

Porcentaje de concepción en vacas lecheras tratadas con progesterona cinco días después de la inseminación

Conception rate in dairy cattle treated with progesterone five days after insemination

Omar Alejandro Flores Jiménez^a, Carlos Iván Roque Velázquez^a, Reyes López Ordaz^b, Sergio Benítez Sánchez^a, Marco Antonio Oropeza Almazán^a, Joel Hernández Cerón^a

RESUMEN

El incremento temporal de las concentraciones séricas de progesterona entre los días cinco y nueve posinseminación favorece el crecimiento del embrión y la secreción de Interferón- τ . En este estudio se probó si una inyección de progesterona en el día cinco posinseminación incrementa el porcentaje de concepción (PC) en vacas lecheras. Se utilizaron 561 vacas de primero y segundo servicios. Las vacas se observaron en estro y se inseminaron bajo el programa "am-pm/pm-am". Cinco días después, se asignaron al azar a dos tratamientos: P4 (n= 282), recibieron 500 mg de progesterona i.m.; Testigo (n= 279), no recibieron progesterona. El diagnóstico de gestación se hizo mediante palpación rectal entre 45 y 50 días posinseminación. Para caracterizar el perfil sanguíneo de progesterona, cinco vacas no inseminadas que tuvieron un cuerpo lúteo recibieron dos inyecciones de PGF2 α con 24 h de diferencia; posteriormente, recibieron 500 mg de progesterona vía i.m. y se determinaron las concentraciones de progesterona diariamente durante seis días. No hubo diferencia ($P>0.10$) en el PC entre el grupo P4 (44 %) y el testigo (41 %). Las vacas tratadas con progesterona que retornaron al estro mostraron un PC mayor ($P<0.05$) que las vacas del grupo testigo (P4= 45 %; 31/69 vs testigo= 31 %; 31/99). Las concentraciones de progesterona fueron mayores de 1 ng/ml entre 48 y 72 h postratamiento. Se concluye que la administración de progesterona cinco días después de la inseminación no afectó el PC; sin embargo, este tratamiento incrementó el porcentaje de concepción en el ciclo subsiguiente.

PALABRAS CLAVE: Progesterona, Fertilidad, Vacas lecheras.

ABSTRACT

Temporary increase in progesterone serum levels between days five and nine after insemination enhances embryo development and interferon- τ secretion. In this experiment, it was tested whether an injection of progesterone on d 5 after insemination increases conception rate (CR) in dairy cattle. Five hundred and sixty one (561) first- and second-service cows were used. Cows were observed for estrus and were inseminated under the "am-pm/pm-am" program. Five days later, they were randomly assigned to two treatments: P4 (n=282), cows received 500 mg of progesterone im; Control (n=279), they did not receive progesterone. Gestation diagnosis was performed by rectal palpation on d 45 after insemination. In order to know the blood profile of progesterone after its injection, five non-inseminated cows with *corpus luteum* were selected, which received two PGF2 α injections at 24-h interval; 24 h after the second PGF2 α injection, cows received 500 mg of progesterone im, blood samples were daily taken for the next 6 d and progesterone concentrations were assessed. There was no difference ($P>0.10$) between P4 and control groups in the CR (44 vs 41 % pregnant). Cows from group P4 which returned to estrus showed a CR higher ($P<0.05$) than cows from control group (P4=45 %; 31/69 vs control=31 %; 31/99). Progesterone concentrations were higher than 1 ng/ml between 48 and 72 h after treatment. It was concluded that progesterone administration 5 d after insemination did not affect CR; however, this treatment increased the conception rate in animals returning to estrus.

KEY WORDS: Progesterone, Fertility, Dairy cows.

Recibido el 16 de enero de 2012. Aceptado el 13 de junio de 2012.

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. jhc@unam.mx. Correspondencia al último autor.

^b División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. México, D.F.

En la vaca lechera entre el 80 y el 90 % de los ovocitos es fertilizado, sin embargo, 40 % de los embriones muere antes del día 16 posinseminación⁽¹⁾. Una de las causas de la muerte embrionaria se relaciona con el retraso del desarrollo embrionario, lo cual reduce la capacidad del embrión para producir Interferón- τ , de tal forma que el embrión es incapaz de suprimir la síntesis de la prostaglandina F 2α (PGF 2α)^(2,3). El retraso del desarrollo embrionario puede ser consecuencia de las bajas concentraciones séricas de progesterona que padecen las vacas lecheras, lo cual se debe a que el cuerpo lúteo produce menos progesterona y a que catabolizan más rápido las hormonas esteroides⁽⁴⁻⁶⁾.

La administración de progesterona para aumentar la fertilidad en el ganado lechero ha aportado resultados variables; en vacas en lactación ha favorecido más consistentemente el porcentaje de concepción que en vaquillas⁽⁷⁻¹⁰⁾. Se ha observado, también, un efecto del tiempo después de la inseminación en que se administra el tratamiento, de tal forma que la administración con progesterona del día 5 al 9 posinseminación favorece el desarrollo del embrión y la secreción de Interferón- τ , mientras que el mismo tratamiento, entre el día 12 y el 16, no tiene efecto⁽¹¹⁾. Estos últimos resultados permiten proponer que hay un periodo fisiológico en el cual el aumento de los niveles séricos de progesterona podría favorecer la sobrevivencia embrionaria y, en consecuencia, el porcentaje de concepción. En el presente estudio, por lo tanto, se probó si la inyección de progesterona en el día cinco después de la inseminación en vacas lecheras incrementa el porcentaje de concepción.

Se utilizaron 561 vacas de primero y segundo servicios de siete establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hgo., con manejo y alimentación similares. Las vacas en estro se inseminaron por un sólo técnico bajo el programa "am-pm/pm-am". En todos los casos se evaluó la presencia de tono uterino, y moco cervical, así como los signos externos del estro. El semen

In dairy cows between 80 and 90 % of the oocytes are fertilized, however, 40 % of the embryos die before d 16 post insemination⁽¹⁾. One of the causes of the embryonic death relates to delay in embryonic development, which reduces the ability of the embryo to produce interferon- τ (so the embryo is unable to suppress prostaglandin F 2α (PGF 2α) synthesis)^(2,3). Delay in embryonic development may be caused by low serum progesterone concentrations in lactating dairy cows, because their corpus luteum produces less progesterone and they catabolize rapidly steroids hormones⁽⁴⁻⁶⁾.

The administration of progesterone to increase fertility in dairy cattle has provided variable results; in lactating cows has favored more consistently the conception rate than in heifers⁽⁷⁻¹⁰⁾. It has also been observed an effect by the time after the insemination in which the treatment is given, so progesterone administration from d 5 to 9 post insemination promotes embryo development and interferon- τ secretion (while the same treatment, between d 12 and 16, has no effect)⁽¹¹⁾. These latest results allow proposing that there is a physiological period, in which the increase in progesterone serum levels could favor embryo survival and, consequently the conception rate. In the present study, therefore, it was tested if the injection of progesterone on d 5 after insemination in dairy cows increases conception rate.

Lactating dairy cows (n= 561) of first and second services from seven herds located in Tizayuca, Hgo. with similar handling and feeding were used. Cows in estrus were inseminated by the same technician under the "AM-PM/PM-AM" program. In all cases, the presence of uterine tone, and cervical mucus, as well as external signs of estrus was evaluated. Semen of proven fertility bulls was used, selected according to the criteria of each barn. Five days later, cows were assigned randomly to two treatments: P4 (n= 282), in which the cows received im injection of 500 mg of progesterone;

utilizado fue de toros de fertilidad probada, seleccionado de acuerdo con los criterios de cada estable.

Cinco días después se asignaron las vacas al azar a dos tratamientos: P4 (n= 282), en el cual las vacas recibieron 500 mg de progesterona por vía intramuscular (im); en el segundo tratamiento (testigo, n= 279), no recibieron progesterona. El diagnóstico de gestación se hizo mediante palpación rectal entre los días 40 y 45 después de la inseminación.

Se realizó un análisis de regresión logística para variables binarias con el propósito de determinar las significancias de los efectos categóricos explicativos del tratamiento, hato, número de servicios, número de parto y días posparto sobre el porcentaje de concepción en el servicio experimental y en el ciclo subsiguiente (SAS versión 9.3)⁽¹²⁾.

Para caracterizar el perfil sanguíneo de progesterona posterior a su inyección, se seleccionaron cinco vacas de 50 a 60 días posparto que tuvieron un cuerpo lúteo diagnosticado mediante palpación rectal. Todas las vacas recibieron dos inyecciones de PGF2 α con 24 h de diferencia. Un día después de la

the second treatment (control, n= 279), did not receive progesterone. Pregnancy diagnosis was made by rectal palpation 40 to 45 d after insemination.

An analysis of logistic regression for binary variables was used in order to determine the significance of the explanatory categorical treatment effects, herd, number of services, number of calvings delivery and days postpartum on the conception rate, in the experimental service and in the subsequent cycle (SAS version 9.3)⁽¹²⁾.

To characterize the progesterone blood profile after the injection, five cows 50 to 60 d postpartum, which had a corpus luteum diagnosed by rectal palpation were used. All cows received two injections of PGF2 α 24 h apart. A day after the second injection of prostaglandin, cows received 500 mg of progesterone im and blood samples were taken during the next 6 d by coccygeal venipuncture in 5 ml vacuum tubes without anticoagulant. Afterwards, the samples were centrifuged at 1,500 xg for 10 min for the separation of serum, which was kept at -20 °C until analysis.

Progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay in solid phase (Coat-A-

Cuadro 1. Riesgo relativo para la probabilidad de gestación en vacas lecheras dependiente del tratamiento, número de parto y número de servicios

Table 1. Relative risk for the probability of pregnancy in dirty cows according to treatment, parity and number of services

Variables	n		P	Relative risk	Confidence interval (95%)
Treatments					
P4	282	44	0.84	0.87	0.55-1.38
Control	279	41		referencia	
Number of calvings					
1	391	43	0.84	0.76	0.41-1.42
≥2	136	38		referencia	
Number of services					
1	396	43	0.40	0.95	0.60-1.51
2	165	40		referencia	

segunda inyección de $\text{PGF2}\alpha$, las vacas recibieron por vía intramuscular 500 mg de progesterona y se tomaron muestras de sangre durante los siguientes seis días. Las muestras se obtuvieron mediante venopunción coccígea en tubos de 5 ml al vacío sin anticoagulante. Posterior a la obtención, las muestras se centrifugaron a 1500 xg durante 10 min para la separación del suero, el cual se conservó a -20°C hasta su análisis.

Las concentraciones de progesterona se determinaron mediante radioinmunoanálisis en fase sólida (Coat-A-Count Progesterona Diagnostic Product Corporation, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/ml y coeficientes de variación intraensayo para el control bajo de 3.4 % y el alto de 6.4 %.

Los resultados mostraron que la administración de progesterona vía intramuscular el día cinco

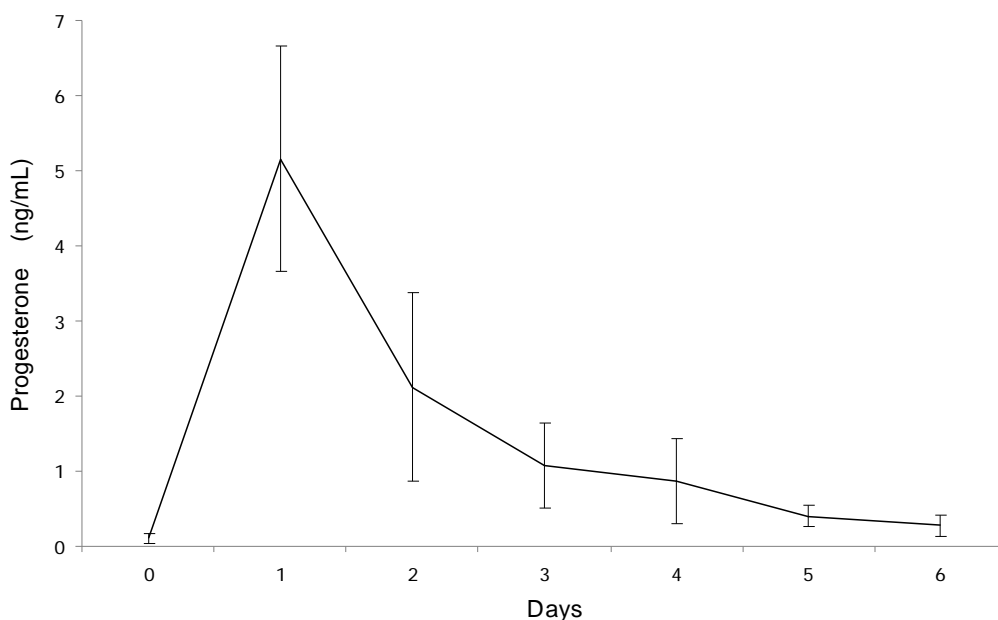
Count progesterone Diagnostic Product Corporation, USA). The sensitivity of the assay was 0.1 ng/ml and intra-assay variation coefficients for low control of 3.4 % and high of 6.4 %.

The results showed that administration of progesterone the d 5 after insemination did not affect the conception rate in the experimental cycle (Table 1). The interaction of the treatment with the herd, number of services, number of calvings and postpartum days did not affect the conception rate either (results not shown; $P>0.10$).

The serum progesterone levels in the sampled cows increased after the injection and remained above 1 ng/mL between 48 and 72 h (Figure 1). Although progesterone concentrations were not determined in the treated group, the injection of 500 mg of progesterone plus the

Figura 1. Concentraciones (Media \pm EE) de progesterona sérica (ng/ml) en vacas tratadas con 500 mg de progesterona por vía intramuscular. La flecha indica el momento de la inyección de la progesterona

Figura 1. Concentraciones (Media \pm EE) de progesterona sérica (ng/ml) en vacas tratadas con 500 mg de progesterona por vía intramuscular. La flecha indica el momento de la inyección de la progesterona



después de la inseminación no afectó el porcentaje de concepción en el ciclo experimental (Cuadro 1). La interacción del tratamiento con el hato, número de servicios, número de partos y días posparto tampoco afectó el porcentaje de concepción (resultados no mostrados; $P > 0.10$).

Los niveles séricos de progesterona en las vacas muestreadas aumentaron después de la inyección y se mantuvieron arriba de 1 ng/ml entre 48 y 72 h (Figura 1). Aunque no se determinaron las concentraciones de progesterona en las vacas inseminadas tratadas con esta hormona, es posible que la inyección de 500 mg de progesterona y la progesterona producida por el cuerpo lúteo hayan generado concentraciones séricas más altas que en las vacas testigo. Dicha especulación coincide con lo encontrado por Roque *et al*⁽¹³⁾, en un estudio similar. No obstante la inyección de progesterona, no se observó un efecto favorable en el porcentaje de concepción.

La causa de la falla del tratamiento con progesterona para aumentar el porcentaje de concepción se desconoce, pero puede estar relacionada con los días posparto en que se aplicó; en el estudio de Mann *et al*⁽¹¹⁾, las vacas tratadas no estaban en lactación y en el de Green *et al*⁽¹⁴⁾ estaban al final de la lactación (374 ± 32 días en leche). Mientras que en el presente trabajo la mayor parte de las vacas estaba en los primeros cien días posparto, de tal forma que estaban más cerca de los efectos del balance energético negativo y de los problemas del puerperio. Se sabe que en los primeros ciclos posparto el balance energético negativo afecta la función del cuerpo lúteo y disminuye el potencial de los ovocitos para desarrollar embriones viables^(15,16); además, los procesos inflamatorios del útero disminuyen la sobrevivencia embrionaria⁽¹⁷⁾. En estas condiciones, es posible que el efecto favorable del incremento temporal de las concentraciones séricas de progesterona en el desarrollo embrionario no sea suficiente para subsanar los efectos nocivos del periodo posparto temprano.

progesterone produced by the corpus luteum probably generated higher serum concentrations than in the control cows. Such speculation agrees with Roque *et al*⁽¹³⁾, in a similar study; nevertheless, the injection of progesterone, did not have a favorable effect on the conception rate.

The cause of the failure of treatment with progesterone to increase the conception rate is unknown, but may be linked to the postpartum days in which it is applied. In the study of Mann *et al*⁽¹¹⁾ treated cows were not in lactation and in the work of Green *et al*⁽¹⁴⁾ cows were at the end of lactation (374 ± 32 d in milk). While in the present work, most of the cows were in the first 100 d postpartum, closer to the effects of negative energy balance and puerperal problems. It is known that in the first post-partum cycles the negative energy balance affects the function of the corpus luteum and diminish the potential of oocytes to develop viable embryos^(15,16); in addition, inflammatory processes of the uterus decreases embryo survival⁽¹⁷⁾. In these circumstances, it is possible that the favorable effect of the temporary increase in serum concentrations of progesterone in embryonic development will be insufficient to compensate for the harmful effects of the early postpartum period.

The results of this study contrast with those of Urzua *et al*⁽¹⁸⁾ in first service cows, who induced the formation of an accessory corpus luteum in the d 5 after insemination through the hCG injection. With this treatment increased serum concentrations of progesterone and the conception rate. It is likely that the difference between studies lies in the duration of the increase in progesterone concentrations in blood. Thus, while in the present study the increase could be short-lived, in the study of Urzua *et al*⁽¹⁸⁾, cows treated with hCG maintained high progesterone concentrations between 6-16 post insemination, which could influence more consistently embryonic development. This possibility agrees also with other results⁽¹⁹⁾, where it was noted that the

Los resultados del presente estudio contrastan con los obtenidos por Urzúa *et al.*⁽¹⁸⁾, en vacas de primer servicio, quienes indujeron la formación de un cuerpo lúteo accesorio en el día cinco después de la inseminación mediante la inyección hCG. Con este tratamiento se incrementaron las concentraciones séricas de progesterona y el porcentaje de concepción. Es probable que la diferencia entre estudios radique en la duración del aumento de las concentraciones sanguíneas de progesterona. Así, mientras en el presente trabajo el incremento pudo ser de corta duración, en el estudio de Urzúa *et al.*⁽¹⁸⁾, la vacas tratadas con hCG mantuvieron concentraciones altas de progesterona entre los días 6 y 16 posinseminación, lo cual pudo influir más consistentemente en el desarrollo embrionario. Esta posibilidad coincide, también, con otros resultados⁽¹⁹⁾, donde se observó que el incremento de las concentraciones séricas de progesterona entre los días 3.5 y 10 posinseminación aumentó el porcentaje de concepción en vacas en lactación.

La inyección de progesterona incrementó ($P<0.05$) el porcentaje de concepción en el ciclo subsiguiente al tratamiento (retorno al estro entre 18 y 25 días después de la inseminación; (Cuadro 2). El número de servicios afectó el porcentaje de concepción en el ciclo subsiguiente ($P<0.05$). La interacción del

increase of serum progesterone concentrations between d 3.5 and 10 increased the conception rate in lactating cows.

The injection of progesterone increased ($P<0.05$) the conception rate in the subsequent cycle treatment (return to estrus between 18 and 25 d after insemination (Table 2). The number of services affected the percentage of conception in the subsequent cycle ($P<0.05$). The interaction of the treatment with the herd, number of services, number of calvings and postpartum days did not affect the conception rate in the subsequent cycle (results not shown; $P>0.10$).

The mechanism which explains this increase in conception in the subsequent cycle treatment is not clear; however, it may be related to modification of the follicular dynamic caused by the acute increase in blood progesterone concentrations. The injection of progesterone during diestrus induce atresia of the dominant follicle and the emergence of a new follicular wave^(20,21). Under these conditions, the injection of progesterone could cause follicular atresia, early emergence of the second follicular wave and an estrous cycle with three follicular waves, as described in other studies, when the follicle is eliminated with GnRH or hCG on d 5 of the cycle^(22,23). It is known that the ovulatory follicle in cows that show three follicular waves

Cuadro 2. Riesgo relativo para la probabilidad de gestación en vacas lecheras en el ciclo subsiguiente al tratamiento con progesterona en el día cinco después de la inseminación

Cuadro 2. Riesgo relativo para la probabilidad de gestación en vacas lecheras en el ciclo subsiguiente al tratamiento con progesterona en el día cinco después de la inseminación

Variables	n	%	P	Relative risk	Confidence interval (95%)
Treatment					
P4	69	45	0.03	0.48	0.24-0.94
Control	99	31		referencia	
Number of services					
1	120	42	0.03	2.30	1.04-5.12
2	48	25		referencia	

tratamiento con el hato, número de servicios, número de partos y días posparto no afectó el porcentaje de concepción en el ciclo subsiguiente (resultados no mostrados; $P > 0.10$).

El mecanismo que explica el incremento del porcentaje de concepción en el ciclo subsiguiente al tratamiento no está claro; sin embargo, puede estar relacionado con la modificación de la dinámica folicular provocada por el aumento agudo de las concentraciones sanguíneas de progesterona. La inyección de progesterona durante el diestro induce la atresia del folículo dominante y el surgimiento de una nueva oleada folicular^(20,21); bajo estas condiciones, la inyección de progesterona podría ocasionar atresia folicular, surgimiento temprano de la segunda oleada folicular y un ciclo estral con tres oleadas foliculares, tal como se describe en otros estudios, cuando se elimina el folículo con GnRH o hCG en el día cinco del ciclo^(22,23). Se conoce que el folículo ovulatorio de las vacas que muestran tres oleadas foliculares tiene menos días de dominancia que el folículo ovulatorio de una vaca que tiene dos oleadas foliculares, y los días de dominancia del folículo ovulatorio están asociados negativamente con el potencial del ovocito para desarrollar un embrión viable⁽²⁴⁾. De ser así, las vacas tratadas con progesterona fueron más fértiles en el ciclo subsiguiente debido a que ovularon folículos con menos días de dominancia.

Se concluye que la administración de progesterona cinco días después de la inseminación no afectó el porcentaje de concepción; sin embargo, este tratamiento incrementó el porcentaje de concepción en el ciclo subsiguiente.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto IN219811-3 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los autores agradecen a

has fewer days of dominance than the ovulatory follicle of a cow that has two follicular waves, and the days of dominance of the ovulatory follicle are negatively associated with the potential of the oocyte to develop a viable embryo⁽²⁴⁾. If so, the cows treated with progesterone were most fertile in the subsequent cycle since ovulated follicles with fewer days of dominance.

It is concluded that the administration of progesterone five days after insemination did not affect the conception rate; however, this treatment increased the percentage of conception in the subsequent cycle.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the project IN219811-3 of the National Autonomous University of Mexico. The authors are grateful to the farmers in the agricultural complex of Tizayuca; and, recognize the collaboration of Dr. Clara Murcia Mejía for hormonal determinations.

End of english version

los ganaderos del Complejo Agropecuario de Tizayuca su apoyo; reconocen, también, la colaboración de la Dra. Clara Murcia Mejía en las determinaciones hormonales.

LITERATURA CITADA

1. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008;43:260-267.
2. Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim* 1999;34:269-274
3. Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001;121:175-180.

4. Lonergan P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 2011;76:1594-1601.
5. Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increase liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17b in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002;85:2831-2842.
6. Vasconcelos JL, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 2003;60:795-807.
7. Robinson NA, Leslie KE, Walton JS. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1989;72:202-207.
8. Van Cleeff J, Drost M, Thatcher WW. Effects of post-insemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers. *Theriogenology* 1991;36:795-807.
9. Macmillan KL, Peterson AJ. 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* 1993;33:1-26.
10. Villarreal A, Martino A, BonDurant RH, Deletang F, Sischo WM. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology* 2004;61:1513-1520.
11. Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-t production in cow. *The Vet J* 2006;171:500-503.
12. SAS.SAS User's Guide: Statistic (Version 9.3). Cary NC, USA Inst. Inc., 2010.
13. Roque CI, Gutiérrez CG, Montaldo H, Hernández Cerón J. Fertilidad de vacas lecheras de diferentes números de servicios tratadas con progesterona en el día 5 después de la inseminación (resumen]. Congreso Nacional de Buiatría. Mérida, Yucatán. México. 2012:383.
14. Green MP, Hunter MG, Mann GE. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2005;88:179-189.
15. Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1988;71:1063-1072.
16. Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG, Bols PE. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2008;43:612-622.
17. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 2009;81:1025-1032.
18. Urzúa E, Gutierrez CG, Garza A, Corona C, Mapes G, Hernandez CJ. Pregnancy success and luteal function of lactating Holstein cows after hCG on day 5 after insemination. *J Dairy Sci* 2009;92(Suppl 1):443.
19. Larson SF, Butler WR, Currie WB. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination *Anim Reprod Sci* 2007;102:172-179.
20. Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of LH pulses and secretion of 17b-estradiol in bovine females. *Biol Reprod* 1996;54:546.
21. García FEO, Cordero MJL, Hizarza AE, Peralta OJ, Ortega CME, Cárdenas M, Gutierrez CG, Sánchez TEMT. Induction of a new follicular wave in Holstein heifers synchronized with norgestomet. *Anim Reprod Sci* 2004;80:47-57.
22. Diaz T, Schmitt EJP, Thatcher MJ, Thatcher WW. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during estrus cycle of heifers. *J Anim Sci* 1998;76:1929-1936.
23. Nishigai M, Takamura A, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. The effect of Human chorionic gonadotropin on the development and function of bovine corpus luteum. *J Reprod Dev* 2001;47:283-294.
24. Cerri R, Rutigliano HM, Chebel RC, Santos JEP. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 2009;137:813-823.