lechero de manejo intensivo mediante la metodología Montecarlo y se encontró que por cada punto

porcentual que se incremente la tasa de preñez en el rango de 15 a 20%, se genera un ingreso adicional de \$748.00 por vaca al año (Ríos *et al.*, 2011).

Por otra parte, algo que conviene resaltar del presente estudio es que la producción de leche no afectó el porcentaje de concepción. Si bien en los últimos 30 años se ha observado una asociación entre el incremento de la producción de leche y la disminución de la fertilidad (Lucy *et al.*, 2001), no necesariamente las vacas que producen más leche son menos fértiles. López-Gatius *et al.* (2006) encontraron que las vacas que produjeron más leche (>50 kg) en el día 50 posparto fueron más fértiles. Aunque en el presente estudio no se encontró un resultado similar al citado, no se observó una disminución de la fertilidad en las vacas que produjeron más de 40 kg de leche en comparación con las vacas que produjeron menos 40 kg.

Se concluye que el porcentaje de concepción no difiere entre vacas de primer servicio inseminadas mediante el programa básico de Ovsynch o un programa de Ovsynch con cinco días de progesterona.

6. Agradecimientos

Este estudio fue financiado en parte por el proyecto IN219811-3 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los autores agradecen al propietario del Rancho Montoro (Aguascalientes, México) su apoyo y a Ceva Salud Animal, México por la donación de los productos hormonales.

7. Literatura Citada

Ahmad N, Townsend EC, Dailey RA, Inskeep EK. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim Reprod Sci* 1997; 49:13-28.

Alnimer MA, Tabbaa MJ, Ababneh MM. Applying variations of the ovsynch protocol at the middle of the estrus cycle on reproductive performance of lactating dairy cows during summer and winter. *Theriogenology* 2009; 72:731-740.

Anderson LH, Day M.L. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol acetate. *J Anim Sci* 1994; 72:2955-2961.

Ayres H, Ferreira RM, Cunha AP, Araújo RR, Wiltbank MC. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology* 2013; 79:159–164

Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83:479-486.

Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. optimizing ovulation to first gnrh improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89:3413-3424.

Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JE. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 2010a; 93:3578-87.

Bisinotto RS, Ribeiro ES, Martins LT, Marsola RS, Greco LF, Favoreto MG, Risco CA, Thatcher WW, and Santos JEP. Effect of interval between induction of ovulation

and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J Dairy Sci* 2010b; 93:5798–5808.

Bisinotto RS, Santos JEP. The use of endocrine treatment to improve pregnancy rates in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 2012; 24:258-266.

Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Martinez N, Greco LF, Barbosa LFSP, Bueno PP, Scagion LFS, Thatcher WW, and Santos JEP. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *J Dairy Sci* 2013; 96:2214–2225.

Bisinotto RS, Pansani MB, Castro LO, Narciso CD, Sinedino LDP, Martinez N, Carneiro PE, Thatcher WW, Santos JEP. Effect of progesterone supplementation on fertility responses of lactating dairy cows with corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol. *Theriogenology* 2015; 83:257-265.

Bleach EC, Glencross RG, Knight PG. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reproduction* 2004; 127:621-629.

Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995; 43:31-40.

Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 2008; 69:843–851.

Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci* 2010; 117:208–215.

Britt JH, Cox NM, Stevenson JS. Advances in reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1981; 64:1378-1402.

Brusveen DJ, Souza AH, and Wiltbank MC. Effects of additional prostaglandin F_{2α} and estradiol-17β during Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2009; 92:1412–1422.

Cerri RLA, Santos JEP, Juchem SO, Galvão KN, Chebel RC. Timed Artificial Insemination with Estradiol Cypionate or Insemination at Estrus in High-Producing Dairy Cows. *J Dairy Sci* 2004; 87:3704-3715.

Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS, Santos JEP. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim Reprod Sci* 2009; 110:56-70.

Cerri RL, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Amstalden M, Baez-Sandoval GM, Oliveira LJ, Thatcher WW, Santos JEP. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J Dairy Sci* 2011; 94:3352–3365.

Chebel RC, Al-Hassan MJ, Fricke PM, Santos JEP, Lima JR, Martel CA, Stevenson JS, Garcia R, Ax RL. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93:922-931.

Colazo MG, Dourey A, Rajamahendran R, Ambrose DJ. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per

AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2013; 79:833-841.

Dadarwal D, Mapletoft RJ, Adams GP, Pfeifer LFM, Creelman C, Singh J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2013; 79:859–866.

Denicol AC, Lopes Jr G, Mendonça LGD, Rivera FA, Guagnini F, Perez RV, Lima JR, Bruno RGS, Santos JEP, Chebel RC. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2012; 95:1794-1806.

De Vries A. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006; 89:3876–3885.

Díaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ α production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 191 65-80.

Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. Exogenous hormonal manipulation of ovarian in cattle. *Dom Anim Endo* 2002; 23:211-228.

El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J Dairy Sci* 2004; 87:1024–1037.

Endo N, Nagai K, Tanaka T, Kamomae H. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim Reprod Sci* 2012; 134:112-118.

Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 1996; 25:800-805.

Ferguson JD, Galligan DT. Veterinary Reproductive Programs. Proc. Annual Conference of the AABP, Auburn, AL; 1999, 131–137.

Flores JOA, Roque VCI, López OR, Benítez SS, Oropeza AMA, Hernández-Cerón J. Porcentaje de concepción en vacas lecheras tratadas con progesterona cinco días después de la inseminación. *Rev Mex Cienc Pecu* 2013; 4:507-514.

Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, Wilk JC, Rakes AH. Reproductive traits of holsteins and jerseys. effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 1983; 66:1128-1147.

Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 2000; 53:1729-1759.

Galvão KN, Sá Filho MF, Santos JEP. reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90:4212-4218.

Galvão KN, Federico P, De Vries A, and Schuenemann GM. Economic comparison of reproductive programs for dairy herds using estrus detection, timed artificial insemination, or a combination. *J Dairy Sci* 2013; 96:2681–2693.

Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003; 78:239–257.

Gümen A, Guenther JN, Wiltbank MC. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003; 86:3184–3194.

Gümen A, Keskin A, Yilmazbas-Macitoglu G, Karakaya E, Alkan A, Okut H, Wiltbank MC. Effect of presynchronization strategy before ovsynch on fertility and first service in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2012; 78:1830-1838.

Hernández-Cerón J y Gutiérrez CG. Factores asociados con la infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos de producción. *Ciencia Veterinaria* 2007; 10:71-91.

Hillegass J, Lima FS, Sá Filho MF, Santos JEP. Effect of time of artificial insemination and supplemental estradiol on reproduction of lactating dairy cows

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 23-32.

Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod* 2004; 71:1244-1251.

Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 2009; 72:81-90.

Jordan ER, Schouten MJ, Quast JW, Belschner AP, Tomaszewski MA. Comparison of two timed artificial insemination (TAI) protocols for management of first insemination postpartum. *J Dairy Sci* 2002; 85:1002-1008.

Kasimanickam R, Day ML, Rudolph JS, Hall JB, and Whittier WD. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology* 2009; 71:762-767.

LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *The Veterinary Journal* 2008; 176:102-114.

Lima JR, Rivera FA, Narciso CD, Oliveira R, Chebel RC, Santos JEP. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2009; 92:5436–5446.

Lima FS, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Greco LF, Ayres H, Favoreto MG, Carvalho MR, Galvão KN, Santos JEP. Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin F₂α on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2013; 96: 6480-6488.

López-Gatius F, García-Ispuerto I, Santolaria P, Yániz J, Nogareda C, López-Béjar M. Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 2006; 65:1678–1689.

López H, Sartori R, Wiltbank MC. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biol Reprod* 2005; 72:788–795.

Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci* 2001; 84:1277–1293.

Lucy MC, McDougall S, Nation DP. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83 495-512.

Lucy MC. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci* 2007; 85:E89-E99.

Mateus L, Lopes da Costa L, Diniz P, Ziecik AJ. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE₂ and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci* 2003; 76:143-154.

McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event *Physiol Rev* 1999; 79:263-323.

McDougall S, Compton C. Reproductive performance of anestrous dairy cows treated with progesterone and estradiol benzoate. *J Dairy Sci* 2005; 88:2388-2400.

Melendez P, Gonzalez G, Aguilar E, Loera O, Risco C, and Archbald LF. Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006; 89:4567–4572.

Moore K, Thatcher WW. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006; 89:1254-1266.

Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, and Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000; 83:1237–1247

Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84:1646-1659.

Mussard ML, Burke CR, Behlke EJ, Gasser CL, and Day ML. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci* 2007; 85:937-943.

Nascimento AB, Souza AH, Keskin A, Sartori R, Wiltbank MC. Lack of complete regression of the day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF₂ α in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology* 2014; 81:389–395.

NRC. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised edition. Washington, DC, USA: National Academy Press; 2001.

Orozco M, Gutierrez CG, Lopez OR, Aguilar C, Roque VCI, Hernandez-Ceron J. Oestral response and fertility in dairy cows treated with progesterone for 6 days prior to oestrus synchronization with prostaglandin F₂ α . *Reproduction, Fertility and Development* 2014, 26, 118.

Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, and Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:5268-5723.

Peter AI, Bosu WIK. Influence of intrauterine infections and follicular development on the response to GnRH administration in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 1988; 29:1163-1175.

Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 2009; 71:1333-1342.

Pursley JR, Mee MO, and Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44:915-923.

Pursley JR, Kosorok MR, and Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 1997; 80: 301-306.

Pursley JC, Whitter JP. Efecto del cuerpo lúteo accesorio en la luteolisis completa y subsecuente tasa de concepción en vacas que son tratadas con protocolos que

mejoran la ovulación a la primera GnRH del Ovsynch. Memorias IX Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC 2011.

Rabaglino MB, Risco CA, Thatcher MJ, Lima F, Santos JEP, Thatcher WW. Use of five-day progesterone-based timed AI protocol to determine if flunixin meglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. *Theriogenology* 2010, 73:1311-1318.

Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1996; 106:39–47.

Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Invited Review: Treatment of Cows with an Extended Postpartum Anestrous Interval. *J Dairy Sci* 2003; 86:1876-1894.

Ribeiro ES, Bisinotto RS, Favoreto MG, Martins LT, Cerri RLA, Silvestre FT, Greco LF, Thatcher WW, Santos JEP. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F_{2α} as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012; 78:273-284.

Ríos MJA, Hernández-Cerón J, López DCA, Trueta SR. Estimación de la utilidad por vaca al año de acuerdo con los cambios en la tasa de preñez en hatos lecheros en sistemas de producción intensiva [resumen]. XXXV Congreso Nacional de Buiatría. León, Gto 2011 286.

Roche J. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 2006; 96:282-296.

Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85:2831-2842.

Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83:513-535.

Santos JEP, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol in reproduction of dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93:2976-2988.

Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004; 87:905-920.

SAS.SAS User's Guide: Statistic (Version 9.3). Cary NC, USA Inst. Inc., 2010.

Senger PL. The Estrus Detection Problem: New Concepts, Technologies, and Possibilities *J Dairy Sci* 1994; 9:2745-2753.

Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:295-306.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65:1516-1530.

Smith GW, Meidan R. Review Article: Ever-changing cell interactions during the lifespan of the corpus luteum: relevance to luteal regression. *Rep Bio* 2014; 14:75-82.

Souza AH, Gümen A, Silva EPB, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ, and Wiltbank MC. Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90:4623–4634.

Stevenson JS, Pursley JR, Garverick Ha, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, and Wiltbank MC. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during ovsynch. *J Dairy Sci* 2006; 89; 2567-2578.

Stevenson JS, Tenhouse De, Krisher RL, Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR, Pursley JR, Bello NM, Fricke PM, Wiltbank MC, Brusveen DJ, Burkhart M, Youngquist RS, and Garverick HA. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J Dairy Sci* 2008; 91:2901-2915.

Taylor C, Rajamahendran R. follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J Dairy Sci* 1991; 74:115-123.

Townson DH, Tsang PCW, Butler WR, Frajblat M, Griel LC, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM, and Pate JL. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J Anim Sci* 2002; 80:1053–1058.

Tysseling KA, Thatcher WW, Bazer FW, Hansen PJ, Mirando MA. Mechanisms regulating prostaglandin F $_{2\alpha}$ secretion from the bovine endometrium. *J Dairy Sci* 1998; 81:382-389.

Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999; 52:1067-1078

Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, WiltbankMC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001; 56:307-314.

Vasconcelos JL, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 2003; 60: 795-807.

Watts TL, Fuquay JW. Response and fertility of dairy heifers following injection with prostaglandin F₂ α during early, middle or late diestrus. *Theriogenology* 1985; 23:655-661.

Weems CW, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 2006; 171:206-228.

Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 2006; 65:17-29.

Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JL, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN, Gumen A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2011; 76:1568-1582.

Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012a; 24:238-243.

Wiltbank MC, Souza AH, Giordano JO, Nascimento AB, Vasconcelos JM, Pereira MHC, Fricke PM, Surjus RS, Zinsly FCS, Carvalho PD, Bender RW, Sartori R. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod* 2012b; 9:231-241.

Wiltbank MC, Purrsley JR. The cow as an induced ovulatory: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 2014; 81:170-185.