

EFFECTO DE UNA INYECCIÓN ÚNICA DE PROGESTERONA, CINCO DÍAS DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN, EN LA FERTILIDAD DE VACAS LECHERAS

EFFECT OF A SINGLE INJECTION OF PROGESTERONE FIVE DAYS AFTER INSEMINATION ON DAIRY COW FERTILITY

Carlos I. Roque-Velázquez, Hugo H. Montaldo-Valdenegro, Carlos G. Gutiérrez-Aguilar, Joel Hernández-Cerón*

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
México, D.F., 04510. (jhc@unam.mx)

RESUMEN

Asociación positiva se ha encontrado entre las concentraciones de progesterona en los días 5 y 7 del ciclo estral y la sobrevivencia embrionaria. La adición de progesterona entre los días 5 y 9 posinseminación favoreció el desarrollo embrionario y el mismo tratamiento no tuvo efecto cuando se aplicó entre los días 12 y 16. En este estudio se probó si una inyección única de progesterona 5 d después de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción (PC) en vacas lecheras. Para el experimento se usaron 855 vacas con número diferente de servicios y partos. Las vacas se asignaron al azar a dos tratamientos 5 d después de la inseminación: P_4 ($n=427$), recibieron una inyección intramuscular de 500 mg de progesterona; testigo ($n=428$), no recibieron progesterona. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal entre los 40 y 50 d posinseminación. Las concentraciones de progesterona se determinaron mediante radioinmunoanálisis en seis vacas de cada grupo durante 7 d desde el quinto día posterior a la inseminación. El PC se comparó mediante un análisis de regresión logística. Las variables independientes fueron tratamiento, días en leche (<90 , 90 a 150 y >150 d), número de partos (primíparas en comparación con múltiparas), tipo de puerperio (normal en comparación con patológico), condición corporal (≤ 2.5 o >2.5) y tipo de estro (natural, Ovsynch y PGF2 α). Las concentraciones de progesterona se compararon mediante un modelo lineal para mediciones repetidas. El PC fue similar ($p=0.39$) en las vacas del grupo P_4 (32 %) y el testigo (29 %). No se detectó efecto de interacción de tratamiento en las otras variables independientes ($p>0.10$). Las vacas del grupo P_4 tuvieron concentraciones mayores ($p\leq 0.05$) de progesterona en las 48 h después del tratamiento. La inyección de progesterona 5 d después de la inseminación no mejora el PC en vacas lecheras.

ABSTRACT

A positive association was found between progesterone concentrations on days 5 and 7 of the estrous cycle and embryo survival. Addition of progesterone between days 5 and 9 post-insemination favored embryo development and the same treatment had no effect when applied between days 12 and 16. This study tested whether a single injection of progesterone 5 d after insemination increases conception rate (CR) in dairy cows. For the experiment, 855 cows with different number of inseminations and parturitions were used. The cows were assigned randomly to one of two treatments 5 d after insemination: P_4 ($n=427$) received an intramuscular injection of 500 mg progesterone; control ($n=428$) did not receive progesterone. Pregnancy was diagnosed by transrectal palpation between days 40 and 50 post-insemination. The concentrations of progesterone were determined by radioimmunoassay in six cows of each group during 7 days as of day five post-insemination. CR was compared using logistic regression analysis. The independent variables were treatment, days in milk (<90 , 90 to 150 and >150 d), number of parturitions (primiparous compared with multiparous), type of puerperium (normal compared with pathological), body condition score ≤ 2.5 or >2.5 and type of estrus (natural, Ovsynch and PGF2 α). Progesterone concentrations were compared by a linear model for repeated measurements. CR ($p=0.39$) for cows of group P_4 (32 %) was similar to that of control cows (29 %). No effect of interaction ($p>0.10$) of treatment with other independent variables was detected. Group P_4 cows had higher concentrations ($p\leq 0.05$) of progesterone 48 h after treatment. The progesterone injection 5 d after insemination does not improve CR in dairy cows.

Key words: Fertility, progesterone, dairy cows.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2015. Aprobado: enero, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 287-296. 2016.

Palabras clave: Fertilidad, progesterona, vacas lecheras.

INTRODUCCIÓN

En las vacas lecheras la fertilidad baja se debe a la incidencia elevada de muerte embrionaria temprana (Diskin *et al.*, 2006). Una de las causas de muerte del embrión está relacionada con el atraso en su desarrollo y la subsiguiente reducción de la secreción de interferón- τ , por lo cual fracasa la inhibición de la luteólisis (Mann y Lamming, 2001). El atraso del desarrollo embrionario puede estar determinado por la disminución de las concentraciones séricas de progesterona (Mann y Lamming, 2001; Leroy *et al.*, 2008). Las vacas lecheras de producción alta tienen niveles menores de progesterona debido a que el cuerpo lúteo produce menos progesterona (Stronge *et al.*, 2005) y porque catabolizan más rápido las hormonas esteroides (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003).

La adición de progesterona ha favorecido el desarrollo embrionario y la secreción de interferón- τ (Mann y Lamming, 1999; Mann *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2008). En la práctica, existen varios enfoques para aumentar los niveles séricos de progesterona y, con ello, mejorar la proporción de vacas gestantes del total inseminado (porcentaje de concepción). La progesterona se administra mediante implantes o dispositivos intravaginales con resultados variables (Mann y Lamming, 1999; Larson *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2012). También las concentraciones sanguíneas de progesterona y el porcentaje de concepción se han aumentado mediante la inducción de la formación de un cuerpo lúteo accesorio, con la inyección de hCG 5 días después del servicio (Santos *et al.*, 2001; Urzúa *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2013).

La respuesta a la progesterona es dependiente del tiempo posterior a la inseminación; así, si se proporciona entre los días 5 a 9 hay un efecto favorable en el desarrollo del embrión y en la secreción de interferón- τ ; en contraste, el mismo tratamiento no tiene efecto cuando se aplica entre los días 12 y 16 (Mann y Lamming, 1999; Mann *et al.*, 2006). Además, hay asociación positiva entre las concentraciones de progesterona en los días 5 a 7 del ciclo estral y la sobrevivencia embrionaria (Stronge *et al.*, 2005). Macmillan y Peterson (1993) observaron que la inserción de un dispositivo liberador de progesterona del día 6 al 8 después de la inseminación incrementó la fertilidad, pero su inserción después de ese periodo

INTRODUCTION

Low fertility in dairy cows is due to high incidence of early embryo death (Diskin *et al.*, 2006). One of the causes is related to delay in embryo development and the subsequent reduction in interferon- τ secretion, causing failure of luteolysis inhibition (Mann and Lamming, 2001). Delay in embryo development may be determined by diminishing progesterone serum concentrations (Mann and Lamming, 2001; Leroy *et al.*, 2008). High-producing dairy cows have lower progesterone levels because the *corpus luteum* produces less progesterone (Stronge *et al.*, 2005) and because they catabolize steroid hormones more rapidly (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003).

Progesterone addition has favored embryo development and secretion of interferon- τ (Mann and Lamming, 1999; Mann *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2008). In practice, there are several approaches to increasing progesterone serum levels and, thus, improving the proportion of pregnant cows (conception rate). Progesterone is administered using implants or intravaginal devices with variable results (Mann and Lamming, 1999; Larson *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2012). Increased progesterone blood concentrations and conception rate are achieved by inducing formation of an accessory *corpus luteum* by injecting hCG five days after insemination (Santos *et al.*, 2001; Urzúa *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2013).

Response to progesterone depends on the time elapsed after insemination. Thus, if progesterone is added between days 5 and 9 after insemination, there is a favorable effect on embryo development and interferon- τ secretion. In contrast, the same treatment has no effect when applied between days 12 and 16 (Mann and Lamming, 1999; Mann *et al.*, 2006). Moreover, there is a positive association between concentrations of progesterone during days 5 to 7 of the estrous cycle and embryo survival (Stronge *et al.*, 2005). Macmillan and Peterson (1993) observed that insertion of a progesterone release device from day 6 to 8 post-insemination increased fertility, but after this time, insertion had no favorable effect. These observations suggest that there is a physiological period in which an increase in progesterone serum levels can favor embryo survival and, consequently, fertility. One way to increase

no tuvo efecto favorable. Estas observaciones permiten proponer que hay un periodo fisiológico en el cual el aumento de los niveles séricos de progesterona puede favorecer la sobrevivencia embrionaria y, en consecuencia, la fertilidad. Una manera de aumentar la concentración de progesterona sanguínea es mediante el uso de dispositivos intravaginales liberadores de esta hormona. Pero estos dispositivos en vacas de alta producción generan incrementos marginales de progesterona entre 0.8 y 1 ng mL⁻¹ (Cerri *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009). La inyección de 500 mg de progesterona en vacas en lactancia incrementa las concentraciones sanguíneas de esta hormona más de 1 ng mL⁻¹ dura 48 a 72 h (Flores *et al.*, 2013). El objetivo del presente estudio fue probar si una inyección intramuscular de 500 mg de progesterona 5 d después de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas lecheras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre agosto y diciembre del 2011, en un hato lechero ubicado en el altiplano central de México. El clima de la región es templado subhúmedo, con temperatura anual promedio de 15.5 °C y precipitación pluvial media anual de 861 mm.

Manejo reproductivo del hato

El establo cuenta con 2350 vacas en producción, en un sistema de manejo de tres ordeños al día. La producción promedio de leche por lactación es de 10 500 kg. Se utilizaron 855 vacas de diferente número de partos y servicios; alimentadas con una ración mezclada y balanceada de acuerdo con las recomendaciones del NRC (National Research Council, 2001).

La revisión reproductiva para el diagnóstico y tratamiento de las patologías del puerperio se realizó en los primeros 10 d posparto, y se aplicaron los tratamientos farmacológicos específicos para cada caso. Entre los días 25 y 32 posparto todas las vacas recibieron una dosis luteolítica de PGF2 α (Celosil, MSD Salud Animal), la cual se repitió en dos ocasiones más con intervalo de 14 días. Las vacas que mostraron estro después de la segunda o tercera inyección de PGF2 α se inseminaron con semen de toros de fertilidad probada. Las vacas que no mostraron estro después de la tercera inyección de PGF2 α se incorporaron a un protocolo de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo (Programa Ovsynch).

La detección de celos se realizó mediante observación visual y podómetros. Tanto en las vacas inseminadas que mostraron signos

progesterone blood concentration is through the use of intravaginal devices that release this hormone. These devices, however, result in marginal blood progesterone increases of 0.8 to 1 ng mL⁻¹ (Cerri *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009) in high-producing cows. An injection of 500 mg progesterone in lactating cows increases blood concentrations of this hormone more than 1 ng mL⁻¹ and lasts 48 to 72 h (Flores *et al.*, 2013). The objective of this study was to test whether an intramuscular injection of 500 mg progesterone 5 d after insemination increases conception rate in dairy cows.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted from August to December in a dairy herd located on the central high plateau of Mexico. The climate of the region is temperate subhumid with an annual average temperature of 15.5 °C and mean annual rainfall of 861 mm.

Reproductive management of the herd

The stable has 2350 producing cows in a management system of three milkings a day. Average production per lactation is 10 500 kg. For the experiment, 855 cows with different numbers of parturitions and inseminations were used. They were fed a mixed ration, balanced according to the recommendations of the NRC (National Research Council, 2001).

Examination for diagnosis and treatment of puerperium pathologies was performed in the first 10 d postpartum. Specific pharmacological treatments were applied for each case. From day 25 to 32 postpartum, all the cows received a luteolytic dose of PGF2 α (Celosil, MSD Animal Health), which was repeated on another two occasions with a 14-day interval. The cows that exhibited estrus after the second or third injection of PGF2 α were inseminated with semen from bulls of proven fertility. The cows that did not exhibit estrus after the third PGF2 α injection were enrolled in a synchronized ovulation protocol and fixed time insemination (Ovsynch Program).

Heat was detected by visual observation and pedometers. Both inseminated cows showing signs of estrus and fixed-time insemination cows were inseminated only when cervical mucous discharge and turgid uterus appeared.

Study design

On the fifth day after insemination, the cows were assigned randomly to one of two treatments: P₄ (n=427) received one

de estro como en las inseminadas en tiempo fijo, el servicio se realizó sólo cuando las vacas mostraron moco cervical y turgencia uterina.

Diseño del experimento

En el quinto día después de la inseminación, las vacas se asignaron al azar a dos tratamientos: P_4 ($n=427$), recibieron una inyección intramuscular de 500 mg de progesterona (Progesterona, Pfizer Salud Animal); el grupo testigo ($n=428$) no recibió progesterona. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal entre los días 40 y 50 posinseminación. El intervalo del retorno al estro se registró y clasificó como intervalos normales (18 a 24 d), cortos (<17 d), largos (25 a 35 d), dobles (36 a 48 d) y de más de 48 d (Tixi *et al.*, 2009a).

Además, seis animales de cada grupo se seleccionaron para extraerles muestra de sangre durante 7 d, a partir del quinto día posinseminación. Las muestras se recolectaron en tubos al vacío con EDTA sódico y se centrifugaron a 1500 g por 20 min, el plasma separado se conservó congelado (-20 °C) hasta su análisis. Las concentraciones de progesterona se determinaron por radioinmunoanálisis en fase sólida (Coat-A-Count Progesterona Diagnostic Product Corporation, EE.UU.) con sensibilidad de 0.02 ng mL $^{-1}$ y coeficiente de variación intraensayo de 9.38 %.

Análisis estadístico

El porcentaje de concepción entre los tratamientos se comparó mediante análisis de regresión logística con el programa JMP. Las variables independientes fueron: tratamiento, días en leche (<90 , 90 a 150 y >150 d), número de parto (primíparas o multíparas), tipo de puerperio (normal o patológico), condición corporal al momento del tratamiento (≤ 2.5 o >2.5) y tipo de estro (natural, Ovsynch y PGF2 α).

Las concentraciones de progesterona se compararon mediante modelo lineal para mediciones repetidas, por el procedimiento MIXTO de SAS, con máxima verosimilitud restringida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de concepción no se modificó por efecto de la inyección de progesterona (Cuadro 1). La inyección 5 d después de la inseminación provocó incremento sanguíneo transitorio de la hormona en las siguientes 48 h, en comparación con las vacas testigo (Figura 1; $p \leq 0.05$). Las interacciones no fueron significativas entre las variables independientes ($p > 0.10$). En el presente estudio se propuso que un incremento temporal de los niveles séricos de progesterona en el diestro temprano podría favorecer la

intramuscular injection of 500 mg progesterone (Progesterone, Pfizer Animal Health) and the control ($n=428$) received no progesterone. Pregnancy was diagnosed by transrectal palpation between days 40 and 50 post-insemination. The interval of return to estrus was recorded and classified as normal (18 to 24 d), short (<17 d), long (25 to 35 d), double (36 to 48 d) and more than 48 d (Tixi *et al.*, 2009a). In addition, six animals of each group were selected to extract blood samples during 7 d as of the fifth day post-insemination. The samples were collected in vacuum tubes with sodium EDTA and centrifuged at 1500 for 20 minutes. The separated plasma was preserved frozen (-20 °C) until analysis. Progesterone concentrations were determined by solid phase radioimmunoassay (Coat-A-Count Progesterone Diagnostic Product Corporation, USA) with a sensitivity of 0.02 ng mL $^{-1}$ and intra-assay variation of 9.38 %.

Statistical analysis

The conception rate was compared between treatments using logistic regression analysis with JMP software. The independent variables were treatment, days in milk (<90 , 90 to 150 and >150 d), parturition number (primiparous or multiparous), puerperium type (normal or pathological), body condition score at the time of treatment (≤ 2.5 or >2.5), and estrus type (natural, Ovsynch and PGF2 α).

Progesterone concentrations were compared using the linear model for repeated measurements with the MIXED procedure of SAS, with restricted maximum likelihood.

RESULTS AND DISCUSSION

The conception rate was not affected by injection of progesterone (Table 1). Injection 5 d after insemination caused a transient increase in blood during the following 48 h, relative to the control cows (Figure 1; $p \leq 0.05$). The interactions between variables were not significant ($p > 0.10$). In this study, we proposed that a temporary increase in the progesterone serum levels during early diestrus could favor fertility. This was supported by studies that found a positive association between progesterone concentrations from days 5 to 9 and embryo development (Macmillan and Peterson, 1993; Stronge *et al.*, 2005; Mann *et al.*, 2006). The absence of effect of the proposed treatment in this study may be due to the method of progesterone administration. In the cited studies (Macmillan and Peterson, 1993; Mann *et al.*, 2006), progesterone was administered using an intravaginal device, which

Cuadro 1. Odds ratio para la probabilidad de gestación de acuerdo a las variables en el modelo de regresión logística.
Table 1. Odds ratio for conception probability, according to the variables in the logistic regression model.

Variabes	Clases	n	PC*	Odds ratio	IC 95 %	P
Tratamiento	P ₄	427	32	Ref.		
	Testigo	428	29	0.87	0.64–1.18	0.39
Días en leche	<90	393	36	Ref.		
	90–150	186	31	0.62	0.40–0.95	0.03
	>150	276	22	0.48	0.32–0.71	0.00
Número de partos	Primíparas	400	34	1.54	1.09–2.05	0.01
	Múltiparas	455	27	Ref.		
Puerperio**	Normal	229	39	Ref.		
	Patológico	85	26	0.62	0.64–0.97	0.04
Condición corporal	≤2.5	274	29	Ref.		
	>2.5	581	31	1.24	0.90–1.73	0.18
Estro	Natural	448	27	Ref.		
	Ovsynch	102	38	1.88	1.17–2.99	0.00
	PGF2α	305	33	1.09	0.76–1.57	0.61
Retorno al estro	P ₄	99	36	1.4	0.72–2.75	0.31
	Testigo	88	29	Ref.		

*Porcentaje de concepción ♦ Conception rate.

**Sólo comprende vacas de primer servicio ♦ Only first service cows are included.

fertilidad, lo cual se sustentó en estudios en los que se encontró una asociación positiva de las concentraciones de progesterona entre los días 5 y 9 con el desarrollo embrionario (Macmillan y Peterson, 1993; Stronge *et al.*, 2005; Mann *et al.*, 2006). La falta de efecto del tratamiento propuesto en el presente estudio, pudo deberse al método de administración de la progesterona. En los estudios citados (Macmillan y Peterson, 1993; Mann *et al.*, 2006) la progesterona se administró mediante un dispositivo intravaginal, el cual provocó un incremento sostenido de las concentraciones sanguíneas, pero en el presente estudio el aumento abrupto se observó en las 24 h siguientes a la inyección y después la caída rápida en las subsiguientes 48 h. Para mantener niveles altos de progesterona durante el periodo referido en los estudios citados una segunda inyección a las 48 h o una vía diferente de aplicación, como la subcutánea, permitiría la absorción lenta de la hormona.

Los tratamientos basados en el aumento de las concentraciones sanguíneas de progesterona, ya sea mediante la suplementación con esta hormona o por

caused a sustained increase in blood concentrations. In our study, the increase observed was abrupt during the 24 h following the injection and during the subsequent 48 h there was a rapid fall. To maintain high levels of progesterone during the period referred to in the cited studies, a second injection 48 h later or a different mode of application, subcutaneous for example, would permit slower absorption of the hormone.

The treatments based on increasing blood progesterone concentrations, by supplementation or by inducing formation of an accessory *corpus luteum*, have had varying results, associated with characteristics of sub-populations of treated cows. Friedman *et al.* (2012) observed that progesterone supplementation increased fertility only in cows with a low body condition score and in cows with postpartum reproductive pathologies. Santos *et al.* (2001) and Urzúa *et al.* (2009) observed that cows that responded favorably to treatment with hCG 5 d after insemination were first service cows and, particularly, those that lost body condition in the 30 d

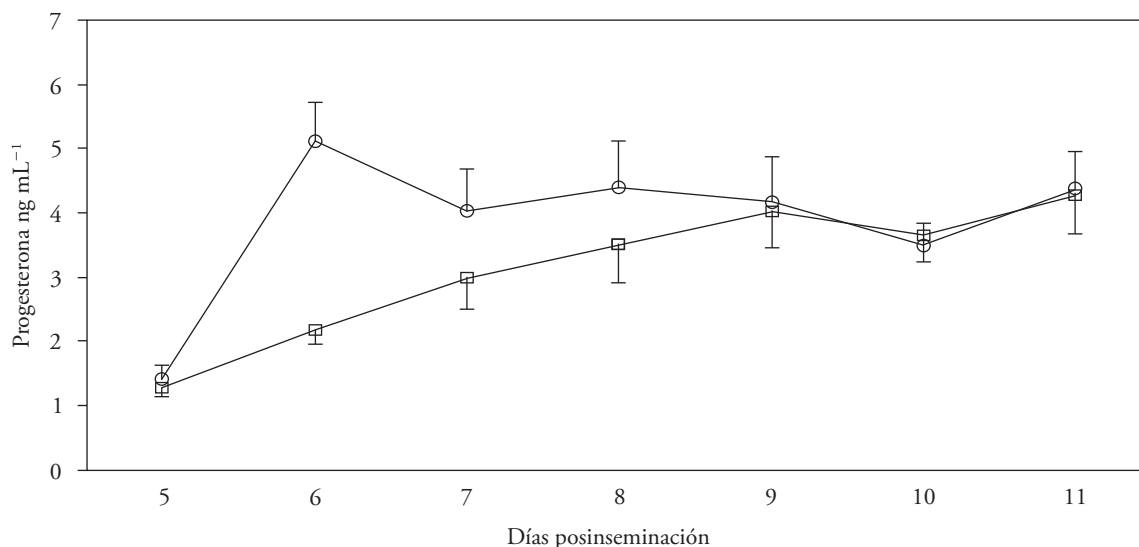


Figura 1. Concentraciones sanguíneas de progesterona (media $\pm$ error estándar) de vacas tratadas con 500 mg de progesterona (—○—) por vía intramuscular cinco días después de la inseminación, y testigos (—□—).

Figure 1. Blood progesterone concentrations (mean $\pm$ standard error) of cows treated with 500 mg intramuscular progesterone (—○—) at day five after insemination and of control cows (—□—).

medio de la inducción de la formación de un cuerpo lúteo accesorio, han mostrado resultados variables, asociados con las características de las subpoblaciones de las vacas tratadas. Así, Friedman *et al.* (2012) observaron que la suplementación con progesterona aumentó la fertilidad sólo en vacas con condición corporal baja y en vacas con patologías reproductivas posparto. Santos *et al.* (2001) y Urzúa *et al.* (2009) observaron que las vacas que respondieron favorablemente al tratamiento con hCG 5 d después de la inseminación fueron las de primer servicio y, particularmente, aquellas que perdieron condición corporal en los siguientes 30 d posinseminación. En el nuestro estudio el efecto de la interacción del tratamiento con la condición corporal no se observó; la dinámica de la condición corporal después del tratamiento no se cuantificó (Cuadro 1).

Los días en leche, el número de partos, el tipo de estro y las características del puerperio afectaron el porcentaje de concepción, pero no se observó una interacción de estas variables con el tratamiento ($p \geq 0.1$). La probabilidad de gestación fue menor en las vacas inseminadas entre los 90 y 150 y >150 d en leche respecto a las inseminadas en los primeros 90 d (Cuadro 1). Esto indica que las vacas más fértiles fueron las que se inseminaron en los primeros 90 d posparto. Este resultado es relevante porque

following insemination. In our study, the effect of the interaction treatment $\times$ body condition was not observed; body condition dynamics after treatment was not quantified (Table 1).

Days in milk, number of parturitions, type of estrus and characteristics of puerperium affected conception rate, but the interaction of these variables with the treatment ($p \geq 0.10$) was not observed. Likelihood of pregnancy was lower in cows inseminated 90 to 150 and >150 d in milk than in cows inseminated the first 90 d (Table 1). This indicates that the most fertile cows were those that were inseminated during the first 90 d postpartum. This result is relevant because it contrasts with Tixi *et al.* (2009b), who obtained higher conception rates as time from calving elapsed. In this way, in the cited study the most fertile cows were those that were inseminated in their third and fourth services. In our study, the conception rate of cows with more than 150 d in milk was 14 % lower than that of cows in their first 90 d (22 % *vs* 36 %). The reason for this result could be that repeat-breeding cows are concentrated in the group inseminated after 150 d in milk. Thus, this group had already been selected because they suffered from diverse problems that cause fertilization failure and embryo death (Fourichon *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2011).

contrasta con lo observado por Tixi *et al.* (2009b), quienes obtuvieron porcentaje de concepción mayor cuando las vacas se alejan del parto; así, en el estudio citado, las vacas más fértiles fueron las que se inseminaron en el tercero y cuarto servicios. En nuestro estudio, el porcentaje de concepción en las vacas con más de 150 d en leche fue 14 % menor al obtenido en los primeros 90 d (22 contra 36 %). Este resultado puede deberse a que las vacas repetidoras están concentradas en el grupo inseminado después de 150 d en leche. Así, este grupo de vacas ya fue seleccionado por padecer problemas diversos que provocan falla en la fertilización y muerte embrionaria (Fourichon *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2011).

En nuestro estudio las vacas primíparas tuvieron porcentaje de concepción mayor respecto a las múltiparas (Cuadro 1). La causa de la fertilidad mayor en las vacas primíparas no es clara; puede estar relacionada con la producción y consumo mayor de materia seca que tienen las vacas múltiparas en comparación con las primíparas (Berry *et al.*, 2006). Así, las vacas múltiparas estarían más expuestas a los efectos negativos de las concentraciones subnormales de progesterona debido al catabolismo hepático mayor de las hormonas esteroides (Sangsritavong *et al.*, 2002). Además, es posible que las vacas con más de un parto estén expuestas a más factores que disminuyen la fertilidad en comparación con las vacas de primer parto, como distocias, patologías del puerperio y problemas metabólicos (Gröhn y Rajala-Schultz, 2000; López-Gatius *et al.*, 2006).

El programa Ovsynch produjo un porcentaje mayor de concepción respecto a la inseminación realizada a estro observado (natural o inducido con PGF2 α ; Cuadro 1). Todas las inseminaciones se realizaron después de confirmar los signos genitales de estro, aún en las vacas del programa de Ovsynch. En este contexto, las vacas del programa Ovsynch pudieron ser más fértiles debido a que hubo sincronización mayor de la ovulación con el momento de la inseminación, se evitó inseminar vacas en anestro y el folículo ovulatorio fue un folículo con menos días de dominancia (Pursley *et al.*, 1995).

El efecto del tratamiento en la dinámica folicular no midió en el presente estudio. No obstante, el incremento agudo de las concentraciones sanguíneas de progesterona ocasiona atresia del folículo dominante y el surgimiento de una nueva oleada folicular (Ahman *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1998). Así, la inyección de progesterona podría inducir la atresia del folículo dominante en el día cinco, el surgimiento

In our study, primiparous cows had a higher conception rate than multiparous cows (Table 1). The cause of higher fertility of primiparous cows is not clear. It may be related to higher production and dry matter intake of the multiparous cows, compared with primiparous cows (Berry *et al.*, 2006). Thus, multiparous cows would be more susceptible to the negative effects of subnormal concentrations of progesterone because of greater hepatic catabolism of steroid hormones (Sangsritavong *et al.*, 2002). In addition, it is possible that the multiparous cows are exposed to more factors that decrease fertility, such as dystocia, puerperium pathologies and metabolic problems, than primiparous cows (Gröhn and Rajala-Schultz, 2000; López-Gatius *et al.*, 2006).

The Ovsynch protocol produced a higher conception rate than when insemination was performed at detected estrus (natural or PGF2 α induced; Table 1). All the inseminations were performed after confirming genital signs of estrus, even in the Ovsynch protocol cows. In this context, the Ovsynch protocol cows may have been more fertile due to better synchronization between ovulation and insemination; cows in anestrus were not inseminated and the ovulatory follicle had fewer days of dominance (Pursley *et al.*, 1995).

The effect of the treatment on follicle dynamics was not measured in this study. However, the acute increase in blood progesterone concentrations causes atresia of the dominant follicle and emergence of a new follicular wave (Ahman *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1998). Thus, the injection of progesterone could have induced atresia of the dominant follicle on day five, early emergence of the second follicular wave and an estrous cycle with three follicular waves, and thus a longer luteum phase (Bergfeld *et al.*, 1996; García *et al.*, 2004). In our study, the estrous cycle of progesterone treated cows was similar ($p>0.10$) to that of control cows ($P_4=21.2\pm1.8$ and control= 21.9 ± 1.6 days), suggesting that if there was an effect on follicular dynamics, it was not reflected in the duration of the luteum phase or the estrous cycle.

Another effect of modifying follicular dynamics following progesterone injection would be that the cows that did not conceive during the experimental cycle had a higher probability of conceiving in the following estrous cycle since, having three follicular waves, a follicle would be ovulating with fewer days

temprano de la segunda oleada folicular y un ciclo estral con tres oleadas foliculares, presentándose así una fase lútea más larga (Bergfeld *et al.*, 1996; García *et al.*, 2004). En nuestro estudio la duración del ciclo estral fue similar ($p > 0.10$) en las vacas tratadas con progesterona y en las testigo ($P_4 = 21.2 \pm 1.8$ y testigo $= 21.9 \pm 1.6$ días), lo cual permite especular que si hubo un efecto en la dinámica folicular no se reflejó en la duración de la fase lútea y del ciclo estral.

Otro efecto de la modificación de la dinámica folicular siguiente a la inyección de progesterona sería que las vacas que no concibieran en el ciclo experimental tuvieran probabilidad mayor de gestación en el ciclo subsiguiente, ya que al tener tres oleadas foliculares estarían ovulando un folículo con menos días de dominancia, lo que aumenta el potencial del ovocito para desarrollar un embrión viable (Ahman *et al.*, 1997). Sin embargo, el porcentaje de concepción de las vacas que retornaron en estro en un intervalo normal (18 a 24 d) fue 36 y 29 % ($p = 0.31$), para los grupos P_4 y testigo. Esto contrastó con lo observado por Flores *et al.* (2013), quienes encontraron que las vacas tratadas con progesterona en un programa similar tuvieron un porcentaje mayor de concepción en el retorno al estro que las vacas testigo.

Después de la inseminación se espera que todas las vacas no gestantes regresen en estro en un periodo normal (18 a 24 d); sin embargo, algunas vacas regresan en periodos cortos (< 17 d) o largos [largos (25 a 35 d) y dobles (36 a 48 d)] (Tixi *et al.*, 2009a). La determinación de los intervalos entre servicios es un método práctico para evaluar la eficiencia y precisión en la detección de estros, ya que permite estimar la proporción de vacas que se inseminó cuando no estaba en estro (intervalos cortos), y la proporción de vacas vacías no detectada en su retorno al estro. La causa principal de los intervalos largos se debe principalmente a la eficiencia baja en la detección de estros; sin embargo, puede deberse a otros factores, como la persistencia del cuerpo lúteo y la muerte embrionaria temprana (López-Gatius *et al.*, 2002; Starbuck *et al.*, 2004). En nuestro estudio, la distribución de los intervalos entre servicios fue similar entre los grupos P_4 y testigo (datos no mostrados). Sobresalió la variación del porcentaje de concepción obtenido en las vacas en el retorno al estro cuando tienen diferentes intervalos (Cuadro 2). Así, las vacas con mayor porcentaje de concepción son aquellas que se inseminaron después de un intervalo normal mientras que las de

of dominance. This would increase the potential of the oocyte to develop a viable embryo (Ahman *et al.*, 1997). However, the conception rate of the cows that returned to estrus within a normal interval (18 to 24 d) was 36 and 29 % ($p = 0.31$) for the P_4 groups and the control. In contrast, Flores *et al.* (2013) found that progesterone-treated cows under a similar protocol had a higher conception rate in the return to estrus than control cows.

After insemination, it is expected that all the cows that did not conceive would return to estrus within a normal period (18 to 24 d). However, some cows return in periods that are shorter (< 17 d), longer (25 to 35 d), or double (36 a 48 d) (Tixi *et al.*, 2009a). Determining the intervals between services is a practical method to evaluate efficiency and precision in detecting estrus since it permits estimating the proportion of cows that were inseminated when they were not in estrus (short intervals) and the proportion of non-pregnant cows not detected when they returned to estrus. The main cause of long intervals is mainly the low efficiency in estrus detection. However, other factors may be involved, such as persistence of the *corpus luteum* and early embryo death (López-Gatius *et al.*, 2002; Starbuck *et al.*, 2004). In our study, the distribution of intervals between services of the P_4 groups was similar to that of the control group (data not shown). The variation in conception rate obtained with cows returning to estrus when their intervals were different

Cuadro 2. Intervalos de retorno al estro después del servicio experimental (los datos incluyen a las vacas de ambos grupos).

Table 2. Return to estrus intervals after experimental insemination (data include cows from both groups).

Intervalos	Porcentaje	n	Porcentaje de concepción
Cortos (<17 días)	10	40	10
Normales (18–24 días)	47	187	32
Largos (25–35 días)	29	115	23
Dobles (36–48 días)	12	49	14
>48 días	2	7	0
	100 %	398	P = 0.03

menor fertilidad fueron las que se sirvieron después de un intervalo corto o doble. Las causas de la fertilidad menor en estas vacas no se pueden establecer con las observaciones hechas en el presente estudio.

CONCLUSIÓN

La administración de progesterona 5 días después de la inseminación no incrementa el porcentaje de concepción en vacas lecheras.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto IN219811-3 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los autores agradecen el apoyo del propietario, médicos veterinarios y trabajadores del Rancho Ex hacienda de San Sebastián.

LITERATURA CITADA

- Ahman, N., E. C. Townsend, R. A. Dailey, and E. K. Inskip. 1997. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles before and after breeding, in beef cow and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 49: 13-28.
- Bergfeld, E. G. M., F. N. Kojima, A. S. Cupp, M. E. Wehrman, K. E. Peters, V. Mariscal, T. Sanchez, and J. E. Kinder. 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of LH pulses and secretion of 17 β -estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.* 54: 546-54.
- Berry, D. P., R. F. Veerkamp, and P. Dillon. 2006. Phenotypic profiles for body weight, body condition score, energy intake, and energy balance across different parities and concentrate feeding levels. *Livest. Sci.* 104: 1-12.
- Carter, F., N. Forde, P. Duffy, M. Wade, T. Fair, M. A. Crowe, A. C. Evans, D. A. Kenny, J. F. Roche, and P. Lonergan. 2008. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 368-375.
- Cerri, R. L. A., H. M. Rutigliano, R. G. S. Bruno, and J. E. P. Santos. 2009. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 56-70.
- Díaz T., E. J. P. Schmitt, M. J. Thatcher, and W. W. Thatcher. 1998. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during estrus cycle of heifers. *J. Anim. Sci.* 76: 1929-1936.
- Diskin, M. G., J. J. Murphy, and J. M. Sreenan. 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 297-311.
- Flores, J. O., V. C. Roque, O. R. López, S.S. Benítez, A. M. Oropeza, y J. Hernández-Cerón. 2013. Porcentaje de concepción en vacas lecheras tratadas con progesterona en el día 5 después de la inseminación. *Rev. Mex. Ciencias Pec.* 4: 507-514.
- Fourichon, C., H. Seegers, and X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53: 1729-1759.
- Friedman, E., Z. Roth, H. Voet, Y. Lavon, and D. Wolfenson. 2012. Progesterone supplementation postinsemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. *J. Dairy Sci.* 95: 3092-3099.
- García, F. E. O., M. J. L. Cordero, A. E. Hizarza, O. J. Peralta, C. M. E. Ortega, M. Cárdenas, C. G. Gutiérrez, and T. E. M. Sánchez. 2004. Induction of a new follicular wave in holstein heifers synchronized with norgestomet. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 47-57.
- Gröhn, Y. T., and P. J. Rajala-Schultz. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 605-14.
- Larson, S. F., W. R. Butler and W. B. Currie. 2007. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 172-179.
- Leroy, J. L. M. R., G. Opsomer, A. Van Soom, I. G. F. Goovaerts, and P. E. J. Bols. 2008. Reduced fertility in high-yielding Dairy Cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 612-622.
- Lima, J. R., F. A. Rivera, C. D. Narciso, R. Oliveira, R. C. Chelbel, and J. E. P. Santos. 2009. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 5436-5446.
- López-Gatius, F., P. Santolaria, J. Janiz, J. Rutlant, and M. Lopez-Bejar M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 57: 1251-1261.
- López-Gatius, F., P. I. García-Ispuerto, P. Santolaria, J. Yániz, C. Nogareda, and M. López-Bejar. 2006. Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 65: 1678-1689.

(Table 2) was notable. The cows with the highest conception rate were those that were inseminated after a normal interval, while the least fertile were those that were inseminated after a short or double interval. The causes of low fertility in these cows cannot be established with the observations made in this study.

CONCLUSIONS

Administration of progesterone 5 days after insemination did not increase conception rate of dairy cows.

—End of the English version—



- Macmillan, K. L. and A. J. Peterson. 1993. A new intravaginal progesterone-releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 1-25.
- Mann, G. E., and G. E. Lamming. 1999. The influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle. *Reprod. Domesti. Anim.* 34: 269-274.
- Mann, G. E., and G. E. Lamming. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121:175-180.
- Mann, G.E., M. D. Fray, and G. E. Lamming. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in cow. *The Vet. J.* 171: 500-503.
- Nascimento, A. B., A. H. Souza, J. N. Guenther, F. P. Costa, R. Sartori and M. C. Wiltbank. 2013. Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 25: 818-24.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. National Academic Science, Washington, DC.
- Pursley, J. R., M. O. Mee, and M. C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $_{2\alpha}$ and GnRH. *Theriogenology*, 44: 915-923.
- Sangsritavong, S., D.K. Combs, R. Sartori, L. E. Armentano, and M. C. Wiltbank. 2002. High feed intake increase liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 2831-2842.
- Santos, J. E. P., W. W. Thatcher, L. Pool, and M. W. Overton. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79: 2881-2894.
- Starbuck, M. J., R. A. Dailey and K. Inskeep. 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 27-39.
- Stronge, A. J. H., J. M. Sreenan, M. G. Diskin, J. F. Mee, D. A. Kenny, and D. G. Morris. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64: 1212-1224.
- Tixi C., A. Villa-Godoy, C. García, y J. Hernández-Cerón. 2009a. Intervalo entre servicios y porcentaje de concepción en vacas lecheras en estabulación. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.* pp: 283.
- Tixi C., A. Villa-Godoy, C. García, H. Montaldo, E. Posadas, y J. Hernández-Cerón. 2009b. Factores que afectan el porcentaje de vacas gestantes en el día 90 posparto. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. México.* pp: 277.
- Urzúa E., C. G. Gutiérrez, A. Garza, C. Corona, G. Mapes, and C. J. Hernández. 2009. Pregnancy success and luteal function of lactating Holstein cows after hCG on day 5 after insemination. *J. Dairy Sci.* 92 suppl 1:443.
- Vasconcelos, J. L., S. Sangsritavong, S. J. Tsai and M. C. Wiltbank. 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 60: 795-807.
- Walsh, S. W., E. J. Williams and A. C. O. Evans. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 127-138.