

Eficiencia reproductiva de Ovsynch + CIDR en vacas Holstein bajo un esquema de inseminación artificial a tiempo fijo en el norte de México

Reproductive efficiency of Ovsynch + CIDR in Holstein cows under a fixed time artificial insemination scheme in northern Mexico

Rafael Rodríguez-Martínez^a

Irene Concepción Chavarría Neri^b

César A. Meza-Herrera^c

Alan Sebastián Alvarado-Espino^b

Juan Luis Morales Cruz^a

Vicente Homero González-Álvarez^b

Ma. Guadalupe Calderón-Leyva^b

Francisco G. Véliz Deras^a

Oscar Ángel-García^{a*}

^a Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México.

^b Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México.

^c Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo, Bermejillo, Durango, México.

*Autor de correspondencia: mvz.oscar_2207@hotmail.com

● **Resumen:**

Se evaluó el uso de Ovsynch más dispositivo intravaginal de liberación controlada de progesterona (CIDR) en vacas altas productoras. El estudio se llevó en la Comarca Lagunera (25° 44' N, 103° 10' O a 1,111 msnm) durante diciembre y enero. Las vacas (n=100) se pre-sincronizaron con dos inyecciones de PGF2 α a los 35 y 47 días posparto y asignadas a dos tratamientos (n= 50): 1) El grupo OV recibió el protocolo Ovsynch: 100 μ g de GnRH (i.m.; día 1), 25 mg de PGF2 α (i.m.; día 7) y 100 μ g GnRH (i.m.; día 9); 2) El grupo (OV+C) recibió el protocolo Ovsynch más un CIDR (1.38 g), retirado siete días después. Todas las vacas se expusieron a un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF; 16 a 20 h posteriores a la última inyección). Se registró tanto el porcentaje de preñez, el número de vacas repitiendo celo considerando dos periodos (≤ 24 y ≥ 25 días post-inseminación), así como los días de retorno al celo. Mientras que no existió diferencia entre grupos para tasa de preñez (OV= 28 %, OV+C= 32 %; $P > 0.05$), el porcentaje de vacas que manifestaron celo después de la IATF difirió ($P < 0.05$) entre tratamientos durante los dos periodos estudiados, 28 vs 62 % ≤ 24 días; 69 vs 35 % ≥ 25 días; OV y OV+C, respectivamente. El promedio de días en que repitieron celo fue menor ($P < 0.05$) en el OV+C (25 ± 1.6 vs 30 ± 1.3). El tratamiento Ovsynch+CIDR no mejoró la tasa de preñez; sin embargo, redujo la latencia en el retorno al celo, destacando como una alternativa para disminuir los días a la siguiente IA, y potencialmente para mejorar la eficiencia reproductiva y el retorno económico del hato lechero.

● **Palabras clave:** Preñez, Progesterona, Retorno a celo, Sincronización.

● **Abstract:**

The use of Ovsynch plus controlled internal drug release of progesterone (CIDR) in high producing dairy cows was evaluated. The study was carried-out at the Comarca Lagunera (25° 44' N, 103° 10' W, at 1,111 m asl.) during December and January. Cows (n= 100) were pre-synchronized with two injections of PGF2 α at 35 and 47 d postpartum and assigned to two treatments (n= 50 each). 1) The group OV received the Ovsynch protocol: 100 μ g GnRH (i.m.; d 1), 25 mg of PGF2 α (i.m.; d 7), and 100 μ g GnRH (i.m.; d 9); 2) The group OV+C was subjected to the Ovsynch protocol plus a CIDR (1.38 g P4) which was removed at d 7. Cows of both groups were exposed to a fixed time artificial insemination protocol (IATF; 16 to 20 h after the last injection). Response variables included pregnancy rate, cows with repeated estrus considering two periods, ≤ 24 and ≥ 25 d after insemination, and the period to return to estrus. While no differences occurred between groups regarding pregnancy rates (OV= 28 %, OV+C= 32 %; $P > 0.05$), the percentage of cows showing estrus after IATF differed ($P < 0.05$) between treatments for the two studied periods (28 % vs 62 % ≤ 24 d; 69 % vs 35 % ≥ 25 d; OV and OV+C, respectively). Moreover, mean of days when cows repeated estrus was lower ($P < 0.05$) in the OV+C group (25 ± 1.6 vs 30 ± 1.3 d). Although

the Ovsynch+CIDR treatment did not improve pregnancy rate, it reduced the latency for return to estrus, emerging as an alternative to diminish the days to the next AI, and potentially improve the reproductive efficiency and the economic return of the dairy herd.

● **Key Words:** Pregnancy, TAI, Progesterone, Return to estrus, Synchronization.

Recibido 17/10/2016.

Aceptado 03/01/2018.

🌿 Introducción 🌿

En el norte de México se localiza una de las cuencas lecheras más importante del país y de Latinoamérica, en la cual existen alrededor de 250,000 vacas en ordeña, produciendo cerca de 16,000,000 L anuales⁽¹⁾, las cuales son manejadas en un sistema intensivo y bajo condiciones semidesérticas. En este tipo de sistema, uno de los principales problemas es la baja fertilidad durante los primeros 100 días de lactancia⁽²⁾. Específicamente en la Comarca Lagunera, se reporta⁽³⁾ una tasa de eliminación de vientres mayor al 35 % anual por fallas reproductivas. En efecto, en vacas altas productoras, con promedios iguales o mayores a 9,000 kg por lactancia, por lo general después del parto se presenta un desbalance energético que puede prolongar el anestro posparto^(4,5); además de provocar desequilibrios hormonales⁽⁶⁾, defectos en la ovulación⁽⁴⁾ y deficiencias en el funcionamiento del cuerpo lúteo⁽⁷⁾. Por otra parte, la baja manifestación de celo es otro factor que disminuye la fertilidad, ya que durante las últimas décadas se ha observado que el porcentaje de vacas que muestran signos de celo puede declinar del 80 al 50 % y la duración del celo se ha reducido de 15 a 5 h^(8,9).

Para tratar de incrementar la eficiencia reproductiva se han utilizado protocolos hormonales como el Ovsynch, que se basan en el uso de GnRH más prostaglandinas, que permiten la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sin la necesidad de la detección de celo^(10,11). Dicho protocolo se ha diseñado para realizar la inseminación en el momento más apropiado en relación a la ovulación, generando mejoras en la fertilidad⁽¹²⁾. Sin embargo, los resultados en cuanto a este protocolo han sido variables, por ejemplo, en Nueva Zelanda han reportado

tasas de concepción a primer servicio del 39 al 52 %⁽¹³⁾ mientras que en Estados Unidos e Inglaterra se reportan tasas del 30 al 40 %⁽¹⁴⁾.

Por lo anterior, se han desarrollado adecuaciones al protocolo Ovsynch, como la adición de progestágenos^(11,15) a través de dispositivos intravaginales que pueden mejorar la fertilidad⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Sin embargo, existen pocos reportes, y comúnmente muestran resultados contradictorios respecto al uso de esta técnica. Diversos investigadores^(11,18) reportan un incremento del 5 % en la tasa de concepción entre los 32 y 60 días posteriores a la inseminación, al incluir progesterona mediante dispositivos intravaginales en conjunto con Ovsynch. Por el contrario, Bartolome *et al*⁽¹⁹⁾ reportan que la inclusión de CIDR no mejora la tasa de gestación. En la Comarca Lagunera, a pesar de la gran importancia que reviste la industria del bovino lechero, cuyo comportamiento reproductivo genera bajas en la fertilidad de las vacas, existen pocos reportes con el objetivo de aumentar su fertilidad, motivo por el cual se evaluó el uso de Ovsynch más la inserción de un CIDR en vacas de alta producción.

Material y métodos

Localización, animales y manejo

El estudio se llevó a cabo de diciembre de 2013 a enero de 2014, en la Comarca Lagunera (25° 44' 36'' N y 103° 10' 15'' O; 1,111 msnm). Esta región se caracteriza por presentar un clima cálido extremo; con temperaturas en verano que oscilan de 23 a 43 °C, y en invierno de 2 a 9 °C, con una precipitación anual de 240 mm y humedad relativa de 29 a 83 %⁽²⁰⁾. El estudio se desarrolló en un establo bajo condiciones comerciales, con un inventario de 1,500 vacas Holstein en ordeña, las cuales se manejan en forma intensiva en corrales abiertos, alimentadas tres veces al día con una ración totalmente mezclada de acuerdo a sus requerimientos nutricionales, y sujetas a un manejo reproductivo de vacas frescas de cero a 10 días y que, con el fin de ayudar a la correcta involución uterina, reciben a los 25 días posparto una dosis de 25 mg de PGF2 α .

Se seleccionaron 100 vacas con un promedio diario de producción de leche de 63.5 ± 8.0 L y refractarias al tratamiento de Presynch (PgF2 α , 25 mg; 35 y 47 d) y sin problemas

reproductivos (piometras, quistes ováricos, etc.). Las vacas se dividieron en dos grupos homogéneos ($n= 50$ c/u) respecto al número de lactancias previas (2.92 ± 1.17) y condición corporal (3.25 ± 0.5 ; escala de 1-5). El primer grupo experimental (Ovsynch; OV) recibió $100 \mu\text{g}$ de GnRH (i.m.; día 1), 25 mg de $\text{PGF}2\alpha$ (i.m.; día 7), y $100 \mu\text{g}$ GnRH (i.m.; día 9), mientras que el segundo grupo (Ovsynch+CIDR;OV+C) se sometió al protocolo Ovsynch más un dispositivo de liberación controlada de progesterona CIDR®; 1.38 g , que se aplicó el día uno y se retiró siete días posteriores a su inserción. Las vacas de ambos grupos se inseminaron 16 a 20 h posteriores a la última inyección.

● Variables evaluadas ●

Se determinó el porcentaje de vacas que repitieron celo después de la IATF⁽¹¹⁾, diariamente a las 0700, 1200 y 1700 h; el promedio de días (media \pm eem) que las vacas manifestaron celo, el porcentaje de vacas con ciclos cortos (<16 días), ciclos normales (de 17 a 24 días), ciclos largos (de 25 a 39 días), vacas vacías y las vacas no detectadas (>39 días) después de la IATF, y la tasa preñez por diagnóstico de gestación a los 39 días posteriores a la IATF mediante ultrasonografía transrectal en tiempo real con un transductor a 7.5 MHz (Emperor CO., LTD, Modelo, EMP-820 Vet).

● Análisis estadísticos ●

Se calcularon los porcentajes de vacas que repitieron celo después de la IATF, vacas con ciclos cortos, normales y largos, vacas vacías, vacas no detectadas en celo y la tasa de preñez, y se compararon por medio de Ji cuadrada. El promedio de días que las vacas manifestaron celo se comparó por medio de t-Student. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico MYSTAT 12 (Evenston, ILL, USA, 2000), con un nivel de significancia de $P<0.05$.

Resultados

En el Cuadro 1 se muestra la respuesta reproductiva de ambos tratamientos. La tasa de preñez fue similar entre tratamientos, encontrándose 28 % para el OV y 32 % para OV+C ($P>0.05$). El porcentaje de vacas que retornaron al celo antes de los 25 días después de la IATF fue mayor ($P<0.05$) en las vacas del grupo OV+C (64 %) que en las del grupo OV (30 %). El porcentaje de vacas que manifestaron celo después de los 25 días post-inseminación fue mayor ($P<0.05$) en el grupo OV (69 %) respecto al grupo OV+C (35 %). Con respecto a la latencia de retorno a celo después de la IATF, los valores promedio menores fueron observados en el grupo-OV+C con respecto al grupo OV ($P<0.05$).

Cuadro1: Variables reproductivas en vacas sometidas al protocolo Ovsynch (OV; n=50) y Ovsynch más CIDR (OV+C; n=50), durante diciembre-enero

Variables	OV	% Acumulado	OV+C	% Acumulado
Preñez, %	28 ^a (14/50)		32 ^a (16/50)	
Vacas vacías, %	72 ^a (36/50)		68 ^a (34/50)	
Días que repitieron celo:				
≤16	6 ^c (2/36)	6 ^c (2/36)	21 ^d (7/34)	21 ^d (7/34)
17-24	25 ^a (9/36)	31 ^a (11/36)	44 ^a (15/34)	64 ^a (22/34)
25-39	33 ^c (12/36)	64 ^c (23/36)	15 ^d (5/34)	80 ^d (27/34)
>39*	36 ^a (13/36)	36 ^a (13/36)	21 ^b (7/34)	20 ^b (7/34)
Promedio de días abiertos	34.2±1.3 ^a	34.2±1.3 ^a	24.8±1.6 ^b	24.8±1.6 ^b

^{a,b} Valores con diferentes superíndices difieren ($P<0.05$).

^{c,d} Valores con diferentes superíndices difieren ($P<0.06$).

* Porcentaje de vacas no detectadas después de los 39 días.

Discussion

The overall pregnancy rate was 30%, close to the 33% reported by Mellado *et al*⁽²¹⁾ for this region. The addition of progesterone (P4) to the Ovsynch protocol did not improve the pregnancy rate to the first IA, which is consistent with what is reported in various studies^(22,23). Contrary to the previous, improvements of ~ 5-7% in pregnancy were reported through the use of CIDR during the Ovsynch program before the IA^(11,24,25). Additionally, EI-Tarabany⁽²⁶⁾ reported a higher pregnancy rate 28 days after the IA, using Ovsynch plus CIDR (35.9%), compared to Ovsynch (22.5%). It is likely that the pregnancy rate was similar between the groups of this study, because some of the cows were cycling at the time of treatment, and the addition of exogenous progesterone had no effect due to the presence of natural progesterone, as it is known that cyclic cows respond better to Ovsynch than anovulatory cows⁽¹¹⁾. This is consistent with what is reported by Singh *et al*⁽²⁷⁾, who indicate that the use of this protocol plus CIDR increases the pregnancy rate in anovulatory cows.

The percentage of cows that returned to estrus after the IATF before 25 days was higher in the OV+C cows (62%) than in the OV cows (31%), probably because the 41% of the cows of the OV+C group that presented estrus from day 17 to 24 responded to the treatment, and did not remain pregnant, presented a normal duration of the estrous cycle, which is consistent with what is reported by Azevedo *et al*⁽²⁸⁾, who mention a positive effect of the use of CIDR on ovarian and estrous activity, as cows treated with CIDR had twice the probability of presenting normal duration cycles compared to those that did not become pregnant, compared to those treated with Ovsynch but without CIDR (59 vs 39%, respectively). In this sense, it is mentioned⁽²⁹⁾ that cows treated with CIDR present a dominant follicle of greater size at the time of removing the device, and a higher pregnancy rate than those that did not receive it. In the same way, Wiltbank *et al*⁽²⁵⁾ report that cows with high levels of P4 showed a higher pregnancy rate in the diagnosis at day 29 post-insemination, and were less susceptible to pregnancy loss after this time. Therefore, there is a positive effect of the elevated levels of P4 prior to the IA, on the subsequent maintenance of pregnancy. It is likely that in this study, the OV+C cows presented a larger follicular size and a better quality of the oocyte, favoring a better embryonic development, thus reducing embryonic losses⁽¹⁵⁾. The addition of P4 in the OV+C protocol possibly caused the follicles to be of greater size and have a higher number of follicular cells that could become luteal cells and synthesize a greater amount of progesterone⁽³⁰⁾; and that this availability of P4 in the early diestrus helped to obtain a higher pregnancy and embryo survival rate in these cows⁽³¹⁾. In contrast, the cows of the OV protocol that did not receive the addition of

P4 tuvieron probablemente folículos pequeños que pudieron ser insuficientemente maduros y no producir cantidades suficientes de estradiol; y por consiguiente tuvieron un CL de baja calidad, procediendo una luteólisis que pudo provocar la muerte embrionaria y por consiguiente una baja tasa de preñez, además de que estas vacas presentaran una mayor incidencia de retorno a celo y ciclos más prolongados⁽³¹⁾.

El porcentaje de vacas del grupo OV que retornaron al celo durante el periodo de los 17 a 24 días es cercano al 21 % reportado por Werven *et al*⁽³²⁾. Sin embargo, después de los 25 días, en este grupo se observó una mayor incidencia de vacas que presentaron celo respecto al OV+C, lo que sugiere que parte de estas vacas tuvieron un ciclo ovárico largo, ya que probablemente quedaron gestantes y sufrieron pérdidas embrionarias, tal como se ha señalado⁽³¹⁾. En efecto, cuando no se adiciona P4 con el protocolo Ovsynch, el desarrollo folicular, embrionario y fetal son de baja calidad^(33,34), ya que la P4 exógena durante esta etapa, evita la maduración prematura del ovocito al provocar una menor exposición a la LH, lo que se traduce en un mejor desarrollo folicular y sincronización de la ovulación⁽³³⁾, además de impactar positivamente en la calidad del ovocito y del desarrollo embrionario subsecuente⁽³⁴⁾. Finalmente, mientras que al día 24, el 60 % de las hembras del grupo OV+C había retornado al estro, en el grupo OV sólo el 25 % mostró estro al día 24, observando una reducción promedio de 10 días abiertos a favor el grupo OV+C. Aunque en el presente estudio no se realizó un análisis de sensibilidad económica, se han reportado costos de \$ 6.10 USD por día abierto, observando una reducción promedio de 10 días abiertos a favor del grupo OV+C. Dicho costo incluye pérdidas económicas relacionadas a producción de leche y terneros, costos asociados a fallas reproductivas, inseminación artificial y tratamientos, así como costos de manejo⁽³⁵⁾.

❖ Conclusiones e implicaciones ❖

Tanto el protocolo Ovsynch como el uso del Ovsynch+ CIDR-P4 presentaron tasas de fertilidad comparables. Sin embargo, aunque el protocolo Ovsynch + CIDR no incrementó la tasa de preñez en vacas Holstein con altos niveles de producción láctea sometidas a primer servicio, sí promovió una reducción en la latencia en el retorno al celo. Por lo tanto, puede ser una alternativa para que las vacas repetidoras lo hagan en un ciclo de alrededor de 21 días, disminuyendo los días a la siguiente IA, lo que potencialmente puede contribuir a mejorar la eficiencia reproductiva y por ende, el retorno económico del hato lechero al

disminuir el número de servicios por concepción, reducir el intervalo entre partos y los desechos tempranos por fallas reproductivas.

● **Literatura citada**

1. SIAP (2015). Resumen nacional de la producción pecuaria. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap/grafica_base/pecResumen.jsp. Consultado 11 Oct, 2016.
2. Oltenacu PA, Broom DM. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim Welf* 2010;19(1):39-49.
3. Mellado M, Antonio-Chirino E, Meza-Herrera C, Veliz FG, Arevalo JR, Mellado J, *et al.* Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 2011;94(9):4524-4530.
4. Garnsworthy PC, Lock A, Mann GE, Sinclair KD, Webb R. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. *J Dairy Sci* 2008;91(10):3814-3823.
5. Peter AT, Vos LAM, Ambrose DJ. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 2009;71(9):1333-1342.
6. Gilmore HS, Young FJ, Patterson DC, Wylie ARG, Law RA, Kilpatrick DJ, *et al.* An evaluation of the effect of altering nutrition and nutritional strategies in early lactation on reproductive performance and estrous behavior of high-yielding Holstein-Friesian dairy cows. *J Dairy Sci* 2011;94(7):3510–3526.
7. Takahashi H, Haneda S, Kayano M, Matsui M. Differences in progesterone concentrations and mRNA expressions of progesterone receptors in bovine endometrial tissue between the uterine horns ipsilateral and contralateral to the corpus luteum. *J Vet Med Sci* 2016;78(4):613-618.
8. Dobson H, Walkera SL, Morris MJ, Routly JE, Smith RF. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal* 2008;2(8):1104-1111.
9. Nogalski Z, Piwczynski D. Association of length of pregnancy with other reproductive traits in dairy cattle. *Asian Australian J Anim Sci* 2012;25(1):22-27.

10. Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 2016;86(1):388-396.
11. Chebel RC, Al-Hassan MJ, Fricke PM, Santos JEP, Lima JR, Martel CA, *et al.* Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2010;93(3):922–931.
12. Thatcher WW, Santos JEP, Silvestre FT, Kim IH, Staples CR. Perspective on physiological/endocrine and nutritional factors influencing fertility in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2010;45(3):2-14.
13. Dillon P, Berry DP, Evans RD, Buckley F, Horan B. Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. *Livest Sci* 2006;99(2):141-158.
14. MacDonald KA, Verkerk GA, Thorrold BS, Pryce JE, Penno JW, McNaughton LR, *et al.* A comparison of three strains of Holstein-Friesian grazed on pasture and managed under different feed allowances. *J Dairy Sci* 2008;91(4):1693-1707.
15. 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(12):5798–5808.
16. Cerri RL, Rutigliano HM, Chebel RC, Santos JE. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 2009;137(5):813-823.
17. Walsh RB, Leblanc SJ, Duffield TF, Kelton DF, Walton JS, Leslie KE. The effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on pregnancy risk to fixed-time insemination following diagnosis of non-pregnancy in dairy cows. *Theriogenology* 2007;67(5):948-956.
18. Colazo MG, Ponce-Barajas P, Ambrose DJ. Pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows subjected to 2 different intervals from presynchronization to initiation of Ovsynch protocol. *J Dairy Sci* 2013;96(12):7640-7648.
19. Bartolome JA, van Leuwen JJ, Thieme M, Sa’filho OG, Melendez P, *et al.* Synchronization and resynchronization of inseminations in lactating dairy cows with the CIDR insert and the Ovsynch protocol. *Theriogenology* 2009;72(6):869-878.

20. CONAGUA (2015). Servicio Meteorológico Nacional. <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=coah>. Consultado 9 Ago, 2016.
21. Mellado M, Flores J M, De Santiago A, Veliz FG, Macías-Cruz U, Avendaño-Reyes L. Extended lactation in high-yielding Holstein cows: Characterization of milk yield and risk factors for lactations > 450 days. *Livest Sci* 2016;189:50-55.
22. Forro A, Tsousis G, Beindorff N, Sharifi AR, Brozos C, Bollwein H. Factors affecting the success of resynchronization protocols with or without progesterone supplementation in dairy cows. *J Vet Sci* 2015;16(1):121-126.
23. Flores-Domínguez S, Muñoz FLR, López OR, Aréchiga FCF, Mapes G, Hernández CJ. Gestación en vacas lecheras con dos protocolos de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo. *Rev Mex Cienc Pecu* 2015;6(4):393-404.
24. 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(7):2901-2915.
25. 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(3):231-241.
26. El-Tarabany MS. The efficiency of new CIDR and once-used CIDR to synchronize ovulation in primiparous and multiparous Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2016;173:29-34.
27. Singh H, Luthra RA, Khar SK, Nanda T. Oestrus induction, plasma steroid hormone profiles and fertility response after CIDR and eCG treatment in acyclic sahiwal cows. *Asian Australas J Anim Sci* 2006;19(11):1566-1573.
28. Azevedo C, Maia I, Canada N, Simões J. Comparison of fertility, regular returns-to-estrus, and calving interval between Ovsynch and CO-synch + CIDR protocols in dairy cows. *Theriogenology* 2014;82(6):910-914.
29. Claro-Júnior I, SáFilho OG, Peres RFG, Aono FHS, Day ML, Vasconcelos JLM. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. *Theriogenology* 2010;74(6):903-911.
30. Denicol AC, Lopes G, Mendonça LGD, Rivera FA, Guagnini F, Perez RV *et al.* Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2012;95(4):1794-1806.

31. Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvao KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004;82:513-535.
32. Werven T, Waldeck F, Souzac AH, Flohc S, Englebienne M. Review: Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility. *Anim Reprod Sci* 2013;138(3):143-149.
33. Lòpez-Gatius F, Murugavel K, Santolaria P, Lòpez-Béjar M, Yániz JL. Pregnancy rate after timed artificial insemination in early post-partum dairy cows after Ovsynch or specific synchronization protocols. *J Vet Med Series A* 2004;51(1):33-38.
34. Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997;47(1):13-22.
35. Cattaneo L, Baudracco J, Lazzarini B, Ortega H. Methodology to estimate the cost of delayed pregnancy for dairy cows: an example for Argentina. *Rev Brasil Zoot* 2015;44(6):226-229.