

# Gestación en vacas lecheras con dos protocolos de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo

## Pregnancy in dairy cows with two protocols for synchronization of ovulation and timed artificial insemination

Silvano Flores Domínguez<sup>a</sup>, Luis Ramón Muñoz Flores<sup>a</sup>, Reyes López Ordaz<sup>b</sup>, Carlos Fernando Aréchiga Flores<sup>c</sup>, Gabriela Mapes<sup>d</sup>, Joel Hernández Cerón<sup>a</sup>

### RESUMEN

Se comparó la tasa de gestación (TG) en vacas lecheras inseminadas a tiempo fijo mediante dos protocolos. El día 32 posparto, 275 vacas recibieron dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  con intervalo de 14 días. Doce días después de la segunda inyección, se asignaron a los siguientes tratamientos: 1) Ovsynch (n=144) recibieron GnRH; siete días después PGF2 $\alpha$ ; 56 h más tarde GnRH y se inseminaron 16 h después 2) PRID5d (n=131) recibieron GnRH y un dispositivo intravaginal liberador de progesterona durante cinco días; al retirar el dispositivo, se aplicaron dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  con intervalo de 24 h; 56 h posterior al retiro del dispositivo, se aplicó GnRH y se inseminaron 16 h después. La gestación se diagnosticó por palpación rectal el día 45 posinseminación. Se comparó la TG mediante regresión logística. Las variables independientes fueron: tratamiento (Ovsynch vs PRID5d), producción láctea ( $\leq 40$  vs  $> 40$  kg), técnico inseminador (1 vs 2), tipo de puerperio (normal vs anormal), partos previos (primíparas vs múltiparas) y si mostraron estro en la presincronización. La TG fue similar ( $P > 0.1$ ) entre los tratamientos (27 vs 21 %; Ovsynch y PRID5d, respectivamente). Ninguna de las otras variables independientes afectó la TG ( $P > 0.1$ ); no hubo efecto de la interacción de dichas variables con el tratamiento en la TG ( $P > 0.1$ ). Se concluye que la TG fue similar entre las vacas inseminadas con un protocolo Ovsynch o mediante un protocolo Ovsynch modificado que incluyó 5 días de progesterona y la reducción de 7 a 5 días entre la inyección de GnRH y la PGF2 $\alpha$ .

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

### ABSTRACT

The objective was to compare the pregnancy rate (PR) between two timed AI protocols in dairy cattle. Two hundred seventy-five (275) cows were presynchronized with PGF2 $\alpha$  given 14 d apart beginning at d 32 postpartum; 12 d after second PGF2 $\alpha$ , cows were assigned to two treatments: 1) Ovsynch (n=144) received GnRH, followed 7 d later by PGF2 $\alpha$  and then GnRH 56 h after PGF2 $\alpha$  and cows were inseminated 16 h later 2) PRID5d (n=131), received GnRH and a progesterone-releasing intravaginal device, which remained in place 5 d. Cows received an injection of PGF2 $\alpha$  at the time of progesterone device removal and a second injection of PGF2 $\alpha$  24 h later. At 56 h following progesterone device removal, the next injection of GnRH was given and cows were inseminated 16 h later. Pregnancy diagnosis was performed 45 d after AI by transrectal palpation. PR was compared by logistic regression analysis. Independent variables were: treatment (Ovsynch vs PRID5d), milk yield ( $\leq 40$  vs  $> 40$  kg), technician (1 vs 2), puerperium (normal vs abnormal), parity (primiparous vs multiparous) and standing estrus during presynchronization. PR was similar ( $P > 0.1$ ) between treatments (27 vs 21 %; Ovsynch and PRID5d, respectively). There was no effect of the other independent variables on PR. The interaction of these variables with the treatment did not affect PR ( $P > 0.1$ ). In conclusion, PR was similar in dairy cows inseminated by an Ovsynch protocol or through modified Ovsynch which included progesterone during 5 d and reduction of the interval between the GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 d.

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

Recibido el 9 de diciembre de 2014. Aceptado el 22 de enero de 2015.

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. jhc@unam.mx. Correspondencia al último autor.

<sup>b</sup> División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. México.

<sup>c</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas. México.

<sup>d</sup> Ceva Salud Animal, México.

## INTRODUCCIÓN

La baja eficiencia en la detección de estros que se padece en 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 $\alpha$  (día siete); posteriormente se administra la segunda dosis de GnRH (día nueve) y se insemina 16 h después. La primera inyección de GnRH induce la ovulación o la luteinización de los folículos  $\geq 8$  mm de diámetro, lo cual sincroniza la emergencia de la oleada folicular, de tal forma que al momento de inyectar la PGF2 $\alpha$  las vacas continúan en diestro y tienen un folículo preovulatorio en el mismo estado de desarrollo; con la segunda inyección de GnRH se induce la ovulación, la cual está sincronizada con la inseminación artificial a tiempo fijo<sup>(1)</sup>. La proporción de vacas gestantes del total inseminado [tasa de gestación (TG)] obtenido en este programa es similar al logrado cuando se insemina en el estro observado, ya sea natural o sincronizado con PGF2 $\alpha$ <sup>(1,2)</sup>. 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)<sup>(1,3)</sup>.

No obstante la ordenada 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<sup>(4)</sup>, las características del folículo ovulatorio<sup>(5,6)</sup>, la ciclicidad de las vacas que se enrolan en el programa<sup>(7)</sup>, las concentraciones de progesterona durante el programa<sup>(8,9)</sup>, así como factores de manejo, los cuales determinan que no todas las vacas que inician el programa lo terminen correctamente<sup>(2)</sup>.

## INTRODUCTION

The low efficiency of estrus detection in dairy herds, has motivated the development of artificial insemination (AI) programs without the need to detect cows in estrus. The first program validated with these characteristics is known as Ovsynch and has served as the basis for other schemes. This program begins with an injection of GnRH in early diestrus (day zero), followed by injection of PGF2 $\alpha$  (d 7); subsequently administration of the second GnRH dose (d 9) and insemination occurs 16 h later. The first injection of GnRH induces ovulation or luteinization of  $\geq 8$  mm diameter follicles, which synchronizes the emergence of a follicular wave, so at the moment of the PGF2 $\alpha$  injection cows continue on diestrus and have a preovulatory follicle in the same state of development; with the second injection of GnRH ovulation is induced, which is synchronized with the fixed-time artificial insemination<sup>(1)</sup>. The proportion of pregnant cows of the total inseminated [pregnancy rate (PR)] obtained in this program is similar to that attained when cows are inseminated at observed estrus, either natural or synchronized with PGF2 $\alpha$ <sup>(1,2)</sup>. However, the advantage of the Ovsynch program is that all cows that are enrolled in the program can be inseminated, while in programs of insemination at observed estrus only those detected in estrus are inseminated (between 40 and 60 % from the total eligible)<sup>(1,3)</sup>.

Although the coherent physiological concept of the Ovsynch program, results in dairy herds are not the optimum. Among the most important factors that determine the results are: the stage of the estrous cycle in which the synchronization of the follicular wave starts<sup>(4)</sup>, the characteristics of the ovulatory follicle<sup>(5,6)</sup>, the cyclicity of the cows enrolled in the program<sup>(7)</sup>, the progesterone concentrations during the program<sup>(8,9)</sup>, as well as management factors, which determine that not all cows that start the program complete it correctly<sup>(2)</sup>.

Within the modifications that have been made to optimize the basic Ovsynch protocol it stresses

Dentro de las modificaciones que se han hecho al programa básico de Ovsynch para optimizarlo destaca la inclusión de progesterona<sup>(10-12)</sup>. La combinación con progesterona ha favorecido la TG hasta en diez puntos porcentuales<sup>(8)</sup>, lo cual se relaciona con un mejor ambiente para el desarrollo del folículo ovulatorio<sup>(13)</sup>; 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<sup>(14)</sup>. 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 $\alpha$ . 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 $\alpha$ , la cual se repite 24 h después. La segunda inyección de GnRH se realiza 56 h posterior al retiro del dispositivo y se insemina 16 h después<sup>(10-12)</sup>.

De acuerdo con la información mencionada, el programa con progesterona generaría mejores resultados que el programa básico de Ovsynch; sin embargo, no hay suficientes estudios de campo con vacas productoras de leche en los cuales se contrasten dichos programas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue comparar la TG entre vacas inseminadas mediante el programa Ovsynch común y vacas inseminadas con un programa Ovsynch, en el cual las vacas reciben progesterona durante 5 días y además se reduce de 7 a 5 días el periodo entre la inyección de GnRH y la PGF2 $\alpha$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *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 precipitación media de 526 mm.

the inclusion of progesterone<sup>(10-12)</sup>. The combination with progesterone has favored the PR up by 10 percentage points<sup>(8)</sup>, which is related to a better environment for the ovulatory follicle development<sup>(13)</sup>; in addition, the incorporation of progesterone can induce a fertile estrus in females that are in anoestrus or in the transition phase of the anoestrus to cyclicity<sup>(14)</sup>. On the other hand, by shortening the time between the first injection of GnRH and the administration of the PGF2 $\alpha$  has been a decrease of the period of dominance of the ovulatory follicle. So, a program was developed in which cows are inserted with a progesterone-releasing intravaginal device for 5 d. The day of insertion they receive the first injection of GnRH and upon removing the device are injected PGF2 $\alpha$ , repeated 24 h later. The second injection of GnRH is at 56 h after removal of the device and cows are inseminated 16 h later<sup>(10-12)</sup>.

According to this information, the program with progesterone would generate better results than basic Ovsynch protocol; however, there is no sufficient field studies with dairy cows in which such programs can be contrasted. Therefore, the objective of the present study was to compare the PR between cows inseminated by the common Ovsynch and cows inseminated with an Ovsynch program, in which cows receive progesterone for 5 d and also the period between injection of GnRH and PGF2 $\alpha$  is reduced from 7 to 5 d.

## MATERIALS AND METHODS

### *Herd management*

The study was conducted between October 2013 and January 2014, in a dairy herd located in Aguascalientes, Ags. The climate of the region is semi-dry, with an annual average temperature of 17.4 °C and average rainfall of 526 mm.

The dairy farm has 3,200 Holstein cows in production, they are milking three times a day with an average production of 9,500 kg. The cows are in pens with free access cubicles and ground floor areas. The cows are fed twice a

El establo cuenta con 3,200 vacas Holstein en producción, se ordeña tres veces al día y la producción media por lactación es de 9,500 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 por el NRC<sup>(15)</sup>.

#### *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 $\alpha$  (Enzaprost<sup>®</sup>, 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 $\alpha$  (58  $\pm$  3 DPP), se asignaron de forma aleatoria a los siguientes tratamientos: 1) Ovsynch (n=144) recibieron una inyección i.m. de GnRH (Cevarelin<sup>®</sup>, Ceva Salud Animal, México) a las 0800; siete días después las vacas recibieron una inyección i.m. de PGF2 $\alpha$  (Enzaprost<sup>®</sup>) (65  $\pm$  3 DPP; 0800); 56 h más tarde recibieron una segunda inyección i.m. de GnRH (67  $\pm$  3 DPP; 1600) y se inseminaron a tiempo fijo 16 h después (68  $\pm$  3 DPP; 0800). 2) Grupo PRID5d (n=131) recibieron una inyección i.m. de GnRH (Cevarelin<sup>®</sup>) a las 0800 y un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (PRID Delta<sup>®</sup>, Ceva Salud Animal, México), el cual permaneció *in situ* durante cinco días; al momento de retirar el dispositivo (63  $\pm$  3 DPP; 0800) se aplicó una inyección i.m. de PGF2 $\alpha$  y 24 h después se administró una segunda inyección i.m. de PGF2 $\alpha$ ; 56 h después de retirar el dispositivo se aplicó la segunda dosis de GnRH (65  $\pm$  3 DPP 1600) y se inseminó a tiempo fijo 16 h después (66  $\pm$  3 DPP; 0800). Después de la segunda inyección de PGF2 $\alpha$  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 estrus. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación rectal entre 45 y 50 días posinseminación.

day with a completely mixed ration, which complies with requirements recommended by the NRC<sup>(15)</sup>.

#### *Design of the experiment*

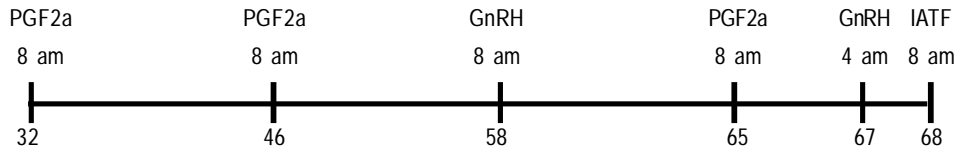
Two hundred and seventy five (275) cows of different parity and body condition score greater than 2 (scale of 1 to 5) were pre-synchronized with two PGF2 $\alpha$  i.m. injections (Enzaprost<sup>®</sup>, Ceva Animal Health, Mexico) 14 d apart, at 32  $\pm$  3 d postpartum (DPP). Twelve (12) days after the second PGF2 $\alpha$  injection (58  $\pm$  3 DPP), cows were randomly assigned to the following treatments: 1) Group Ovsynch (n=144), received a GnRH i.m injection at 0800 (Cevarelin<sup>®</sup>, Ceva Animal Health, Mexico), 7 d later the cows received a PGF2 $\alpha$  i.m. injection (Enzaprost<sup>®</sup>) (65  $\pm$  3 DPP; 0800); 56 h later received a second injection of GnRH (67  $\pm$  3 DPP; 1600) and were fixed-time inseminated 16 h later (68  $\pm$  3 DPP; 0800). 2) Group PRID5d (n=131) received an i.m. GnRH injection at 0800 and a releasing intravaginal progesterone device (PRID Delta<sup>®</sup>, Ceva Animal Health, Mexico), which remained *in situ* for 5 d; upon removing the device (63  $\pm$  3 DPP; 0800) PGF2 $\alpha$  injection was applied followed by the second PGF2 $\alpha$  24 h later; the second dose of GnRH was applied 56 h after removing the device (65  $\pm$  3 DPP 1600) and cows were inseminated at fixed-time 16 h later (66  $\pm$  3 DPP; 0800). After the second injection of PGF2 $\alpha$  during the pre-synchronization period, all the cows were fitted with heat mount detectors patch for estrus detection and the proportion of cows showing estrus was determined. Pregnancy diagnosis was performed by rectal palpation between 45 and 50 d post-insemination.

Figure 1 shows the two treatments in a schematic way. It should be noted that in the present study two different insemination time-fixed protocols were compared: group PRID5d is different from the Ovsynch group because the first includes 5 d of progesterone and the reduction of 2 d in the period between injection of GnRH and PGF2 $\alpha$  (from 7 to 5 d). This

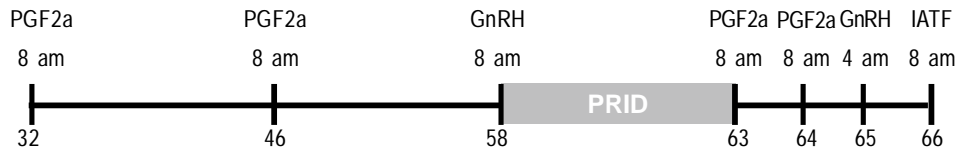
Figura 1. Descripción esquemática de los tratamientos

Figure 1. Schematic overview of the treatments

**Ovsynch**



**PRID5d**



Days postpartum

En la Figura 1 se muestran de manera esquemática los dos tratamientos. Cabe señalar que en el presente estudio se compararon dos protocolos diferentes de inseminación a tiempo fijo: el grupo PRID5d es distinto al grupo Ovsynch porque el primero incluye cinco días de progesterona y la reducción de dos días del periodo entre la inyección de GnRH y la PGF2 $\alpha$  (de 7 a 5 días). Esta aclaración es pertinente, ya que de haber diferencia entre los grupos, no se podría establecer si obedece a la inclusión de progesterona o a la modificación del intervalo entre la inyección de GnRH y la PGF2 $\alpha$ .

*Análisis estadístico*

Se comparó la TG mediante un análisis de regresión logística con el programa JMP<sup>(16)</sup>. Las variables independientes fueron: tratamiento (Ovsynch vs PRID5d), producción láctea ( $\leq 40$  vs  $>40$  kg), técnico inseminador (1 vs 2), tipo de puerperio [normal vs anormal (retención de placenta, metritis o endometritis)], número de partos previos (primíparas vs multíparas) y respuesta estral después de la segunda inyección de PGF2 $\alpha$  de la presincronización (si vs no).

clarification is relevant, because having difference between the groups, it could not be established whether due to the inclusion of progesterone or the modification of the interval between the injection of GnRH and PGF2 $\alpha$ .

*Statistical analysis*

PR was compared using a logistic regression analysis with the JMP program<sup>(16)</sup>. The independent variables were: treatment (Ovsynch vs PRID5d), milk production ( $\leq 40$  vs  $>40$  kg), AI technician (1 vs 2), type of puerperium [normal vs abnormal (retention of placenta, metritis and endometritis)], parity (primiparous vs multiparous) and estrous response after the second pre-synchronization PGF2 $\alpha$  injection (yes vs not).

**RESULTS**

The PR was similar between treatments (27 vs 21 %; Ovsynch and PRID5d, respectively). There was no effect on PR from the milk production, parity, AI technician, or the type of puerperium (Table 1). The interaction of the treatment with

## RESULTADOS

La TG fue similar entre los tratamientos (27 vs 21 %; Ovsynch y PRID5d, 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 la TG ( $P>0.1$ ). La proporción de vacas que mostraron estro después de la inyección de PGF2 $\alpha$  previa al inicio de la sincronización de la ovulación (primera inyección de GnRH) fue similar entre los tratamientos [77 % (111/144) vs 78 % (102/131); Ovsynch y PRID5d, respectivamente]. La presentación del estro previo a la primera inyección de GnRH no afectó la TG y no hubo interacción de esta variable con el tratamiento ( $P>0.1$ ). La TG fue similar entre las vacas que

these variables did not affect PR ( $P>0.1$ ). The proportion of cows showing estrus after PGF2 $\alpha$  injection prior to the start of the synchronization of ovulation (first injection of GnRH) was similar between treatments [77 % (111/144) vs 78 % (102/131); Ovsynch and PRID5d, respectively]. The presentation of the estrus prior to the first injection of GnRH did not affect PR and the interaction between treatments with this variable did not affect PR ( $P>0.1$ ). The PR was similar between the cows that did not show estrus [Ovsynch (12.1 %; 4/33) vs PRID5d (20.7 %; 6/29).  $P=0.36$ ].

## DISCUSSION

In the present study it was expected that the inclusion of progesterone in the PRID5d group would improve PR; however, the result was

Cuadro 1. Odds ratio para la probabilidad de gestación de acuerdo a algunas características productivas y reproductivas durante la presincronización\*

Table 1. Odds ratio for pregnancy probability according to the treatment and some productive and reproductive variables in dairy cows\*

Variables	n	PR	Odds ratio	CI 95%	P
Treatment:					
Ovsynch	144	27	Reference		
PRID5d	131	21	0.720	0.408 1.273	0.2586
Parity:					
Multiparous	166	20	Reference		
Primiparous	109	31	1.507	0.787 2.884	0.2160
Milk production:					
> 40 kg	101	19	Reference		
≤ 40 kg	174	28	1.507	0.652 2.603	0.4539
Technician :					
2	155	21	Reference		
1	120	28	1.383	0.777 2.462	0.2705
Puerperium:					
Abnormal	50	26	Reference		
Normal	225	24	0.787	0.379 1.634	0.5209
PGF2 $\alpha$ :					
No	62	16	Reference		
Yes	213	27	1.723	0.811 3.660	0.1571

\*There was not interaction ( $P>0.1$ ) among the treatments and analyzed variables on pregnancy rates (PR).

no mostraron estro [Ovsynch (12.1 %; 4/33) vs PRID5d (20.7 %; 6/29).  $P=0.36$ ].

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se esperaba que la inclusión de progesterona en el grupo PRID5d mejorara la TG; sin embargo, ésta fue similar al obtenido con el programa básico de Ovsynch. La TG global lograda en ambos tratamientos es igual a la obtenida en programas de sincronización similares<sup>(17)</sup> y coincide, también, con la obtenida en la inseminación a estro observado<sup>(18,19)</sup>.

Se preveía que las vacas en el protocolo de PRID5d tuvieran mayor TG que las vacas que no recibieron progesterona, ya que la evidencia experimental así lo indicaba<sup>(8)</sup>. En diversos estudios, la administración de progesterona durante la sincronización de la oleada folicular y la maduración del folículo ovulatorio ha mejorado la TG<sup>(10,20,21)</sup>. Asimismo, las vacas que están ciclando y que tienen un cuerpo lúteo al momento de la primera inyección de GnRH tienen mayor TG que aquellas vacas que están en anestro<sup>(7,22)</sup>. No obstante, en el presente estudio las vacas que recibieron progesterona no mostraron mayor TG. La causa de este resultado 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 TG. 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 pérdida de gestaciones<sup>(23-25)</sup>. Por el contrario, la ovulación de folículos con periodos largos de dominancia (folículos demasiado grandes) también afectan la TG, posiblemente debido a que los ovocitos liberados tienen menor competencia para desarrollar embriones viables<sup>(26-28)</sup>. En protocolos de

similar to that obtained with basic Ovsynch program. The global PR accomplished in both treatments are equal to that obtained in similar synchronization programs<sup>(17)</sup> and also coincides with that obtained by insemination at observed estrus<sup>(18,19)</sup>.

It was expected that the cows in the PRID5d protocol had higher PR than cows that did not receive progesterone, as experimental evidence so indicated it<sup>(8)</sup>. In several studies, the administration of progesterone during the follicular wave timing and throughout ovulatory follicle maturation has improved PR<sup>(10,20,21)</sup>. In addition, cows that are cycling and have a *corpus luteum* (CL) at the time of the first injection of GnRH have PR greater than cows in anestrus<sup>(7,22)</sup>; however, in the present study the cows that received progesterone showed similar PR. The cause of this result is unknown, but some possibilities are exposed in the following paragraphs.

The time of dominance of the ovulatory follicle in Ovsynch programs affects the PR. The ovulation of very small follicles, i.e. follicles that reach the dominance very near the time of the induction of luteal regression, can produce low estradiol concentrations and increase premature regression of the CL of the subsequent estrus cycle (short luteal phase) and loss of pregnancies<sup>(23-25)</sup>. On the other hand, the ovulation of follicles with long periods of dominance (too large follicles) also affect the PR, possibly because released oocytes are less competent to develop viable embryos<sup>(26-28)</sup>. In protocols of fixed-time insemination in beef cattle<sup>(10,25,29)</sup>, the reduction of the period of dominance of the follicle ovulation through the decrease of 2 d between the first injection of GnRH and the administration of PGF2 $\alpha$  (7 vs 5 d) in conjunction with the elongation of the proestrus resulted in best PR. The absence of improvement of the PR observed in this study probably lies in that the period between the administration of PGF2 $\alpha$  and the induction of ovulation with the second injection of GnRH was 56 h while in the cited studies it was 72 h.

inseminación a tiempo fijo en ganado de carne<sup>(10,25,29)</sup>, 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 $\alpha$  (7 vs 5 días) conjuntamente con el alargamiento del proestro ha resultado en mejor TG. La ausencia de mejoramiento de la TG observada en el presente trabajo probablemente radica en que el periodo entre la PGF2 $\alpha$  y la inducción de la ovulación con 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 TG<sup>(25,30)</sup>.

Por otra parte, una desventaja de la reducción del periodo entre la primera inyección de GnRH y la administración de PGF2 $\alpha$  (5 días) es que el cuerpo lúteo formado después de la ovulación inducida con la GnRH sea resistente al efecto de la PGF2 $\alpha$ <sup>(11,12,31)</sup>. Aún en el programa básico de Ovsynch en el cual transcurren 7 días entre la GnRH y la PGF2 $\alpha$ , se ha observado falla en la luteólisis en un rango del 5 al 30 % (luteólisis incompleta)<sup>(6,32)</sup>, lo que ocasiona que las vacas presenten concentraciones suprabasales de progesterona al momento de la inseminación. Así, concentraciones de progesterona mayores de 0.3 a 0.5 ng/ml al momento de la inseminación están relacionadas con bajas tasas de gestación<sup>(32)</sup>. Se han evaluado tratamientos con dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  con diferencia de 8 h o una sola inyección con una dosis doble de PGF2 $\alpha$  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<sup>(31)</sup>. Aunque en el presente trabajo las vacas del grupo PRID5d recibieron dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  con 24 h de diferencia, no se debe descartar que una falla en la luteólisis haya impedido en las vacas de este grupo mostraran un incremento de la TG.

Es posible, también, que la ausencia de un efecto positivo en las vacas que recibieron

This temporary difference may have influenced the characteristics of the ovulatory follicle, giving as a result an ovulation of a small follicle, which is associated with PR reduction<sup>(25,30)</sup>.

On the other hand, a disadvantage of reducing the period between the first injection of GnRH and PGF2 $\alpha$  (5 d) administration, is that the CL after ovulation induced with GnRH is resistant to the effect of PGF2 $\alpha$ <sup>(11,12,31)</sup>. Even in the basic program of Ovsynch whereby after 7 d between GnRH and PGF2 $\alpha$ , failure in luteolysis in a range of 5 to 30 % has been observed (incomplete luteolysis)<sup>(6,32)</sup>, causing cows to present suprabasal concentrations of progesterone at the time of insemination. Thus, progesterone concentrations above 0.3 to 0.5 ng/mL at the time of insemination are associated with low pregnancy rates<sup>(32)</sup>. Treatment with two injections of PGF2 $\alpha$  with difference of 8 h, or a single injection with a double dose of PGF2 $\alpha$  in cows with a CL (with the same days as in the present study) has been evaluated, and in both cases the luteolysis was incomplete<sup>(31)</sup>. Although in the present study the cows from the PRID5d group received two injections of PGF2 $\alpha$  24 h apart, it cannot be ruled out that a luteolysis failure has prevented the cows of this group to show a PR increase.

It is also possible, that the absence of a positive effect of the progesterone is because this hormone supplementation favors PR, especially in cows that have not yet started postpartum ovarian activity<sup>(2,33)</sup>. In the present study, the proportion of cows showing estrus after PGF2 $\alpha$  injection prior to timed artificial insemination program was similar between groups (77 vs 78 %; Ovsynch and PRID5d, respectively), which indicates that a high proportion of them was cycling and would have, hypothetically, a CL at the beginning of the Ovsynch program. In these circumstances, the effect expected for by the addition of progesterone in the synchronized protocol might be irrelevant. It should be noted that in timed artificial insemination programs in anestric beefs cows, the inclusion of progesterone enhances PR in both, *Bos taurus*<sup>(10)</sup> and *Bos indicus*<sup>(34)</sup>.



progesterona se deba a que la complementación con esta hormona favorece la ciclicidad y la TG, especialmente en vacas que aún no han iniciado su actividad ovárica posparto<sup>(2,33)</sup>. En el presente trabajo, la proporción de vacas que mostraron estro después de la inyección de PGF2 $\alpha$  previa a la sincronización de la ovulación fue similar entre los 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 intrascendente. Cabe señalar que en los programas de inseminación a tiempo fijo en vacas anéstricas de razas productoras de carne, la inclusión de progesterona mejora la TG tanto en vacas *Bos taurus*<sup>(10)</sup> como en *Bos indicus*<sup>(34)</sup>.

La TG en ambos tratamientos es consistente con la obtenida en programas de sincronización similares<sup>(17,33)</sup> o cuando las vacas se inseminan después de la observación del estro<sup>(18,19)</sup>. No obstante, la proporción de vacas gestantes del total elegible para inseminarse (tasa de preñez) fue del doble en los programas evaluados en comparación con la obtenida en vacas contemporáneas inseminadas cuando se detectaron en estro (espontáneo o inducido con PGF2 $\alpha$ ). En el presente estudio, 40 % de las vacas contemporáneas elegibles para inseminarse se detectaron en estro y se sirvieron, mientras que en los protocolos evaluados se inseminó el 100 % de las vacas. Con estos datos, la tasa de preñez en los grupos experimentales fue de 24 % mientras que en las vacas contemporáneas fue de 12 % (se consideró en esta estimación 30 % de TG y 40 % de eficiencia en la detección de estros). Cabe mencionar que la tasa de preñez en México fluctúa de 12 a 15 % y es similar a la observada en Estados Unidos<sup>(2,3)</sup>. Esta diferencia en la tasa de preñez podría justificar económicamente los programas de inseminación a tiempo fijo. En un estudio hecho en México en 2011<sup>(35)</sup>, se

The PR in both treatments is consistent with that obtained in similar synchronization programs<sup>(17,33)</sup> or when cows are inseminated after estrous detection<sup>(18,19)</sup>. However, the proportion of pregnant cows of the total eligible to inseminate (pregnancy rate) was twice in the programs evaluated in comparison with the that obtained in contemporary inseminated cows when they were detected in estrus (spontaneous or induced) with PGF2 $\alpha$ . In the present study, 40 % of the contemporary cows eligible to inseminate were detected in estrus and were served, while 100 % of cows in the evaluated protocols were inseminated. With these data, the pregnancy rate in the experimental groups was 24 % vs 12 % in contemporary cows (this was estimated considering PR of 30 % and 40 % efficiency in estrus detection). It is noteworthy that the pregnancy rate in Mexico varies from 12 to 15 % and is similar to that observed in the United States<sup>(2,3)</sup>. This difference in the pregnancy rate could economically justify the fixed-time insemination programs. In a study done in Mexico in 2011<sup>(35)</sup>, using Monte Carlo methodology<sup>(36)</sup> estimated the economic consequence of changes in the pregnancy rate and found that for every percentage point that it increases in the range of 15 to 20 %, generates an additional income of \$748.00 Mexican pesos per cow per year.

Something that should be highlighted in this study is that milk production did not affect the PR. In the past 30 yr there has been an association between the increase in milk production and the decrease of the PR<sup>(37)</sup>, although this is not necessarily true. Lopez-Gatius *et al*<sup>(38)</sup> found that cows that produced more milk (>50 kg) on d 50 postpartum were most fertile. Although a result similar to the above<sup>(38)</sup> was not found in the present study, neither there was not a decrease in the PR in cows that produced more than 40 kg of milk compared to those that produced less than 40 kg.

In the present study, primiparous cows had similar PR to multiparous (31 vs 20 %, respectively,  $P=0.21$ ), which contrasts with other

estimó mediante la metodología Montecarlo<sup>(36)</sup> la consecuencia económica de los cambios en la tasa de preñez y se encontró que por cada punto porcentual que se incremente en el rango de 15 a 20 %, se genera un ingreso adicional de \$748.00 por vaca al año.

Por otra parte, algo que conviene resaltar del presente estudio es que la producción de leche no afectó la TG. 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 TG<sup>(37)</sup>, no necesariamente las vacas que producen más leche son menos fértiles. López Gatiús *et al.*<sup>(38)</sup> 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<sup>(38)</sup>, tampoco se observó una disminución de la TG en las vacas que produjeron más de 40 kg de leche en comparación con las vacas que produjeron menos 40 kg.

En el presente trabajo, las vacas primíparas tuvieron una TG similar a las multíparas (31 vs 20 %, respectivamente,  $P=0.21$ ), lo cual contrasta con lo observado en otros estudios<sup>(19,38)</sup>, probablemente por el escaso número de observaciones.

El tipo de puerperio no afectó la TG, lo cual es diferente a lo encontrado en otros estudios, en los cuales las vacas que tuvieron alguna patología uterina posparto fueron menos fértiles en el primer servicio que las vacas que tuvieron un puerperio normal<sup>(3)</sup>. La causa de este resultado se desconoce, pero se puede especular que está relacionada con el manejo clínico de las vacas con puerperio anormal, ya que además de recibir los tratamientos farmacológicos respectivos, se sometieron a la inyección sistemática de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  cada 14 días a partir del día 32 posparto (presincronización). Así, la luteólisis y la presentación del estro favorecieron la eliminación de las infecciones uterinas y evitaron su efecto negativo en la TG del primer servicio<sup>(39)</sup>.

studies<sup>(19,38)</sup>, probably by the few number of observations.

The type of puerperium did not affect the PR, which is different to that found in other studies, in which the cows that had any uterine postpartum pathology were less fertile in the first service than cows with a normal puerperium<sup>(3)</sup>. The cause of this result is unknown, but it can be speculated that it is related to the clinical management of the cows with abnormal puerperium, since in addition to receiving the respective drug treatments, they were subjected to systematic PGF<sub>2</sub> $\alpha$  injection every 14 d from the d 32 post-partum (presynchronization). Thus, luteolysis and estrus favored the removal of uterine infections and could avoid its negative effect on the PR of the first service<sup>(39)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It is concluded that the PR was similar among the cows inseminated with a common Ovsynch program or by using an Ovsynch program which includes 5 d of progesterone and the reduction of 7 to 5 d between injection of GnRH and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ .

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded in part by the project IN219811-3 of the National Autonomous University of Mexico. The authors are grateful to the owner of the Rancho Montoro (Aguascalientes, Mexico) support and Ceva Animal Health, Mexico for the donation of the hormonal products.

*End of english version*

---

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se concluye que la tasa de gestación fue similar entre las vacas inseminadas con un programa

Ovsynch común o mediante un programa Ovsynch que incluye 5 días de progesterona y la reducción de 7 a 5 días entre la inyección de GnRH y la PGF2 $\alpha$ .

## 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.

## LITERATURA CITADA

- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 1997;80:301-306.
- Wiltbank MC, Pursley JR. The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 2014;81:170-185.
- Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG. Factores asociados con la infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos de producción. *Cienc Vet* 2007;10:71-91.
- 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.
- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003;78:239-257.
- Gumen 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.
- Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JE. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 2010;93:3578-3587.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Martins LT, Marsola RS, Greco LF, Favoreto MG, *et al.* 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* 2010;93:5798-5808.
- 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* 2012;24:238-243.
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 2008;69:843-851.
- 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.
- Ribeiro ES, Bisinotto RS, Favoreto MG, Martins LT, Cerri RLA, Silvestre FT, *et al.* Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 $\alpha$  as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012;78:273-284.
- 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.
- McDougall S, Compton C. Reproductive performance of anestrus dairy cows treated with progesterone and estradiol benzoate. *J Dairy Sci* 2005;88:2388-2400.
- NRC. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> revised edition. Washington, DC, USA: National Academy Press; 2001.
- SAS. SAS User's Guide: Statistic (Version 9.3). Cary NC, USA Inst. Inc., 2010.
- Meléndez P, Gonzalez G, Aguilar E, Loera O, Risco C, Archbald LF. Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006;89:4567-4572.
- 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.
- Orozco M, Gutierrez CG, Lopez OR, Aguilar C, Roque VCI, Hernandez-Cerón J. Oestral response and fertility in dairy cows treated with progesterone for 6 days prior to oestrus synchronization with prostaglandin F2 $\alpha$  [abstract]. *Reproduction Fertil Develop* 2014;26:118.
- Stevenson JS, Pursley JR, Garverick Ha, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, *et al.* Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during ovsynch. *J Dairy Sci* 2006;89:2567-2578.
- Wiltbank MC, Souza AH, Giordano JO, Nascimento AB, Vasconcelos JM, Pereira MHC, *et al.* Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod* 2012;9:231-241.
- Stevenson JS, Tenhouse DE, Krisher RL, Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR, *et al.* 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.
- Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001;56:307-314.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, *et al.* Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5268-5723.
- 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.
26. 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.
  27. 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.
  28. 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.
  29. Kasimanickam R, Day ML, Rudolph JS, Hall JB, 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.
  30. 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.
  31. 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 PGF<sub>2a</sub> in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology* 2014;81:389-395.
  32. Souza AH, Gümen A, Silva EPB, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, *et al.* Supplementation with estradiol-17 $\beta$  before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90:4623-4634.
  33. Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Martinez N, Greco LF, Barbosa LFSP, *et al.* 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.
  34. Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Soares JG, Giroto RW, Maio JRG, *et al.* Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. *Theriogenology* 2015;83:1093-1100.
  35. Rios 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]. Congreso Nacional de Buiatría. 2011:286.
  36. Bruijnjs MRN, Hogeveen H, Stassen EN. Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. *J Dairy Sci* 2010;93:2419-2432.
  37. Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci* 2001;84:1277-1293.
  38. 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.
  39. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, *et al.* The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology* 2005;63:818-830.