

APLICACIÓN DE GnRH EXÓGENA POST-IATF Y SU EFECTO EN LOS NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA Y TASA DE GESTACIÓN EN VACAS LECHERAS PRIMIPARAS EN AMBIENTES DE ALTITUD ELEVADA

Exogenous application of GnRH after fixed-time artificial insemination (FTAI) and its effect on serum progesterone levels and pregnancy rate in primiparous dairy cows at high altitude environments

Miguel A. Gutiérrez-Reinoso¹, Víctor M. Collaguazo-Gómez¹, Manuel García-Herreros²

- 1 Dirección de Investigación, Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Latacunga, Ecuador.
- 2 SENESCYT, Proyecto Prometeo, Quito, Ecuador.

Correspondencia:
Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Av. 9 de Octubre N22-64 y Ramírez Dávalos, Quito, Ecuador.
Tel.: (593) 2 2222-777 ext. 2704.

E-mail:
herrerosgm@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la aplicación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) los días 4°, 8° y 12° posteriores a la inseminación artificial a tiempo fijo (post-IATF) con el fin de evaluar su influencia en los niveles séricos de la hormona Progesterona (P4) y la tasa de gestación en vacas lecheras primíparas mantenidas en ambientes de altitud elevada. Se utilizaron cuatro grupos de animales (Control-T1, T2, T3 y T4) de la raza Holstein Friesian (1er parto) a los que se les aplicó una dosis única de GnRH (días 4° (T2), 8° (T3) y 12° (T4)) post-IATF. Inicialmente y posteriormente al tratamiento, se tomaron muestras sanguíneas a todos los grupos con el fin de determinar los niveles séricos de P4. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de P4 entre T1/T2 con respecto a T3 y T4, observando también diferencias estadísticamente significativas entre estos dos últimos tratamientos ($p < 0,05$). En cuanto a la tasa de gestación existieron diferencias estadísticamente significativas entre T1/T2/T4 con respecto a T3, siendo éste último un 20% más elevado ($p < 0,05$). En conclusión, la aplicación de la hormona GnRH post-IATF influyó significativamente en los niveles séricos de P4 (T3) obtenidos en vacas lecheras primíparas en condiciones ambientales de altitud elevada. Además, la tasa de gestación fue significativamente mayor al aplicar la hormona GnRH en el día 8° post-IATF (T3), siendo así posible optimizar protocolos de IATF conjuntamente con tratamientos hormonales post-IATF aumentando los niveles de fertilidad en vacas lecheras primíparas en ambientes de altitud elevada.

Palabras clave: GnRH, IATF, progesterona, altitud elevada, fertilidad, bovino

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the effect of the exogenous application of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on day 4, 8 and 12 after fixed-time artificial insemination (post-FTAI) in order to evaluate its influence on serum progesterone (P4) levels and pregnancy rate in primiparous dairy cows maintained at high altitude environments. Four experimental groups (Control-T1, T2, T3 and T4) of Holstein Friesian primiparous dairy cows were used. A single dose of GnRH (day-4 (T2), day-8 (T3) and day-12 (T4)) was applied post-FTAI. Before and after each treatment, blood samples were collected from the different experimental groups to determine P4 serum levels. Statistically significant differences were observed in serum P4 levels when T1 / T2 were compared to T3 and T4, noting also statistically significant differences between these two treatments ($p < 0.05$). Moreover, statistically significant differences were observed in pregnancy rates when T1 / T2 / T4 were compared to T3 treatment (20% higher) ($p < 0.05$). In conclusion, the exogenous application of GnRH post-FTAI

had a significant influence on serum P4 levels (T3) in primiparous dairy cows at high altitude environments. In addition, the pregnancy rate was significantly higher when exogenous GnRH was applied on day-8 (T3) post-FTAI, being possible to optimise FTAI protocols combined with hormonal treatments post-FTAI, and improving fertility in primiparous dairy cows at high altitude environments.

Keywords: GnRH, TAI, progesterone, high altitude, fertility, bovine

INTRODUCTION

Las condiciones ambientales de altitud elevada son uno de los factores que afectan directamente en la productividad del ganado lechero, un hecho especialmente relevante en países cuyas condiciones orográficas están caracterizadas por la posesión de zonas de media y alta montaña. Las frecuentes variaciones climáticas en este tipo de ambiente acompañadas de una restricción nutricional hacen que la rentabilidad de las explotaciones ganaderas se deteriore debido a la pérdida de fertilidad de sus animales. Uno de los problemas que aparecen de forma frecuente son los anejros prolongados y los problemas de ovulación debido a las condiciones climáticas extremas (Gutiérrez-Reinoso *et al.*, 2015a), especialmente en vacas de alta producción y de primer parto. El mercado pecuario actual exige a los productores la máxima eficiencia, y por tanto, la necesidad de recurrir a principios activos de origen hormonal se convierte en una práctica habitual para contrarrestar los efectos negativos derivados de las condiciones de altitud elevada. La tasa de gestación es uno de los parámetros más afectados, debido a la disminución de la fertilidad de forma generalizada. Otro factor determinante es que junto a las condiciones ambientales extremas, se suman factores de origen genético, debido a la presión de selección intensiva llevando a la productividad del ganado a niveles máximos, requiriendo un incremento en la ingesta de materia seca por parte del animal acompañada de una pérdida de fertilidad progresiva con el paso de los años (Dobson *et al.*, 2007).

Durante las primeras etapas de la gestación, el desarrollo embrionario en el ganado bovino necesita que los niveles de la hormona denominada progesterona (P4; pregn-4-en-3,20-diona) procedentes de la liberación por parte del cuerpo lúteo sean óptimos, especialmente durante los tres primeros meses de gestación, así como la producción concomitante de interferon-tau (IFNT) durante el período preimplantacional. Durante el diestro, los niveles de P4 alcanzan niveles críticos, debido a que predomina una bajada de la concentración de ésta, acompañada del incremento de la función luteinizante derivada del incremento de la hormona LH junto con el estradiol (E2) y la prostaglandina PGF2- α (Hafez *et al.*, 2000). La P4, por tanto, se convierte en uno de los pilares fundamentales para mantener la gestación contrarrestando los efectos de estas hormonas debido a la saturación de los receptores a nivel de útero y ovario, evitando la unión de dichos factores luteolíticos e impidiendo que el ciclo estral continúe su ciclicidad durante el período gestacional. Además estimula el crecimiento de las glándulas endometriales, bloquea la contracción uterina e inicia el desarrollo de los alvéolos de la glándula mamaria. También regula la secreción de gonadotropinas a nivel del eje hipotálamo-hipofisario inhibiendo la liberación de hormona folicular estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a nivel de la hipófisis anterior (Bearden *et al.*, 1982).

Desde hace décadas, el uso de P4 exógena se ha compatibilizado con otros principios activos para solucionar los problemas de fertilidad en el ganado bovino. Por ello, la implementación de protocolos hormonales conjuntamente con técnicas como la inseminación artificial (IA), pueden ser una

solución alternativa para mejorar los parámetros reproductivos en estas condiciones ambientales extremas donde además las patologías reproductivas tales como las endometritis y las piometras son relativamente frecuentes (Gutiérrez-Reinoso *et al.*, 2015b).

La aplicación de P4 exógena durante las primeras semanas ayuda a establecer unos niveles séricos de P4 suficientes para impedir que la gestación fracase (Diskin *et al.*, 2002). Sin embargo, numerosos protocolos usando P4 exógena han resultado no ser suficientemente eficaces. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es una hormona polipeptídica compleja liberada por el hipotálamo, cuyo centro de acción es la hipófisis y que estimula la liberación de las gonadotropinas (FSH y LH). La actividad de la GnRH es fundamental en el control del ciclo estral, con el fin de evitar la disfunción ovárica y prevenir de la mortalidad embrionaria (Peters *et al.*, 1996). Por lo tanto, el uso exógeno de ésta, podría ser una buena alternativa para mejorar las tasas de gestación de vacas lecheras primíparas en ambientes extremos de altitud y temperatura. Sin embargo, no hay apenas trabajos científicos contrastados que tengan en cuenta la aplicación de GnRH post-IA en diferentes etapas para el mantenimiento de la gestación en ganado bovino lechero primíparo mantenido en condiciones de altitud elevada. Por ello, el objetivo principal de la presente investigación fue evaluar el efecto exógeno de la aplicación post-IATF de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en diferentes intervalos de tiempo, con el fin de establecer un protocolo óptimo incremente los niveles séricos de P4 y aumente la tasa de gestación en ganado bovino lechero primíparo mantenido en condiciones ambientales de altitud elevada.

MATERIALES Y METODOS

Código de ética

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Animales y condiciones climáticas

En el presente estudio se utilizaron 40 vacas de raza Holstein Friesian (todas de 1er parto y condición corporal 2,5-3) ubicadas en el cantón Mejía, provincia de Pichincha, Ecuador (latitud: 0° 11'00" S; longitud: 78° 31' 00" W; altitud: 3.173 msnm). El clima de esta región según la clasificación del sistema Köppen-Geiger es Cfb con temperaturas medias de 9-11°C y humedad ambiental entorno al 75-80%. Todos los animales fueron sometidos a un previo control sanitario comprobando así la ausencia de patologías que puedan interferir en el diseño experimental. Además se hizo un diagnóstico por medio de ultrasonografía transrectal (SIUI CTS-900v) para determinar que los animales no presentaban patologías a nivel del tracto reproductivo.

Sincronización de celo e IATF

Se realizó un protocolo de sincronización y de IATF a todos los individuos de cada grupo, tal y como se describe a continuación: Día 0: Aplicación de 1 gr de P4 mediante dispositivo intravaginal (DIV; Syntex) + 2mg de Benzoato de Estradiol + 50 mg P4 vía intramuscular; Día 8: Retiro del DIV + Prostaglandina (500 µg de Cloprostenol) vía intramuscular; Día 9: Aplicación de 1mg de Benzoato de Estradiol vía intramuscular; Día 10: IATF a las 54 horas de retirado el DIV y después de 12 horas se realizó una segunda inseminación artificial. Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (10 animales por grupo). El primero (T1) se utilizó como grupo control, y a los otros tres grupos (T2, T3 y T4) se les aplicó intramuscularmente un volumen de 2,5 mL de Conceptal, un análogo sintético de hormona liberadora de GnRH (0,0042 mg/mL de Acetato de Buserelina) el 4° (T2), 8° (T3) y 12° (T4) días post-IATF, correspondientes a un total de 0,0105 mg de Acetato de Buserelina totales en cada dosis. Simultáneamente, se realizó una primera extracción de sangre a todos los animales para establecer los niveles séricos de P4 (días 4°, 8° y 12°). Posteriormente, con el fin de evaluar el efecto de la aplicación del análogo sintético de hormona liberadora de GnRH, se tomaron muestras sanguíneas del grupo control (T1) y de los demás grupos los días 11° (T2), 15° (T3) y 19° (T4) para determinar los niveles séricos de P4 (una semana tras la aplicación del Acetato de Buserelina). A continuación, se realizó diagnóstico ultrasonográfico transectal (SIUI CTS-900v) a los 35 días posteriores a la IATF para determinar la tasa de gestación [(N° vacas gestantes / N° vacas inseminadas) X100].

Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante la utilización del software estadístico SPSS v. 15 para Windows. Tras una previa exploración de los datos se procedió a la aplicación del test ANOVA para la comparación de las medias (concentraciones hormonales). Posteriormente, una vez que se determinó la existencia de diferencias entre las medias, se llevó a cabo un análisis de comparación múltiple Pos-hoc Scheffé. Para el análisis de las variables porcentuales se aplicó la prueba de χ^2 . Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Tabla 1. Resultados obtenidos de los niveles séricos de Progesterona (P4) y tasa de gestación en los diferentes grupos experimentales.

Grupo	CONC. P4 (Pre-GnRH) (ng/ml)	CONC. P4 (Post-GnRH) (ng/ml)	Tasa Gestación (%)
T1	3,94±4,70 ^{aA}	12,47±8,84 ^{aA}	40,00 ^a
T2	3,61±4,99 ^{aA}	13,25±10,48 ^{aA}	40,00 ^a
T3	16,50±11,71 ^{bA}	37,67±22,58 ^{bB}	60,00 ^b
T4	42,92±20,60 ^{aA}	17,74±17,94 ^{aB}	40,00 ^a

Las diferencias entre valores dentro de cada columna (a-c) se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Las diferencias entre valores dentro de cada fila (A-B) se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. T1: Control (n=10); T2: GnRH día 4° post-IATF (n=10); T3: GnRH día 8° post-IATF (n=10); T4: GnRH día 12° post-IATF (n=10).

Como se muestra en la Tabla 1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de

P4 pre-GnRH, post-GnRH y tasa de gestación entre los tratamientos T1 y T2 ($p > 0,05$). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos T1/T2 y los grupos T3/T4, así como entre estos dos últimos, en la concentración sérica de P4 pre-GnRH ($p < 0,05$). Posteriormente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de post-GnRH entre T1, T2 y T4 ($p > 0,05$), aunque sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos T1, T2 y T4 con respecto a T3 ($p < 0,05$). En cuanto a la tasa de gestación, existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T1, T2 y T4 con respecto a T3, siendo este último un 20,00% más elevado que el resto de tratamientos ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Las ventajas de la sincronización y la aplicación de técnicas de reproducción asistida como la IATF en ganado bovino pueden abrir nuevas perspectivas con el fin de mejorar la fertilidad de vacas primiparas mantenidas en condiciones de baja temperatura y altitud elevada. Según algunos autores, el aumento de los niveles séricos de P4 a partir del día 5 se debe a un aumento significativo del tejido luteal (Wiltbank *et al.*, 2014). Sin embargo, los animales que presentan niveles séricos de P4 iguales o inferiores a 6 ng/mL confirmarían una etapa de cuerpo lúteo en fase de diestro (T1 y T2), a diferencia del cuerpo lúteo gestacional. Por otra parte, niveles séricos de P4 iguales o superiores a 10 ng/mL denotarían cuerpos lúteos de media-alta producción de P4 compatibles con el período de gestación (T3 y T4) (Wiltbank *et al.* 2014).

Los resultados del presente estudio indicaron que los niveles de P4 alcanzados en los grupos T1, T2 y T4 no fueron suficientes para mantener los niveles séricos necesarios para llevar a cabo la gestación, a diferencia de los niveles de P4 conseguidos en el T3. En ocasiones, los niveles de P4 pueden ser superiores a los niveles alcanzados fisiológicamente en el diestro, debidos a la producción de P4 por parte de un cuerpo lúteo gestacional. Sin embargo, existe un alto número de animales en el que el diagnóstico de gestación a los 30-35 días es negativo. Este hecho se podría deber a que alrededor del 30% de las gestaciones se ven interrumpidas los primeros 14 días debido a diferentes factores, con la consecuente reabsorción embrionaria y pérdida de la gestación (Dunne *et al.* 2000). Además, según diferentes autores, de este porcentaje, un 80% de las reabsorciones tienen lugar alrededor del 8° día debido a que la transición de mórula a blastocisto es un momento crítico en las primeras etapas de la gestación.

No hay que olvidar que existen además otros porcentajes establecidos entre el 5-10% de pérdida embrionaria entre los días 14-19 debido a deficiencias en el reconocimiento del embrión por parte de la vaca, así como otro 5-10% de pérdidas embrionarias mientras se forma la placenta entre los días 18 y 28 (Morris *et al.* 2008). Este hecho demuestra que a pesar de que el animal no quedó gestante, los niveles de P4 en sangre se mantuvieron altos debido a la producción de P4 por parte de un cuerpo lúteo de gestación con tejido luteal bien desarrollado (Diskin *et al.* 2008). En estos casos, los niveles séricos de P4 se mantienen más allá del día 16 del ciclo estral, debido a que en el caso del cuerpo lúteo perteneciente a la fase de diestro, los niveles comienzan a decaer a partir de dicho día (Bearden *et al.* 1982; Hafez *et al.* 2000). En general, los altos niveles de P4 obtenidos en T3 difieren significativamente de los niveles estándar definidos

para el ganado bovino cuya explicación puede correlacionarse con el efecto de la aplicación del análogo de la GnRH, que activaría la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, dando lugar a la creación de nuevas ondas foliculares post-fecundación que a su vez darán lugar a cuerpos lúteos accesorios (Diskin *et al.*, 2002). Por tanto, los altos niveles séricos de P4 alcanzados especialmente en el T3, se deberían a un excedente de tejido luteal por la formación de dichos cuerpos lúteos accesorios, por lo que los niveles de P4 serían más elevados aumentando la tasa de gestación en dichos animales. De no haber gestación, el nivel sérico de P4 aumentaría proporcionalmente al crecimiento del cuerpo lúteo, cuyo tejido deja de proliferar aproximadamente a partir del día 7 pero manteniendo niveles séricos en aumento hasta aproximadamente el día 10 (Diskin *et al.*, 2008). Tal y como indican los resultados en el presente estudio, es importante señalar que el momento post-IATF de la aplicación del análogo de GnRH debe ser cuidadosamente elegido. Los resultados obtenidos en el presente estudio respecto a los niveles séricos de P4 difieren ligeramente de los niveles fisiológicamente establecidos. Este hecho puede deberse a las condiciones ambientales de altitud, así como a la edad de los animales, su condición de primíparas, cantidad y calidad de cuerpos lúteos accesorios formados, factores genéticos, manejo y estrés entre otros (Diskin *et al.*, 2008). Sin embargo, la aplicación del análogo de GnRH en el 8º día post-IATF es más eficiente en la producción de P4 sérica y en el mantenimiento de la gestación comparado con las aplicaciones en el día 4º y 12º lo que nos llevaría a concluir que el protocolo recomendado en vacas lecheras primíparas en condiciones de altitud elevada sería el T3. Esto podría deberse a que los niveles de P4 alcanzados durante la fase gestacional en T3 fueron los más eficientes, disminuyendo la contractibilidad del útero y estabilizando la gestación (Hincapie *et al.*, 2005). Este hecho se hace más evidente cuando comparamos T3 con el grupo control (T1) que determina que podría haber diferencias en los tiempos de formación del cuerpo hemorrágico y como consecuencia del cuerpo lúteo debido a que el tamaño de éste se correlaciona positivamente con los niveles séricos de P4 (Kastelic *et al.*, 1990). En el caso de T3 estaríamos en los niveles de P4 más altos, lo cual determina que se trataría de un protocolo de elección en dichos ambientes de baja temperatura y elevada altitud.

Respecto a T1 y T2 posiblemente el tamaño y la calidad del cuerpo lúteo se vean afectados por este tipo de ambientes extremos, que se hace más evidentes en animales primíparas dando lugar a cuerpos lúteos formados en ciclos cortos, siendo estos muy pequeños y de baja calidad, produciendo niveles muy bajos de P4 (< 3 ng/mL) durante los primeros días comparados con ciclos normales (≥ 10 ng/mL) (Walsh *et al.*, 2011). Por tanto, el efecto cronológico de la aplicación de la GnRH post-IATF puede ser determinante en la formación de cuerpos lúteos de calidad, mejorando las tasas de gestación en ambientes de altitud elevada manteniendo la producción de P4 igual o superior que en ciclos normales.

CONCLUSION

La aplicación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) post-IATF influyó significativamente en los niveles séricos de progesterona (P4) en vacas lecheras primíparas en condiciones ambientales de altitud elevada. Además, la tasa de gestación fue significativamente mayor al aplicar la hormona GnRH en el día 8º post-IATF (T3). Finalmente, el presente permitió desarrollar protocolos de IATF eficientes conjuntamente con tratamientos hormonales post-IATF en

ambientes de altitud elevada, manteniendo resultados de fertilidad satisfactorios similares a los obtenidos en otros ambientes de altitud moderada o baja en vacas lecheras primíparas.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a la Secretaría Nacional de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) del Gobierno de Ecuador por hacer posible el presente trabajo de investigación a través de su programa Proyecto Prometeo. También nos gustaría agradecer el esfuerzo de todos los técnicos, haciendas y centros experimentales que hicieron posible la ejecución de la presente investigación.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Todos los autores listados en el presente trabajo han contribuido en la preparación y ejecución de la presente investigación. MG-R y VC-G han contribuido en el desarrollo de la metodología. MG-R y MG-H han contribuido en la concepción y diseño del estudio, la edición del artículo y la supervisión del estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

REFERENCIAS

- Bearden J, Fuquay J. Reproducción Animal Aplicada. México: Manual Moderno, 1982.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2002; 23(1-2): 211-28.
- Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43(2):260-7.
- Dobson H, Smith R, Royal M, Knight Ch, Sheldon I. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod Domest Anim.* 2007;42 (2):17-23.
- Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci.* 2000; 58(1-2): 39-44.
- Gutiérrez-Reinoso MA, Bautista-Solis AR, Quinteros-Pozo R, García-Herreros M. Protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) y su efecto en la liberación de LH y tasa de gestación en vaquillas mantenidas en ambiente tropical húmedo. *SPERMOVA.* 2015a; 5(1): 29-32. doi: 10.18548/aspe/0002.6
- Gutiérrez-Reinoso MA, Masaquiza-Aragon JJ, Quinteros-Pozo R, García-Herreros M. Prevalencia de endometritis clínica y subclínica en vaquillas repetidoras mantenidas en ambiente tropical húmedo *SPERMOVA.* 2015b; 5(1): 97-101. doi: 10.18548/aspe/0002.22
- Hafez, E.S.E, Hafez, B. Reproducción e inseminación artificial en animales. South Carolina, U.S.A. : Mc. Graw Hill, 2000; 0-683-30577-8.
- Hincapié JJ, Brito R, Campo E. Reproducción animal aplicada: Fundamentos de fisiología y biotecnología. 2ª ed. Ed. Litocom Tegucigalpa, Honduras. 2005; 195 p.
- Kastelic, J., Bergfelt, D., & Ginther, O. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 1990; 1269-78.

- Morris D, Diskin M. Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2008; 2(8): 1112-9.
- Peters AR. (1996). Embryo mortality in the cow. *Anim. Breed.* 1996; 64: 587-98.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans AC. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2011; 123(3-4): 127-38.
- Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM, Baez GM, Diskin MG. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal*. 2014; 8(1): 70-81.