

Novos conceitos sobre sincronização, diagnóstico precoce da gestação e re-sincronização em vacas de leite

Matthew C. Lucy
Department of Animal Sciences, University of Missouri,
Columbia 65211
Email: lucym@missouri.edu

Pontos a Serem Lembrados

Há uma variedade de métodos para sincronizar a primeira inseminação em vacas leiteiras, mas menos de 50% das vacas emprenham com a primeira inseminação. Assim sendo, a maioria das vacas leiteiras precisa ser novamente inseminada.

A segunda inseminação baseada na observação do retorno ao estro não é eficiente porque muitas vacas não prenhes não mostram estro ou têm um retorno tardio ao estro após a primeira inseminação.

Alguns sistemas de segunda inseminação concentram os intervalos de retorno ao estro, mas em geral estes sistemas não aumentam o número total de vacas reinseminadas por causa das baixas taxas de expressão e detecção do estro.

O uso de inseminação artificial em tempo fixo (IA em tempo fixo) dentro de um sistema de segunda inseminação irá melhorar a resposta total.

1.0 Introdução

A sincronização parcial da segunda inseminação é conseguida quando a primeira inseminação é sincronizada. Isto porque a sincronização da primeira inseminação agrupa vacas no mesmo estágio do ciclo estral. Por isso, as vacas não prenhes retornam ao estro aproximadamente ao mesmo tempo. Na prática, entretanto, o retorno ao estro é variável, com a maioria das vacas retornando ao estro 20 a 24 dias depois da primeira inseminação (Chenault et al., 2003). O retorno variável ao estro pode ser explicado pela variação normal na duração do ciclo estral, morte embrionária precoce (provocando uma extensão parcial do ciclo estral) e o fato de que algumas vacas não respondem à primeira sincronização (isto é, não estão sincronizadas com o grupo).

Menos da metade das vacas que não concebem depois da primeira inseminação (não prenhes) têm o estro detectado no momento esperado após a primeira inseminação sincronizada (Chenault et al., 2003). As vacas não prenhes que não retornam ao estro foram denominadas “vacas fantasmas”, devido à sua natureza ilusória (parecendo estar prenhes quando na realidade não estão; Cavalieri et al., 2003). A presença de vacas fantasmas cria um grave desafio reprodutivo. Sob o tradicional manejo reprodutivo, uma vaca fantasma só é detectada ao exame de prenhez, 40 a 60 dias depois da inseminação inicial. Diversas causas foram encontradas para as vacas fantasmas. As causas incluem: 1) estro sem ovulação após o tratamento inicial; 2) estro e ovulação após o tratamento inicial, mas retorno subsequente ao anestro; 3) ovulação entre os dias 14 a 28, mas não expressam o estro; 4) intervalos entre estros anormalmente longos (isto é, maiores do que 24 dias); ou 5) perda precoce da gestação. Os fatores de risco para vacas fantasmas são semelhantes aos fatores para vacas em anestro (como a baixa condição corporal, início do pós-parto, primeira parição, etc.; Nation et al., 2001; Cavalieri et al., 2003).

2.0 Métodos para a sincronização da segunda inseminação

É difícil programar a segunda inseminação porque há uma mistura de vacas prenhes e não prenhes após a primeira inseminação. As vacas precisam ter a prenhez diagnosticada antes da injeção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) porque as vacas prenhes irão abortar se tratadas com $PGF_{2\alpha}$. Podem ser utilizados métodos para diagnosticar uma gestação em estágio inicial como o ultra-som transretal (Fricke, 2002) para que a $PGF_{2\alpha}$ possa ser administrada em sistemas de ressincronização (ver abaixo). Se o diagnóstico de prenhez não for feito, em geral a progesterona é suplementada em fase tardia do ciclo estral, depois da primeira inseminação. As vacas que não estão prenhes com a inseminação têm um retorno variável ao estro (discutido acima). A suplementação com progesterona bloqueia o retorno ao estro de vacas não prenhes e aumenta a sincronia do estro em vacas não prenhes quando a progesterona é retirada.

2.1. Usando um dispositivo de liberação de progesterona para sincronizar a segunda inseminação

O uso de progesterona para a ressincronização tem suas origens na Nova Zelândia e Austrália, onde dispositivos de liberação interna controlada da droga (CIDR; Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Michigan, USA), contendo progesterona, foram usados para a primeira inseminação e depois novamente usados para a ressincronização. Na prática, o dispositivo CIDR é colocado durante um período de 6 a 8 dias, iniciando nos dias 14 a 16 depois da inseminação. Uma injeção de benzoato de

estradiol (0,5 a 1 mg) pode ser administrada quando o dispositivo for colocado com o objetivo de sincronizar a onda folicular. O benzoato de estradiol (0,5 a 1 mg) é injetado quando o dispositivo é retirado para aumentar o comportamento estral e melhorar a resposta total (Eagles et al., 2001; McDougall, 2001; McDougall 2003; McDougall e Loeffler, 2004). Alguns sistemas também incluem um segundo período de ressincronização pela aplicação intravaginal de progesterona e injeção de estradiol (Cavalieri et al., 2004).

McDougall e Loeffler (2004) testaram a eficácia de um sistema de ressincronização com benzoato de estradiol-CIDR. Também determinaram se uma injeção de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) poderia substituir a primeira injeção de benzoato de estradiol (método alternativo para sincronizar a onda folicular). Seu estudo utilizou vacas leiteiras da Nova Zelândia que tiveram tratamento prévio do anestro e foram inseminadas. Os tratamentos de ressincronização resultaram em mais vacas inseminadas entre 14 e 28 dias depois da primeira inseminação (Tabela 1). As vacas tratadas com benzoato de estradiol-CIDR tiveram uma taxa de prenhez mais elevada ao final do período de monta.

Tabela 1. Resposta estral depois da ressincronização, taxa de concepção na segunda inseminação e taxa final de prenhez para vacas leiteiras da Nova Zelândia, do grupo controle ou grupo tratado com um dos dois sistemas de ressincronização (McDougall e Loeffler, 2004).

	Sistema de ressincronização ¹		
	Controle	BE-CIDR-BE	GnRH-CIDR-BE
No. total de vacas	491	244	236
Resposta estral ² , % (No.)	55,1 (134)	79,1 (106)	69,8 (97)
Taxa de concepção ³ , % (No.)	42,8 (104)	61,2 (82)	49,6 (69)
Taxa final de prenhez ⁴ , % (No.)	88,3 (370)	95,0 (191)	88,6 (178)

¹ As vacas controle não foram tratadas depois da primeira inseminação; as vacas do grupo BE-CIDR-BE foram tratadas aproximadamente 14 dias depois do primeiro estro com benzoato de estradiol (0,5 mg na colocação do CIDR), um dispositivo CIDR (contendo progesterona) durante 6 dias e benzoato de estradiol (0,5 mg) um dia depois da retirada do CIDR; GnRH-CIDR-BE foram tratadas com GnRH na colocação do CIDR e depois tratadas com CIDR-BE.

² Porcentagem de vacas não prenhes retornando ao estro (dias 14 a 28).

³ Taxa de concepção na segunda inseminação.

⁴ Taxa final de prenhez (todas as vacas e todas as inseminações).

Testes de campo em grande escala foram recentemente completados nos Estados Unidos, em que os dispositivos CIDR foram colocados nas vacas leiteiras entre os dias 13 a 21 depois da primeira inseminação (Chenault et al., 2003). Quando comparadas com os controles, as vacas tratadas com CIDR tiveram uma melhor sincronia de retorno ao estro (janela de três dias para retorno ao estro; Tabela 2). A taxa de prenhez para a IA inicial teve uma ligeira redução para as vacas tratadas com CIDR [32,7% (CIDR) x 36,7% (Controle)]. Apesar da maior sincronia de retorno ao estro, a taxa de prenhez durante os nove dias do período de ressincronia foi similar

para vacas tratadas e vacas controle. El-Zarkouny e Stevenson (2004) detectaram um aumento na sincronia do retorno ao estro em vacas tratadas com CIDR do dia 13 ao 20 após a primeira inseminação. Contudo, a porcentagem total de vacas não prenhes que apresentaram estro 20 a 26 dias depois da primeira inseminação (aproximadamente 30%) foi semelhante para CIDR e o controle. De acordo com Chenault et al. (2003) e El-Zarkouny e Stevenson (2004), a baixa resposta de ressincronização pode estar relacionada com o fato de que estes programas CIDR específicos dependem da detecção de estro. Uma melhor eficiência pode ser alcançada usando uma injeção de benzoato de estradiol ao final do tratamento com progesterona (aumentando assim a intensidade do comportamento estral, McDougall e Loeffler, 2004) ou implantando uma IA em tempo fixo que não depende da expressão do estro.

Tabela 2. Resposta estral após a ressincronização, taxa de concepção na segunda inseminação e taxa final de prenhez para vacas leiteiras dos Estados Unidos, do grupo controle ou grupo tratado com um sistema CIDR durante 14 a 21 dias depois da primeira inseminação (Chenault et al., 2003).

	Sistema de ressincronização ¹	
	Controle	CIDR
Resposta estral ² , % (No.)	19,3 (544)	34,1 (589)
Taxa de concepção ³ , % (No.)	30,9 (194)	26,7 (266)
Taxa final de prenhez ⁴ , % (No.)	44,0 (857)	41,2 (871)

¹ As vacas controle não foram tratadas depois da primeira inseminação; as vacas CIDR foram tratadas com um dispositivo CIDR (contendo progesterona) nos dias 14 a 21 depois da primeira inseminação.

² Porcentagem de vacas não prenhes retornando ao estro dentro da janela de ressincronização de 3 dias.

³ Taxa de concepção na segunda inseminação.

⁴ Taxa final de prenhez (primeira e segunda inseminações).

2.2 Sincronizando a segunda inseminação para IA em tempo fixo usando Ovsynch

Uma das limitações da ressincronização com progesterona é a exigência da detecção de estro após o tratamento. Uma abordagem melhor seria um sistema com IA em tempo fixo para a segunda inseminação. Pursley et al. (1997) demonstraram que a IA em tempo fixo (Ovsynch) poderia ser aplicada repetidamente em vacas leiteiras depois do diagnóstico de gestação. Em seu estudo, as vacas retornaram ao Ovsynch quando diagnosticadas como não prenhes pelo ultra-som (32 a 38 dias depois da inseminação). As vacas tratadas com Ovsynch emprenharam mais rapidamente do que as do grupo controle (inseminadas quando o estro foi observado). Assim, a IA em tempo fixo pode ser aplicada com sucesso na primeira inseminação e nas subseqüentes, depois de feito o diagnóstico de prenhez.

A primeira injeção de GnRH dentro do programa Ovsynch não prejudica a gestação em vacas prenhes (Chebel et al., 2003). Assim, a primeira injeção de GnRH

pode ser dada a todas as vacas aproximadamente uma semana antes do diagnóstico de prenhez. As vacas posteriormente diagnosticadas como não prenhes podem ser injetadas com PGF_{2α} e 48 horas depois injetadas com GnRH antes da IA em tempo fixo. Se for feito um diagnóstico de prenhez por ultra-som no dia 28, a reinseminação de vacas não prenhes por IA em tempo fixo ocorre no dia 30 ou 31 (Chebel et al., 2003).

Chebel et al. (2003) demonstraram que vacas tratadas desta forma para a ressincronização (injeção de GnRH no dia 21, diagnóstico por ultra-som no dia 28, injeção de PGF_{2α} para vacas não prenhes no dia 28 e injeção de GnRH e IA em tempo fixo no dia 30) tiveram taxas de prenhez similares na primeira inseminação e na segunda inseminação quando comparadas com vacas em que a ressincronização foi iniciada depois do diagnóstico de prenhez no dia 28.

Fricke et al. (2003) examinaram ainda o momento apropriado para a ressincronização usando Ovsynch. Em seu estudo, o protocolo de ressincronização foi iniciado no dia 19, 26 ou 33 depois da primeira inseminação. O intervalo até a ressincronização (19, 26 ou 33 dias) não afetou a taxa de concepção da primeira inseminação (31% em todos os grupos). Assim, o estudo de Fricke et al. (2003) é compatível com os resultados do estudo de Chebel et al. (2003), que não mostrou nenhum efeito prejudicial do GnRH sobre as gestações da primeira inseminação. Fricke et al. (2003), entretanto, mostraram que as taxas de gestação da segunda inseminação foram mais altas para as vacas que começaram o Ovsynch no dia 26 (34%) ou dia 33 (38%) quando comparadas com o dia 19 (23%).

2.3 Sincronizando a segunda inseminação para IA em tempo fixo usando Ressincronização Rápida

Poderá ser possível usar a sincronia inerente causada pela primeira sincronização para desenvolver melhores métodos para a ressincronização. A maioria das vacas não prenhes está em estro 20 a 24 dias após a primeira inseminação. Se o diagnóstico de prenhez com ultra-som for realizado aproximadamente no dia 29, as vacas não prenhes estarão entre os dias 5 e 9 do ciclo estral subsequente. Esta fase inicial do ciclo estral representa um período em que há presença de um corpo lúteo responsivo a PGF_{2α} e um folículo dominante no ovário. Assim, é possível o uso de um sistema simples, com duas injeções (uma de PGF_{2α} dado para regredir o corpo lúteo e outra de GnRH 48 horas depois para causar a ovulação; Ressincronização Rápida). As vacas podem ser inseminadas 0 a 24 horas após a injeção de GnRH. Stevenson et al. (2003) demonstraram que as vacas leiteiras poderiam ser reinseminadas e IA em tempo fixo usando a Ressincronização Rápida. A prenhez foi diagnosticada nos dias 27

a 29 depois da primeira inseminação. Depois do diagnóstico de gestação, as vacas não prenhes foram deixadas sem tratamento (Controle), ou receberam injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e foram inseminadas ao estro (ou IA em tempo fixo 72 a 80 horas para as que não foram vistas em estro), ou receberam injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, GnRH e IA em tempo fixo (Ressincronização Rápida). Em comparação com o controle, o intervalo médio da primeira até a segunda inseminação foi diminuído em 24 dias com $\text{PGF}_{2\alpha}$ sozinho e com Ressincronização Rápida (Tabela 3). As taxas de concepção foram similares, independente do sistema (controle, apenas $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou Ressincronização Rápida). A combinação de um intervalo mais curto entre a primeira e a segunda inseminação, com taxas de concepção equivalentes, resultou em intervalos entre parição e concepção de 22 a 23 dias mais curtos nas vacas tratadas (apenas $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou Ressincronização Rápida) em relação aos controles.

Tabela 3. Dias da primeira até a segunda inseminação, taxa de concepção na segunda inseminação e dias da parição até a concepção para as vacas leiteiras controle e vacas leiteiras ressincronizadas apenas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou ressincronizadas com Ressincronização Rápida (Stevenson et al., 2003).

	Sistema de ressincronização ¹		
	Controle	Apenas $\text{PGF}_{2\alpha}$	Ressincronização rápida
Primeira à segunda inseminação, dias (No.)	55 ± 1 (189)	31 ± 2 (108)	31 ± 1 (160)
Taxa de concepção na segunda inseminação, % (No.)	22,8 (189)	22,2 (108)	23,3 (160)
Intervalo parição até concepção, dias (No.)	179 ± 8 (154)	157 ± 10 (82)	156 ± 7 (137)

¹ As vacas controle não foram tratadas depois da primeira inseminação; as vacas com apenas $\text{PGF}_{2\alpha}$ receberam injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e foram inseminadas ao estro (ou IA em tempo fixo com 72 a 80 horas para aquelas não vistas em estro); as vacas do grupo Ressincronização Rápida receberam injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, de GnRH (48 horas depois de $\text{PGF}_{2\alpha}$) e IA em tempo fixo 16 a 20 horas depois do GnRH.

Comparamos a Ressincronização Rápida e a ressincronização com Ovsynch (Meyer et al., 2004). As vacas leiteiras foram aleatoriamente distribuídas, recebendo GnRH (tratamento Ovsynch) ou nenhuma injeção (tratamento Ressincronização Rápida) no dia 22 depois da primeira inseminação. Todas as vacas diagnosticadas pelo ultra-som como não prenhes foram tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 29, GnRH no dia 31 e IA em tempo fixo (4 a 8 horas depois do GnRH). As vacas tratadas com GnRH no dia 22 (ressincronização Ovsynch) tiveram taxas de prenhez similares aos das vacas não tratadas com GnRH no dia 22 (Ressincronização Rápida) (Tabela 4). Assim, o pré-tratamento com GnRH pode não ser necessário se a Ressincronização Rápida for feita 29 dias depois da primeira inseminação.

Tabela 4. Taxas de prenhez para vacas leiteiras que foram ressincronizadas com Ovsynch ou Ressincronização Rápida (Meyer et al., 2004).

	Sistema de ressincronização ¹	
	Ovsynch	Ressincronização Rápida
Número de vacas, No.	154	163
Taxa de prenhez, %	24,6	23,9

¹ As vacas leiteiras foram aleatoriamente divididas para receber GnRH (Ovsynch) ou nenhuma injeção (Ressincronização Rápida) no dia 22 depois da primeira inseminação. Todas as vacas diagnosticadas pelo ultra-som como não prenhes foram tratadas com PGF_{2α} no dia 29, GnRH no dia 31 e IA em tempo fixo (4 a 8 horas depois do GnRH).

2.4 A segunda inseminação pode ser feita antes do esperado retorno ao estro?

A Ressincronização Rápida pode ser usada depois do exame ultra-sonográfico. Há dois outros períodos de tempo para a Ressincronização Rápida após a primeira inseminação (quando o ovário tem um corpo lúteo e um folículo dominante). O primeiro período é durante a primeira onda folicular após a inseminação e o segundo período é durante a segunda onda folicular após a inseminação. Tratamos vacas leiteiras em lactação, não prenhes, em pós-parto, com Ressincronização Rápida e IA em tempo fixo, começando no dia 17 do ciclo estral e alcançando uma taxa de prenhez de 53% (n = 53 vacas; Lucy, Scheer e Spain; não publicado). Assim, o segundo período para a Ressincronização Rápida (segunda onda folicular depois da primeira inseminação) pode ser explorado. O problema com estes dois primeiros períodos de tempo é que não se consegue a imagem do embrião bovino com ultra-som neste período. Por isso, torna-se necessário um diagnóstico bioquímico da prenhez. Em bovinos, diversos genes uterinos sofrem uma regulação ascendente durante o reconhecimento materno da prenhez (dias 15 a 20; Austin et al., 2004; Hicks et al., 2003). Se puderem ser desenvolvidos testes de prenhez precoce para estas proteínas, abre-se a segunda janela para a Ressincronização Rápida (segunda onda folicular depois da primeira inseminação). Fazer o teste de prenhez em vacas no dia 18 e aplicar a Ressincronização Rápida permitiria a reinseminação de vacas não prenhes 21 dias depois da primeira inseminação. Assim, o intervalo para a reinseminação seria mais curto do que o intervalo normal de retorno ao estro (20 a 24 dias depois da primeira inseminação).

3.0 Resumo

A maioria das vacas não está prenhe depois da primeira inseminação. Não é eficiente realizar uma segunda inseminação depois de um segundo estro espontâneo,

porque muitas vacas não expressam o estro durante o intervalo até o esperado retorno ao estro (20 a 24 dias após a primeira inseminação). Tratar as vacas com progesterona 14 a 21 dias depois da primeira inseminação irá concentrar os retornos ao estro, mas as baixas taxas de expressão de estro diminuem a eficiência dos sistemas que utilizam apenas progesterona. A adição de benzoato de estradiol a um sistema apenas com progesterona irá aumentar o comportamento estral e melhorar as respostas gerais. Um sistema com IA em tempo fixo que utiliza Ovsynch poderá ser a melhor abordagem, porque todas as vacas são inseminadas. Ovsynch pode ser iniciado antes do diagnóstico de prenhez para que as vacas de segunda inseminação tenham inseminação em tempo fixo cerca de 30 dias depois da primeira inseminação. A primeira injeção de GnRH de Ovsynch pode não ser necessária se o diagnóstico de prenhez for feito 28 a 29 dias depois da primeira inseminação (Ressincronização Rápida). Pode ser possível reinseminar as vacas não prenhes antes de seu retorno espontâneo ao estro (isto é, 21 dias depois da primeira inseminação) se for desenvolvido um teste bioquímico para diagnóstico precoce da prenhez.

4.0 Referências

Austin, K.J., Carr, A.L., Pru, J.K., Hearne, C.E., George, E.L., Belden, E.L., Hansen, T.R. 2004. Localization of ISG15 and conjugated proteins in bovine endometrium using immunohistochemistry and electron microscopy. *Endocrinology* 145:967-975.

Cavalieri, J., Morton, J., Nation, D.P., Hepworth, G., Pino, S., Rabiee, A., Macmillan, K.L. 2003. Phantom cows: predisposing factors, causes and treatment strategies that have been attempted to reduce the prevalence within herds. *Proceedings of the Australian and New Zealand Combined Dairy Cattle Veterinarians Conference - incorporating the 20th Annual Seminar of the Society of Dairy Cattle Veterinarians of the New Zealand Veterinary Association* 20:365-388.

Cavalieri, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L.A. 2004. Comparison of two estrus synchronization and resynchronization treatments in lactating dairy cows. *Theriogenology* 62:729-747.

Chebel, R.C., Santos, J.E., Cerri, R.L., Galvao, K.N., Juchem, S.O., Thatcher, W.W. 2003. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60:1389-1399.

Chenault, J.R., Boucher, J.F., Dame, K.J., Meyer, J.A., Wood-Follis, S.L. 2003. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2039-2049.

Eagles, V.E., Malmo, J., Macmillan, K.L. 2001. Resynchronising returns-to-service in anoestrous cows in Victorian dairy herds. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 61:176-179.

El-Zarkouny, S.Z., Stevenson, J.S. 2004. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. *J. Dairy Sci.* 87:3306-3321.

Fricke, P.M. 2002. Scanning the future--ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:1918-1926.

Fricke, P.M., Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Welle, M.L. 2003. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J. Dairy Sci.* 86:3941-3950.

Hicks, B.A., Etter, S.J., Carnahan, K.G., Joyce, M.M., Assiri, A.A., Carling, S.J., Kodali K., Johnson, G.A., Hansen, T.R., Mirando, M.A., Woods, G.L., Vanderwall, D.K., Ott, T.L. 2003. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. *J. Anim. Sci.* 81:1552-1561.

McDougall, S. 2001. Reproductive performance of anovulatory anoestrus postpartum dairy cows following treatment with two progesterone and oestradiol benzoate-based protocols, with or without resynchrony. *NZ Vet J.* 49:187-194.

McDougall, S. 2003. Resynchrony of previously anoestrous cows and treatment of cows not detected in oestrus that had a palpable corpus luteum with prostaglandin F2 α . *NZ Vet J.* 51:117-124.

McDougall, S., Loeffler, S.H. 2004. Resynchrony of postpartum dairy cows previously treated for anestrus. *Theriogenology* 61:239-253.

Meyer, J.P., Radcliff, R.P., Rhoads, M.L., Bader, J.F., Murphy, C.N., Lucy, M.C. 2004. Factorial analysis of timed AI (TAI) protocols for synchronization of first and second insemination in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1):256(Abstract).

Nation, D.P., Morton, J., Cavalieri, J., Macmillan, K.L. 2001. Factors associated with the incidence of "Phantom cows" in Australian dairy herds. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 61:180-183.

Pursley, J.R., Kosorok, M.R., Wiltbank, M.C. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 80: 301-306.

Stevenson, J.S., Cartmill, J.A., Hensley, B.A., El-Zarkouny, S.Z. 2003. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. *Theriogenology* 60:475-483.
