



Efectos de la inyección de dosis aumentadas de vitaminas C y E en los parámetros reproductivos del ganado lechero Holstein



Juan González-Maldonado^a

Raymundo Rangel-Santos^{a*}

Raymundo Rodríguez-de Lara^a

Gustavo Ramírez-Valverde^b

J. Efrén Ramírez Bribiesca^c

J. Manuel Vigil-Vigil^d

M. Fernando García-Espinosa^d

^a Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Estado de México, 56230, México. Tel: +52-595-9521621.

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

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

^d Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia: rangelsr@outlook.com

Resumen:

Las vitaminas C y E se han suplementado por separado para mejorar la fertilidad en el ganado. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las inyecciones combinadas de dosis aumentadas de vitaminas C y E en parámetros reproductivos del ganado lechero. Las vacas lactantes Holstein (n= 44) se asignaron al azar a uno de tres tratamientos: 1) Testigo: n = 15, las vacas no fueron inyectadas con vitaminas; 2) VCE3: n= 15, recibieron una única inyección intramuscular de 3,000 UI de vitamina E antes del estro y múltiples inyecciones subcutáneas de vitamina C con una dosis total de 3,000 mg antes y después del estro; 3) VCE6: n= 14, las vacas se trataron como en VCE3, pero las dosis de vitaminas C y E se incrementaron a 6,000 mg y 6,000 UI. Los indicadores reproductivos

medidos fueron el diámetro del folículo preovulatorio, el tiempo al celo, el área del cuerpo lúteo, la tasa de preñez 35 y 45 días después de la IA y las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona. No hubo efecto del tratamiento en ninguno de los parámetros reproductivos evaluados ($P>0.05$), excepto que la dosis más baja de vitaminas mantuvo tasas de gestación similares entre los tratamientos, aunque tuvieron concentraciones de progesterona más bajas ($P\leq 0.05$) (19.4 ± 2.66 vs 10.1 ± 2.55 vs 19.2 ± 0.44 ng mL⁻¹ para los grupos Testigo, VCE3 y VCE6, respectivamente). En conclusión, la suplementación con la mayor cantidad de vitamina C y E (6,000 mg y 6,000 UI frente a 3,000 mg y 3,000 UI) no aumenta significativamente los parámetros reproductivos medidos.

Palabras clave: Antioxidantes, Bovinos, Fertilidad.

Recibido: 08/05/2017

Aceptado: 11/07/2018

Introducción

Algunos estudios han sugerido un papel fisiológico de las vitaminas C y E en la reproducción del ganado^(1,2). Se ha reportado una mejora en la fertilidad del ganado después de la suplementación con vitamina E^(3,4). Esta vitamina puede mejorar la fertilidad por un efecto antioxidante directo en el desarrollo del folículo y el embrión⁽⁵⁾ o al influir en la apoptosis y proliferación de las células foliculares⁽⁶⁾.

La vitamina C es necesaria para reactivar la actividad antioxidante de la vitamina E^(7,8). El efecto de la vitamina C en la función reproductiva está mediado por su participación en la síntesis de colágeno, la secreción de hormonas y sus propiedades antioxidantes⁽⁹⁾. Se ha sugerido que varias inyecciones de vitamina C antes y después del estro pueden mejorar la fertilidad en vacas repetidoras⁽¹⁰⁾. Desafortunadamente, hay poca investigación que evalúe el efecto de esta vitamina en el comportamiento reproductivo del ganado lechero. Faltan estudios recientes que analicen los impactos de la vitamina C en la fertilidad; los investigadores pueden haber perdido interés en evaluar las respuestas reproductivas del ganado a esta vitamina, porque se piensa que los bovinos no requieren suplementación con vitamina C⁽¹¹⁾.

Se sabe que la tasa de preñez en vacas mejora cuando se inyectan 3,000 mg de vitamina C y 3,000 UI de vitamina E al mismo tiempo el día esperado de la emergencia del folículo preovulatorio, en conjunto con inyecciones de vitamina C al momento de detectado el celo y dos días después de la inseminación artificial (IA)⁽¹²⁾. La primera inyección de estas vitaminas tuvo como objetivo afectar el desarrollo del folículo^(6,13) y, posiblemente, la calidad del ovocito. La segunda inyección de vitamina C se administró para emular el

aumento natural de esta vitamina durante el estro en el ganado⁽¹⁴⁾. La tercera dosis de vitamina C se inyectó para influir en la funcionalidad del cuerpo lúteo^(15,16). Por tanto, según la experiencia anterior, la hipótesis probada en este estudio fue que las vacas inyectadas con 6,000 mg de vitamina C y 6,000 UI de vitamina E antes y después del estro sincronizado tendrán una tasa de gestación más alta que las vacas inyectadas con 3,000 mg de vitamina C y 3,000 UI de vitamina E.

Material y métodos

Todos los procedimientos técnicos y de manejo de animales en este estudio se realizaron siguiendo las pautas del Consejo Canadiense para el Cuidado Animal (Canadian Council on Animal Care)⁽¹⁷⁾.

Animales, tratamientos y diseño experimental

El experimento se realizó en la granja de investigación en ganado lechero de la Universidad Autónoma Chapingo, México. Se asignó al azar a vacas lecheras Holstein lactantes ($n=44$) de 4.6 ± 0.35 años de edad, con un promedio de 163.4 ± 20.0 días de lactación y en un hato con registro histórico de $22 \text{ L día}^{-1} \text{ vaca}^{-1}$, a uno de tres tratamientos: 1) Testigo: $n=15$, las vacas no fueron inyectadas con vitaminas; 2) VCE3: $n=15$, las vacas recibieron una inyección i.m. de 3,000 UI de vitamina E ((\pm) α -tocoferol®, Sigma-Aldrich) en el día-5 (el día 0 es el día de la extracción del dispositivo intravaginal) e inyecciones s.c. de 3,000 mg de vitamina C (ácido ascórbico®, Q.P., Reasol) el día-5, inmediatamente después de la detección del estro y 2 días después de la inseminación artificial; 3) VCE6: $n=14$, las vacas se trataron como en el grupo VCE3, pero las dosis de vitaminas E y C se incrementaron a 6,000 UI y 6,000 mg, respectivamente. El diseño experimental fue completamente aleatorio y la unidad experimental fue una vaca.

Manejo reproductivo

La onda folicular de las vacas se sincronizó con un dispositivo intravaginal que contenía 1.0 g de progesterona (Sincrogest®, Ourofino Agronegocio, Sao Paulo, Brasil), insertado intravaginalmente durante 8 días, y una inyección i.m. de 250 μg de un análogo de GnRH (GnRH®, Sanfer) al momento de la inserción del dispositivo intravaginal. La regresión del cuerpo lúteo se indujo por inyección i.m. de 500 μg de cloprostenol (Celosil®, MSD

Animal Health) al momento de extraer el dispositivo intravaginal. Una vez que se retiró el dispositivo intravaginal, los animales se monitorearon constantemente (al menos cada 2 h) mediante observación directa en busca de signos externos de estro (se consideró una vaca en celo cuando ésta aceptó la monta de otra). Las vacas se inseminaron artificialmente 12 h después de la detección del estro con una dosis única (aproximadamente 20×10^6 espermatozoides) de semen de un solo toro de fertilidad comprobada.

Nutrición y alimentación

Los animales recibieron una dieta que proporcionó 1,117 UI de vitamina E ($51.5 \text{ kg día}^{-1} \text{ vaca}^{-1}$) con alfalfa fresca (21.9 kg), maíz ensilado (21.9 kg) y concentrado comercial (7.7 kg), llamado Ganadero 18, Productos Agropecuarios Tepexpan, SA de CV con 18 % de proteína, 4 % de grasa y 12 % de fibra. El contenido de vitamina E en la dieta se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución⁽¹⁸⁾.

Parámetros reproductivos

Los parámetros reproductivos medidos fueron: el diámetro del folículo preovulatorio, el tiempo al estro después de la extracción del dispositivo intravaginal, el área del cuerpo lúteo (CL), la tasa de gestación y las concentraciones sanguíneas de estradiol y progesterona. El diámetro del folículo preovulatorio y el área de CL se midieron mediante ecografía en tiempo real (Aloka Prosund 2, equipado con un transductor de matriz lineal de 7,5 MHz, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Japón) por el mismo técnico. El diámetro del folículo preovulatorio se calculó mediante el promedio de sus medidas horizontales y verticales inmediatamente después de la detección del estro; mientras que el área de CL se calculó directamente en el ecógrafo nueve días después de la IA. El diagnóstico de gestación se realizó 30 y 45 días después de la IA por medio de ecografía. Se colectaron muestras de sangre de la vena coccígea, utilizando tubos que contenían heparina sódica como anticoagulante (BD Vacutainer®), inmediatamente después de la detección del estro y nueve días después de la IA. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min, y el plasma se separó y se almacenó a -20 °C hasta el día del análisis, para la determinación de las concentraciones de estradiol y progesterona por ELISA (Estradiol y progesterona-Elisa, DRG Instruments, GmbH, Alemania).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en las variables procedentes sólo de vacas que presentaron estro. El número de vacas que mostraron estro para cada uno de los tratamientos fue: Testigo= 14, VCE3= 13 y VCE6= 14. Se hizo una prueba de normalidad de los residuos utilizando PROC CAPABILITY del modelo final para cada variable. Cuando los residuos no satisfacían la prueba de normalidad, los datos se sometieron a transformación logarítmica. El modelo estadístico incluyó el efecto fijo del tratamiento. Además, los días en la leche y la edad de la vaca se incluyeron en el modelo final únicamente cuando fueron significativas. Los resultados se presentan como media \pm error estándar (EE). En todos los casos, $P \leq 0.05$ se le consideró significativa. Los datos se analizaron mediante PROC GLM, excepto la tasa de gestación, y las medias se compararon con la prueba de Tukey. La tasa de gestación a los 30 y 45 días fue analizada por PROC GLIMMIX considerando una distribución binaria y utilizando la función *logit*. Se utilizó el paquete estadístico SAS para todos los análisis.

Resultados

Los impactos de inyectar dosis mayores de vitaminas C y E en el desarrollo de estructuras ováricas y las concentraciones hormonales en el ganado lechero se muestran en el Cuadro 1. En general, las vacas suplementadas con las dosis más altas de vitaminas C y E tendieron a tener un folículo preovulatorio de menor tamaño ($P = 0.06$), pero las concentraciones de estradiol en sangre no se vieron afectadas por las inyecciones de vitamina ($P > 0.05$). El tamaño del cuerpo lúteo no fue diferente entre los tratamientos. Sin embargo, las vacas que recibieron la dosis más baja de vitaminas tuvieron concentraciones inferiores de progesterona en la sangre ($P \leq 0.05$) que las del grupo testigo y las que recibieron la dosis más alta de vitaminas. Además, la tasa de gestación 30 y 45 días después de la IA en las vacas del grupo testigo no fue diferente al de las vacas que recibieron vitaminas (Figura 1).

Cuadro 1: Efecto de la suplementación (media±EE) con 3,000 mg y 3,000 IU, 6,000 mg y 6,000 IU de vitaminas C y E, en el tamaño de la estructura ovárica, la presentación del estro y la concentración hormonal en vacas lecheras Holstein

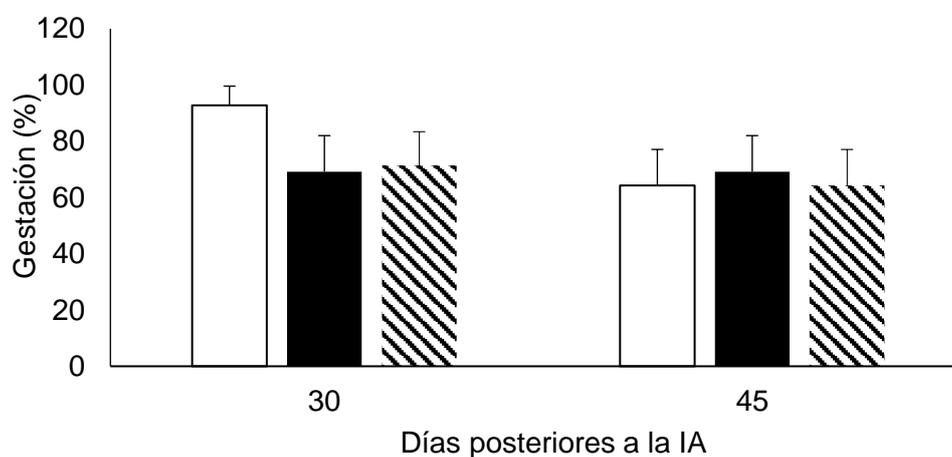
Variable	Tratamiento			P
	Testigo	VCE3	VCE6	
Tiempo para el estro, h	48.1±5.17	55.2±5.36	62.1±5.10	0.17
Diámetro del folículo preovulatorio, mm	18.9±0.71	17.1±0.73	16.5±0.69	0.06
Concentraciones de estradiol en plasma, pg mL ⁻¹	37.8±4.19	40.1±4.00	38.8±3.85	0.92
Área del cuerpo lúteo, cm ²	6.7±0.52	7.3±0.54	6.0±0.52	0.25
Concentraciones de progesterona en plasma, ng mL ⁻¹	19.4±2.66	10.1±2.55*	19.2±2.44	0.02

* Significativamente diferente de otros grupos ($P \leq 0.05$).

VCE3 grupo suplementado con 3,000 mg de vitamina C y 3,000 IU de vitamina E.

VCE6 grupo suplementado con 6,000 mg de vitamina C y 6,000 IU de vitamina E.

Figura 1: Porcentaje de gestación 30 y 45 días después de la IA en vacas Holstein del grupo testigo (barras blancas), VCE3 (barras negras) y VCE6 (barras achuradas)



VCE3 grupo suplementado con 3,000 mg de vitamina C y 3,000 IU de vitamina E; VCE6 grupo suplementado con 6,000 mg de vitamina C y 6,000 IU de vitamina E.

Discusión

Se ha reportado en el ganado lechero una relación entre el tamaño del folículo preovulatorio y la probabilidad de que una vaca sea diagnosticada como gestante después de una IA a tiempo fijo⁽¹⁹⁾. Las vacas con folículos preovulatorios entre 13.5 y 17.5 mm tienen más probabilidades de quedar gestantes después de una IA a tiempo fijo⁽²⁰⁾. Una posible explicación del efecto del tamaño del folículo preovulatorio en la tasa de gestación podría depender del grado de competencia del ovocito. De acuerdo con los resultados de un estudio *in vitro*⁽²¹⁾, a medida que el folículo aumenta de tamaño de 3 a 15 mm, el diámetro del ovocito también aumenta, y se ha informado que los ovocitos de mayor tamaño tienen mayor capacidad de desarrollo⁽²²⁾. Otra posibilidad es que los cuerpos lúteos en desarrollo provenientes de folículos grandes produzcan más progesterona que aquellos provenientes de folículos pequeños⁽²³⁾. Como respaldo a los hallazgos anteriores, las vacas donadoras con folículos preovulatorios mayores de 12.5 mm tuvieron una mayor probabilidad de producir embriones de buena calidad⁽²⁴⁾, pero aquellas con folículos preovulatorios mayores de 20 mm están en riesgo de pérdida de la gestación⁽²⁵⁾.

Las vacas inyectadas con vitaminas C y E tenían folículos preovulatorios que caían por debajo del umbral en el que aumenta la probabilidad de obtener una gestación después de la IA⁽²⁰⁾. Dado que las vacas inyectadas con las dosis más altas de vitaminas tendieron a tener folículos preovulatorios más pequeños, se esperaría una tendencia similar en las concentraciones de estradiol. Sin embargo, las concentraciones de esta hormona y la tasa de gestación entre los grupos experimentales no fueron diferentes. Los resultados de estudios *in vitro* indican que la vitamina C no afecta la producción de estradiol folicular, pero sí afecta la estructura del folículo⁽¹³⁾, y la vitamina E mejora la supervivencia de las células de la granulosa⁽⁶⁾. Los resultados del presente estudio coinciden con los obtenidos en estudios *in vitro* sobre la producción de estradiol. Además, investigaciones anteriores encontraron que las concentraciones de estradiol y la tasa de preñez no se ven influidas por el tamaño del folículo preovulatorio en vacas que muestran estró⁽²⁶⁾.

La progesterona producida por el cuerpo lúteo después de la IA es responsable del mantenimiento de la gestación. Las vacas lecheras con buen mérito genético para los rasgos de fertilidad tuvieron un cuerpo lúteo más grande y producen más progesterona que las que tienen un mérito genético deficiente⁽²⁷⁾. Por tanto, el aumento en el tamaño del cuerpo lúteo y la producción de progesterona podrían manipularse para mejorar la fertilidad en el ganado lechero. Con base en su relevancia fisiológica, la vitamina C puede ser un activo importante para influir en el desarrollo del cuerpo lúteo. Se ha reconocido que el ácido ascórbico apoya la biosíntesis de colágeno durante la formación de tejidos y la maduración del cuerpo lúteo⁽¹⁵⁾, alcanzando la concentración más alta en la fase lútea media⁽²⁸⁾. Además, las concentraciones de vitamina C se correlacionan positivamente con el tamaño del cuerpo lúteo y las concentraciones de progesterona⁽¹⁶⁾. Sin embargo, el

tamaño del cuerpo lúteo no se vio afectado por la suplementación con vitaminas en este estudio y las concentraciones de progesterona fueron menores en las vacas inyectadas con las dosis más bajas de vitaminas C y E.

El cuerpo lúteo fue observado y medido por medio de ecografía, y se supone una correlación positiva entre su tamaño y funcionalidad⁽²⁹⁾. Sin embargo, los resultados de este y otros estudios están en desacuerdo. Las vacas inyectadas con la dosis reducida de vitaminas, independientemente de tener un tamaño similar de cuerpo lúteo, produjeron menos progesterona que los otros grupos. De manera similar, investigaciones anteriores no encontraron una correlación entre el tamaño del CL en la fase de regresión y las concentraciones de progesterona en vacas⁽³⁰⁾. Además, otros encontraron que después del día 8 del ciclo estral, el tamaño del cuerpo lúteo no determina las concentraciones de progesterona⁽³¹⁾. Este hallazgo respalda los resultados del presente trabajo, ya que el cuerpo lúteo se midió en el día 9 del ciclo estral. Se desconoce la razón por la discrepancia entre los resultados de estos estudios, pero se deben considerar tres puntos cuando las mediciones de CL y las concentraciones de progesterona se analicen al mismo tiempo. En primer lugar, a partir de la experiencia de campo, a veces los técnicos que realizan las ecografías no logran encontrar la posición en la cual el muestre la vista más amplia del CL; esto puede producir confusión cuando se busca una relación con las concentraciones de progesterona. En segundo lugar, el cuerpo lúteo es una estructura ovárica dinámica, que se identifica y se mide más fácilmente durante la etapa lútea media del ciclo del estro, pero la medición de esta estructura en una etapa muy temprana (día 2 a 3 después del estro) del desarrollo requiere una gran experiencia. En tercer lugar, al diagnosticar el estado del cuerpo lúteo, se debe tener en cuenta no solo su tamaño sino también su aspecto ecográfico⁽³²⁾.

No se encontraron estudios que intenten evaluar el efecto del aumento de dosis de vitamina E y C en la fertilidad del ganado lechero. Otros estudios han demostrado un efecto positivo en la tasa de gestación al suplementar las vitaminas C⁽¹⁴⁾ y E⁽³³⁾ por separado. El efecto está mediado por la mejora de la supervivencia de las células del folículo⁽⁶⁾, la competencia de los ovocitos, la funcionalidad del cuerpo lúteo^(15,16,34) o la supervivencia del embrión^(35,36). Si bien algunos experimentos anteriores muestran una mejora en la tasa de preñez en vacas inyectadas con vitaminas⁽¹²⁾, los resultados del presente estudio no apoyan tales hallazgos. Sin embargo, vale la pena señalar que las vacas inyectadas con la dosis más baja de vitaminas, a pesar de tener concentraciones más bajas de progesterona, fueron capaces de mantener tasas de gestación similares, 30 y 45 días después de la IA, en comparación con los otros grupos evaluados.

La progesterona estimula cambios en el ambiente uterino, lo que permite la receptividad y la supervivencia del embrión⁽³⁷⁾. Las concentraciones de progesterona requeridas para aumentar la probabilidad de que ocurra una gestación no están bien establecidas. Se puede argumentar que las concentraciones de progesterona más altas son mejores que las más bajas para que una vaca se preñe. Sin embargo, las investigaciones han sugerido un rango de concentraciones de progesterona en la leche, dentro del cual se ha obtenido la máxima supervivencia del embrión⁽³⁸⁾. La existencia de un rango de concentraciones de

progesterona adecuadas para incrementar la probabilidad de obtener una gestación es aceptable, porque una gran concentración de progesterona podría afectar la fertilidad al crear una asincronía entre el ambiente uterino y el embrión⁽³⁹⁾; mientras que un ambiente uterino con bajas concentraciones de progesterona no inducirá los cambios necesarios para albergar el embrión⁽⁴⁰⁾. Además de la concentración de progesterona, es bien sabido que la calidad del embrión afecta la probabilidad de gestación, y que los embriones de buena calidad son mejores, para lograr no sólo una gestación, sino también llevarla a término en un entorno uterino con concentraciones variables de progesterona, que los embriones de calidad inferior⁽⁴¹⁾. Por lo tanto, es posible que las vacas inyectadas con la dosis más baja de vitaminas hayan tenido embriones de buena calidad⁽³⁶⁾, capaces de sobrevivir y establecer una gestación en un entorno uterino con bajas concentraciones de progesterona.

Conclusiones e implicaciones

La suplementación con vitaminas C y E no afectó el tamaño del folículo preovulatorio y del cuerpo lúteo, la producción de estradiol en el día del estro o la tasa de gestación 30 y 45 días después de la IA. La suplementación con la mayor cantidad de vitamina C y E no afectó significativamente los parámetros reproductivos evaluados.

Literatura citada:

1. Allison RD, Laven RA. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. *Vet Record* 2000;147:703-708.
2. Ranjan R, Ranjan A, Dhaliwal GS, Patra RC. L-Ascorbic acid (vitamin C) supplementation to optimize health and reproduction in cattle. *Vet Q* 2012;32:145-150.
3. Baldi A, Savoini G, Pinotti L, Monfardini E, Cheli F, Orto VD. Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows. *J Vet Med Assoc* 2000;47:599-608.
4. Horn M, Gunn P, Van Emon M, Lemenager R, Burgess J, Pyatt NA, Lake SL. Effects of natural (RRR α -tocopherol acetate) or synthetic (all-rac α -tocopherol acetate) vitamin E supplementation on reproductive efficiency in beef cows. *J Anim Sci* 2010;88:3121-3127.
5. Al-Enazi MM. Influence of α -tocopherol on heat stress-induced changes in the reproductive function of Swiss Albino mice. *Saudi J Biol Sci* 2007;14:61-67.

6. Ren SQ, Wang JW, Chen HY, Xu MQ, Jiang H, Gao Y, et al. Effect of vitamin E on bovine granulosa cells apoptosis and proliferation through cx43. *China Anim Husbandry Vet Med* 2016;43:615-621.
7. Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim* 2005;40:93-97.
8. Chauhan SS, Celi P, Ponnampalam EN, Leury BJ, Liu F, Dunshea FR. Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: role of vitamin E and selenium. *Anim Reprod Sci* 2015;54:1525-1536.
9. Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA. Ascorbic acid and fertility. *Biol Reprod* 1995;52:262-266.
10. McIntosh RA. Ascorbic acid (vitamin C) for the treatment of impotency in bulls and sterility in cows. *Can J Comp Med* 1941;5:267-268.
11. NRC. National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Washington, DC, USA: National Academic Press; 2001.
12. González-Maldonado J, Santos RR, De Lara RR, Ramirez GV. Impacts of vitamin C and E injections on ovarian structures and fertility in Holstein cows under heat stress conditions. *Turk J Vet Anim Sci* 2017;41:345-350.
13. Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction* 2001;122:487-495.
14. Phillips PH, Lardy HA, Boyer PD, Werner GM. The relationship of ascorbic acid to reproduction in the cow. *J Dairy Sci* 1941;24:153-158.
15. Luck MR, Zhao Y. Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. *J Reprod Fertil* 1993;99:647-652.
16. Serpek B, Baspinar N, Haliloglu S, Erdem H. The relationship between ascorbic acid, oestradiol 17 β and progesterone in plasma and in ovaries during the sexual cycle in cattle. *Rev Med Vet* 2001;152:253-260.
17. Canadian Council on Animal Care in Science. CCAC guidelines on: The care and use of farm animals in research, teaching and testing. Ottawa, CA: Canadian Council on Animal Care; 2009.
18. Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991;572:103-116.

19. Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2007;99:34-43.
20. Keskin A, Mecitoğlu G, Bilen E, Güner B, Orman A, Okut H, Gümen A. The effect of ovulatory follicle size at the time of insemination on pregnancy rate in lactating dairy cows. *Turkish J Vet Anim Sci* 2016;40:68-74.
21. Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996;45:943-956.
22. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 1997;48:769-774.
23. Robinson RS, Hammond AJ, Hunter MG, Mann GE. The induction of a delayed post-ovulatory progesterone rise in dairy cows: a novel model. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:285-295.
24. Atkins JA, Smith MF, MacNeil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, *et al.* Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J Anim Sci* 2013;91:722-733.
25. Colazo MG, Behrouzi A, Ambrose DJ, Mapletoft RJ. Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology* 2015;84:377-383.
26. Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, *et al.* Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *PNAS* 2005;102:5268-5273.
27. Cummins SB, Lonergan P, Evans AC, Butler ST. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. *J Dairy Sci* 2012;95:3698-3710.
28. Rapoport R, Sklan D, Wolfenson D, Shaham-Albalancy A, Hanukoglu I. Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochim Biophys Acta* 1998;1380:133-140.
29. Kayacik V, Salmanoğlu MR, Polat B, Ozluer A. Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. *Turkish J Vet Anim Sci* 2005;29:1311-1316.
30. Assey RJ, Purwantara B, Greve T, Hyttel P, Schmidt MH. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology* 1993;39:1321-1330.
31. Mann GE. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Anim Reprod Sci* 2009;115:296-299.

32. Veronesi MC, Gabai G, Battocchio M, Mollo A, Soldano F, Bono G. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. *Theriogenology* 2002;68:61-68.
33. Richardson MJ, Lemenager RP, Pyatt N, Lake SL. Natural source vitamin E supplementation and reproductive efficiency in beef cows. *Western Am Soc Anim Sci* 2008;59:339-342.
34. Vierk JE, Murdoch WJ, Austin KJ, Van-Kirk EA, Hansen TR. Antiluteolytic effect of alpha tocopherol in ewes. *J Dairy Sci* 1998;81:372.
35. Olson SE, Seidel GE Jr. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 2000;62:248-252.
36. Sales JN, Dias LM, Viveiros AT, Pereira MN, Souza JC. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows with beta-carotene and tocopherol. *Anim Reprod Sci* 2008;106:77-89.
37. Lonergan P. New insights into the function of progesterone in early pregnancy. *Anim Frontiers* 2015;5:12-17.
38. Stronge AJ, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64:1212-1224.
39. Randi F, Fernandez-Fuertes B, McDonald M, Forde N, Kelly AK, Bastos-Amorin H, et al. Asynchronous embryo transfer as a tool to understand embryo-uterine interaction in cattle: is a large conceptus a good thing?. *Reprod Fertil Develop* 2015;28:1999-2006.
40. Kenyon AG, Mendonça LG, Lopes G Jr, Lima JR, Santos JE, Chebel RC. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2013;136:223-230.
41. Yovich JL, Conceicao JL, Stanger JD, Hinchliffe PM, Keane KN. Mid-luteal serum progesterone concentrations govern implantation rates for cryopreserved embryo transfers conducted under hormone replacement. *Reproductive Biomed Online* 2015;31:180-191.