Mundo Pecuario, IX, Nº 2, 81-90, 2013

APLICACIÓN DEL PROTOCOLO Select-Synch Y SU EFECTO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA PLASMÁTICA EN VACAS MULTÍPARAS UBICADAS EN EL LLANO CENTRAL VENEZOLANO

Select-synch protocol application and plasmatic progesterone concentration effect in multiparous cows located in Venezuelan Central Plain.

Noris Roa[1], Tiburcio Linares [2], D´Endel D´Enjoy[1] y Carlos Marín[3]

[1]Fisiología de la Reproducción Animal. Producción Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay. Venezuela. E-mail: nroa@inia.gob.ve

[2] Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela (UCV). Maracay. Venezuela.

[3] Laboratorio Bioinfomática y Biometría. Producción Vegetal. INIA-CENIAP. Maracay. Venezuela

RESUMEN

Para comparar los cambios en las concentraciones de progesterona (P_4) plasmáticas durante la aplicación del protocolo Select-synch, se evaluaron 32 vacas multíparas durante la época seca. Se midió la concentración de P_4 durante el protocolo, al momento del celo y 21 días después de inseminadas las vacas. Se incluyeron hembras con actividad ovárica con folículos ≥3mm o presencia de cuerpos luteos (CL´s) y condición corporal (CC) de 3,6±0,1 (escala 1-5). El protocolo de sincronización consistió en la administración de 100 µg de Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) i.m., seguida 7 días después de la aplicación de 25 mg de PGF_{2alfa} (i.m.), para ser inseminadas una vez detectado el celo (06:00–18:00 h). El 59,4% de las vacas (19/32) presentó celo el día 5,1±0,2 luego de la aplicación de PGF_{2alfa}. La concentración de P_4 presentó significancia entre días (p<0,01) disminuyendo desde el día de la aplicación de GnRH (12,4±1,0 ng/mL) hasta el día 3 del protocolo (8,1±0,9 ng/mL), luego se incrementó hasta el día de de la administración de la PGF_{2alfa} (15,0±1,1ng/mL), descendiendo progresivamente hasta alcanzar la menor concentración el día del celo (0,7±0,1 ng/mL). El día 21 post-inseminación, la concentración plasmática de P_4 fue mayor (9,3±0,7 ng/mL; p<0,01) en vacas gestantes (n=14), que en vacas vacías (n=6; 1,1±0,1 ng/mL). Las concentraciones de P_4 el día del celo, indican la respuesta al protocolo de sincronización, mientras que la concentración de P_4 el día 21 post-inseminación, tiene valor predictivo en el diagnostico de vacas gestantes y/o vacías.

Palabras clave: protocolo de sincronización, select-synch, progesterona (P_4), vacas.

ABSTRACT

To compare plasmatic progesterone concentrations changes during the Select-synch protocol application, 32 multiparous cows was evaluated during dry season. P_4 concentration was measured during the protocol, at heat time and 21 days after insemination. Were included cows with ovarian activity (follicles≥3mm or CL´s) with BC 3.6±0.1 (scale 1-5). The synchronization protocol consisted in an 100 µg of GnRH i.m. application, followed 7 d after of 25 mg of PGF_{2alfa} (i.m.), with detection of heat (06:00-18:00 h) then to be insemination. Fifty nine (59.4%) of the cows (19/32) presented heat 5.1±0.2 day after PGF_{2alfa} application. The P_4 concentration was significance between days (p<0.01) decreeing from the day of application with GnRH (12.4+1.0 ng/mL) to day 3 of the protocol (8.1+0.9 ng/mL), then increased until the application day of PGF_{2alfa} (15.0+1.1ng/mL), and descended progressively until the smaller concentration of P_4 the heat day (0.7+0.1 ng/mL). The 21 day post-insemination, P_4 plasmatic concentration was greater (9.3+0.7 ng/mL; p<0.01) in pregnant cows (n=14), than in open cows (n=6; 1.1+0.1 ng/mL). The P_4 concentrations in the heat day, give an idea of the answer to the synchronization protocol, whereas the P_4 concentration in day 21 post-insemination, has predictive value in pregnant and/or open cows.

(Key words): synchronization protocol, select-synch, progesterone (P_4), cows.

INTRODUCCIÓN

En las explotaciones bovinas, desde el punto de vista productivo, es necesario conocer el estatus reproductivo de los animales en el menor tiempo posible, luego de la inseminación artificial (IA). Hoy en día, la determinación de progesterona (P_4) en plasma o suero sanguíneo (Sasser y Ruder 1987, Roa *et al., 2006*) y leche (Hruska, 1996) nos permiten a corto plazo diagnosticar preñez. En vacas gestantes, los valores de P_4 en sangre, se mantienen alrededor de 5,5–4,6ng/mL el día 21 (Henricks y Dickey 1970; Shemesh *et al*., 1973), mientras que en vacas que van a retornar en celo, se observan niveles bajos de progesterona (0,9–0,1ng/mL; Bandiga *et al*., 1992; D´Enjoy *et al*., 2012). Sin embargo, esta técnica es poco utilizada como prueba de rutina, debido a la poca comercialización de los reactivos utilizados. La manipulación del ciclo estral, mediante la aplicación de hormonas nos permiten sincronizar los celos, siendo conocido que la aplicación de GnRH en cualquier fase del ciclo estral, produce ovulación o atresia del folículo dominante, sincronizándose a su vez el reclutamiento de una nueva onda de crecimiento folicular (Macmillan y Thatcher, 1991). La administración exógena de PGF_{2alfa} al producir la luteólisis, induce la ovulación del folículo dominante de cualquier onda, al crearse las condiciones endocrinas apropiadas (Savio *et al*., 1993), por lo que la ovulación ocurre 3–5 días después de la administración de la PGF_{2alfa} (Martínez *et al*., 2000). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los cambios en las concentraciones de P_4 en vacas multíparas sincronizadas durante la época seca, en el Llano Central Venezolano.

Foto 1. VACAS MESTIZAS DOBLE PROPÓSITO

Foto 2. TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA PARA DETERMINACIÓN HORMONAL

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajaron 32 vacas multíparas, ubicadas en el nor-oriente del Estado Guárico (9º49’36” Latitud Norte; 65º48’59” Longitud Este), a una altitud de 250 m.s.n.m. durante el período seco. La CC promedio de las vacas fue 3,6±0,1 (Rango:3–4) según la escala ESCA (1976) (1=animal flaco; 5=animal obeso). Las vacas fueron desparasitadas (Mectipal® Lab Depal, dosis: 1 mL/50

Kg, s.c.), tratadas con un Complejo vitamínico B (Hematopan B12®, Merial; 10 mL/vaca i.m.) y AD_3E (Vitrex®, Pharmakum; 7mL/vaca i.m.) antes del inicio ensayo.

Para el estudio ultrasonogràfico se utilizó un equipo portátil, modelo SIUI CTS (China) provisto de una sonda lineal transrectal de 7,5 MHz. Se evaluaron ambos ovarios siguiendo la metodología descrita por Ginther *et al*. (1989) y Roa *et al.* (2006), determinándose la presencia de estructuras ováricas (folículos ≥3mm o CL´s) con la finalidad de determinar el número de vacas cíclicas.

El protocolo de sincronización de celo utilizado (Figura 1); se basó en la aplicación de una dosis de 100 µg de GnRH vía i.m. seguida 7 d después, de una aplicación de 25 mg i.m. de PGF_{2alfa}; (Moreira *et al*., 2000). La detección del celo se inicio 24 h después de la administración de PGF_{2alfa}, haciéndose dos observaciones diarias, a intervalo de 12 h (6:00–18:00) por espacio de 1 hora en cada revisión, hasta observar la presencia del celo y su posterior inseminación, siguiendo el método am–pm (Trimberger, 1943).

Las muestras de sangre se tomaron diariamente con tubos que contenían EDTA, durante 12 d a partir del día de la administración de GnRH, hasta la aparición del celo, para determinar las concentraciones de P_4 plasmática durante el protocolo. Se tomo una muestra de sangre 21 d después de inseminadas las vacas para medir P_4 plasmática y realizar el diagnostico precoz de gestación. Una vez tomada la muestra, se procedió a centrifugar (18*g* por 15 min), tomándose el sobrenadante (plasma sanguíneo) para conservarlo a una temperatura de -20 ºC hasta el momento de la determinación de P_4.

Foto 3. TÉCNICA DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN PLASMA

La determinación de la concentración de P_4 plasmática, se realizó a través de la técnica de enzimoinmunoanàlisis (ELISA), utilizando un estuche comercial (Ovucheck® de Biovet Inc), siguiendo las especificaciones del protocolo de determinación hormonal (Roa *et al*., 1997).

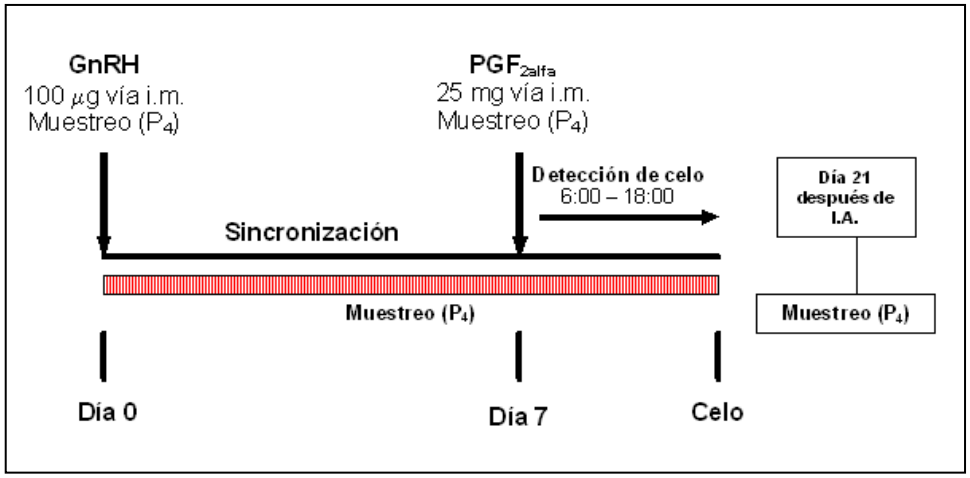

Figura 1.- DISEÑO EXPERIMENTAL, ESPECIFICANDO CADA UNA DE LAS FASES INCLUYENDO: PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN, PERIODO DE DETECCIÓN DE CELOS Y

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico INFOSTAT®2002 versión 1.1, a través del modelo de análisis mixto, basado en el modelo lineal general (GLM)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de ciclo Estral (CE) de vacas evaluadas (n=32), el 59,4% (19/32) presentó celo luego de la aplicación de la PGF_{2alfa} mientras que el 40,6% de las vacas (13/32) no manifestó celo. Resultados similares fueron reportados por otros autores luego de aplicados los protocolos de sincronización de celos con GnRH y PGF_{2alfa} (Momcilovic *et al*., 1998) o con doble inyección de prostaglandina (Archbald *et al*., 1993).

Las vacas que mostraron celo, lo hicieron en promedio el día 5,1±0,2 (Rango= 3,0–7,1 d) luego de la aplicación de PGF_{2alfa}. Estos resultados son similares a otros reportes (Twagiramungu *et al*., 1992; Geary *et al*., 1999; Doleiel *et al*., 2002), quienes señalan un promedio de 5 d para la aparición del celo, después de la aplicación de la PGF_{2alfa}; con rangos entre 3–5 d (Larson *et al*., 1996; Martínez *et al*., 2000). Por el contrario, algunos trabajos reportan un alto número de vacas (60%) que presentan celo entre los días 2–3 luego de la administración de la PGF_{2alfa} (Lemaster *et al*., 2001). En la Figura 2, se muestra que el 55,5% de los celos fueron expresados entre los días 5–6 luego de la administración 0 con PGF_{2alfa}, siendo observados el 25,7% de los celos entre el tercer y cuarto día post tratamiento, mientras que el 18,8% de los celos se observaron luego del día 6.

La variabilidad en la respuesta de las vacas al protocolo de sincronización aplicado, obedece a la variabilidad en el estado de desarrollo del folículo dominante al momento de la aplicación con PGF_{2alfa}. Si la dosis es aplicada cuando el folículo dominante se encuentra en la última fase o en la fase estática de su crecimiento, la ovulación ocurre entre los 3–4 d luego de la aplicación de

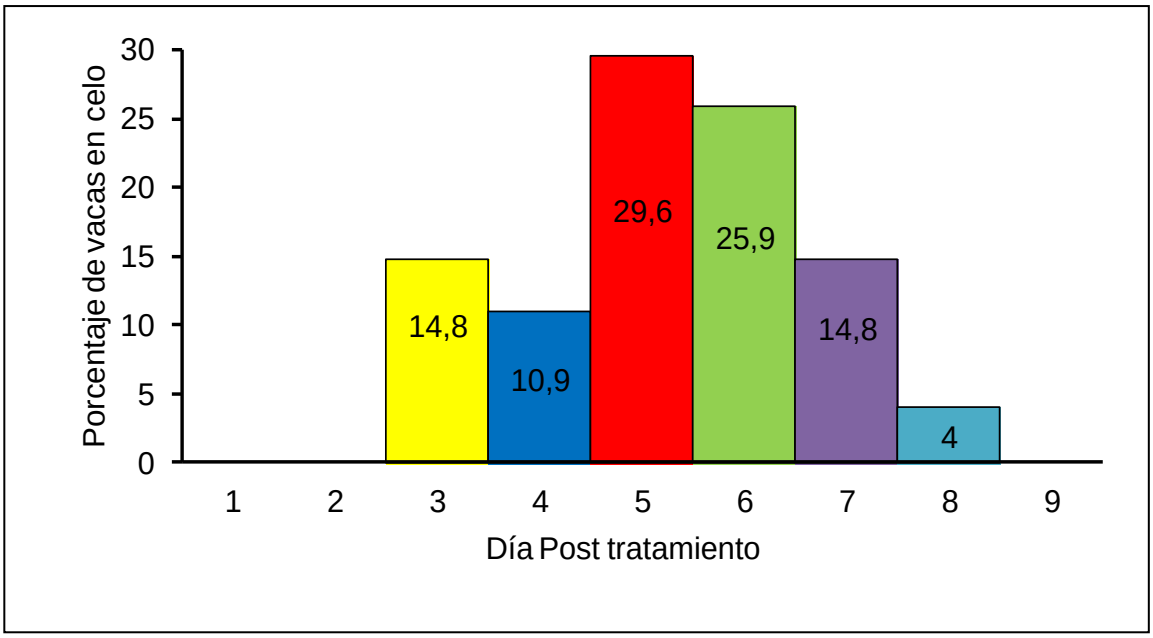

Figura 2. DISTRIBUCIÓN DEL DÍA DE APARICIÓN DEL CELO EN VACAS LUEGO DE LA APLICACIÓN DE PGF_{2alfa}.

la PGF_{2alfa}, mientras que si se aplica al inicio de la fase de regresión del folículo dominante, la ovulación ocurre entre 5–7 d después (Kastelic y Ginther, 1991). Esto se debe al tiempo adicional requerido por el folículo dominante de la siguiente onda para completar su crecimiento.

Las concentraciones plasmáticas de P_4, presentaron cambios ($p<0,01$) durante la aplicación del protocolo de sincronización hasta la observación del celo. Existe un grado de asociación entre las concentración plasmática de P_4 y el grado de desarrollo del CL ($r=0,53$; $P<0,01$); por lo que la concentración de P_4 aumenta a medida que se desarrolla el CL y disminuye una vez que el CL entra en su período de regresión (Figueiredo *et al*., 1997). Los resultados (Figura 3) señalan una disminución en la concentración plasmática de P_4 ($y=12.31-1.34x$; $R^2=0,9571$) desde el momento de la aplicación de GnRH (12,4±1,0 ng/mL), hasta alcanzar su menor valor el día 3 del protocolo (8,1±0,9 ng/mL).

A partir del día 4 del protocolo de sincronización (Figura 4), se observa un aumento progresivo en las concentración plasmática de P_4 ($y=7,84+0,87x$; $R^2=0,4962$), hasta alcanzar el máximo valor (15,0±1,1 ng/mL) el día de la aplicación de la PGF_{2alfa} (día 7).

La disminución en la concentración de P_4 luego de administrada la GnRH, podría deberse al aumento en las concentración de LH y FSH que se genera 2–4 h luego de su aplicación (Twagimamungu *et al*., 1995), lo que produce la ovulación o luteinización del folículo dominante de la onda folicular, seguida de la sincronización de una nueva onda de crecimiento folicular (Macmillan y Thatcher, 1991). Una vez ocurrida la ovulación, las células de la granulosa y de la teca, se reorganizan y luteinizan formando el CL. Igualmente, los

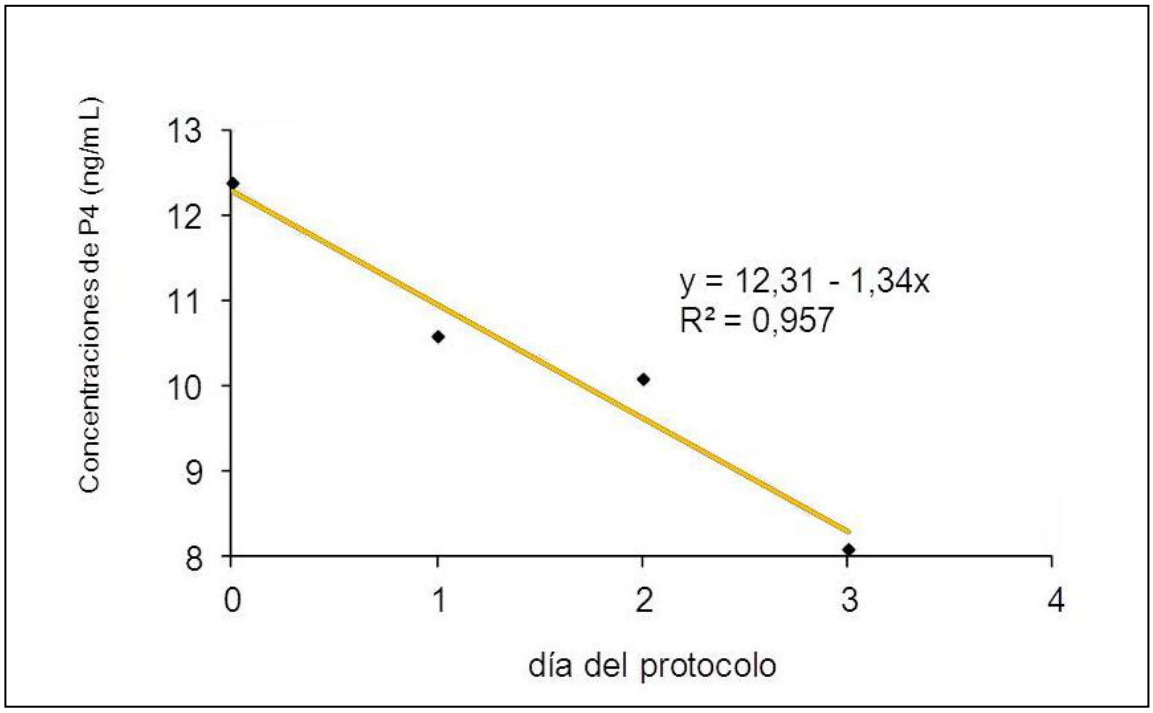

Figura 3. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE P_4 DURANTE LOS PRIMEROS TRES DÍAS POST-INYECCIÓN CON 100µg DE GnRH

folículos que no ovulan por efecto de la GnRH, se luteinizan y comienzan a producir P_4 a medida que el CL se consolida, aumentando progresivamente la concentración de P_4 en plasma (McCracken *et al*., 1999). Una vez aplicada la PGF_{2alfa} (día 7), el efecto luteolítico que asemeja lo ocurrido al final del diestro (día 18 del CE) por la PGF_{2alfa} liberada en el endometrio uterino (Correa, 1992); produce un descenso brusco (y=15,48-1,29x; R^2=0,7367) en las concentraciones P_4 plasmáticas a partir del día 8 (Figura 5), hasta el momento de la aparición del celo en las vacas (0,7±0,4 ng/mL). Este descenso progresivo en la concentración de P_4, es una condición necesaria para que se genere la onda-pre-ovulatoria de LH, y ocurra la ovulación del folículo dominante de la onda sincronizada.

En relación a la tasa de concepción, del total de vacas inseminadas (n=19), el 57,9% (11/19) se diagnostico gestante mediante determinación de P_4, el día 21 post-inseminación; siendo la concentración promedio de P_4 de 10,6±0,5 ng/mL (rango=8,4–12,9 ng/mL), indicando la presencia de un CL funcional (Pinheiro *et al*., 1998). Similarmente, Lemaster *et al*. (2001) obtuvieron una tasa de concepción de 57%, en vacas sincronizadas con el mismo protocolo (Select-synch). A diferencia de las vacas gestantes (p<0,01), las vacas vacías (42,1%), tuvieron una concentración promedio de P_4 de 1,1±0,3 ng/mL. Esto podría deberse a que en las vacas vacías están finalizando la fase luteal, obedeciendo a cambios degenerativos en las células del CL (luteòlisis), por efecto de la PGF_{2alfa} liberada por el endometrio uterino (Correa, 1992), por lo que la concentración de P_4 se aproxima a 1,0 ng/mL.

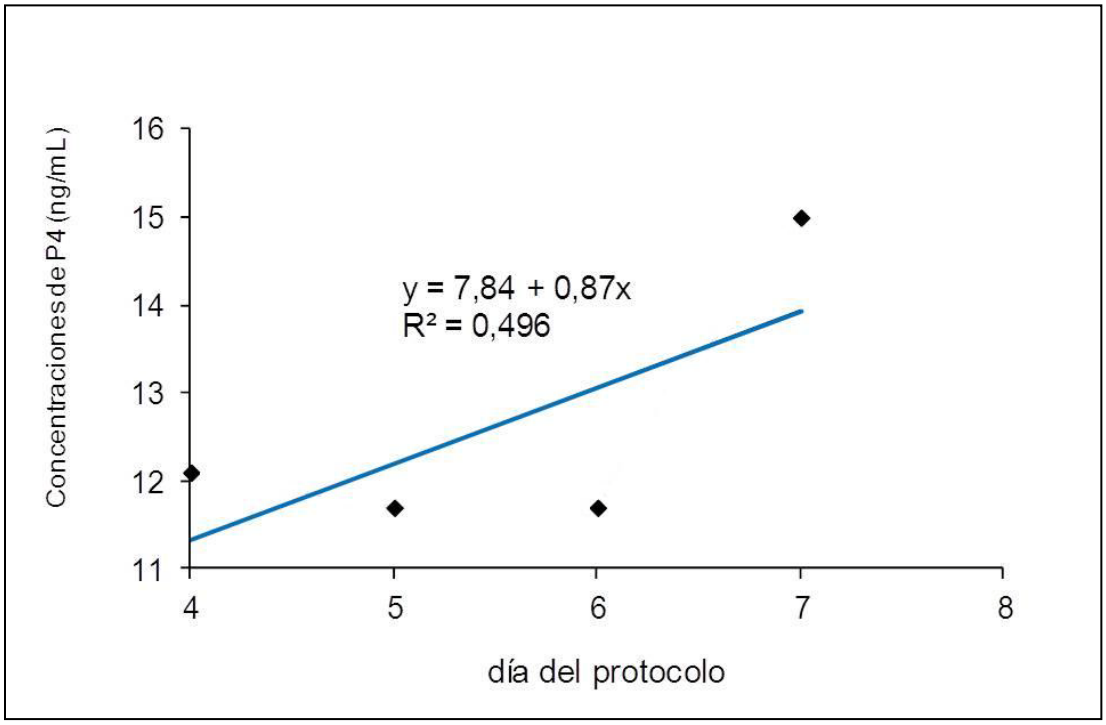

Figura 4. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE P_4 DESDE EL DÍA 4 HASTA EL DÍA 7 DEL PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN.

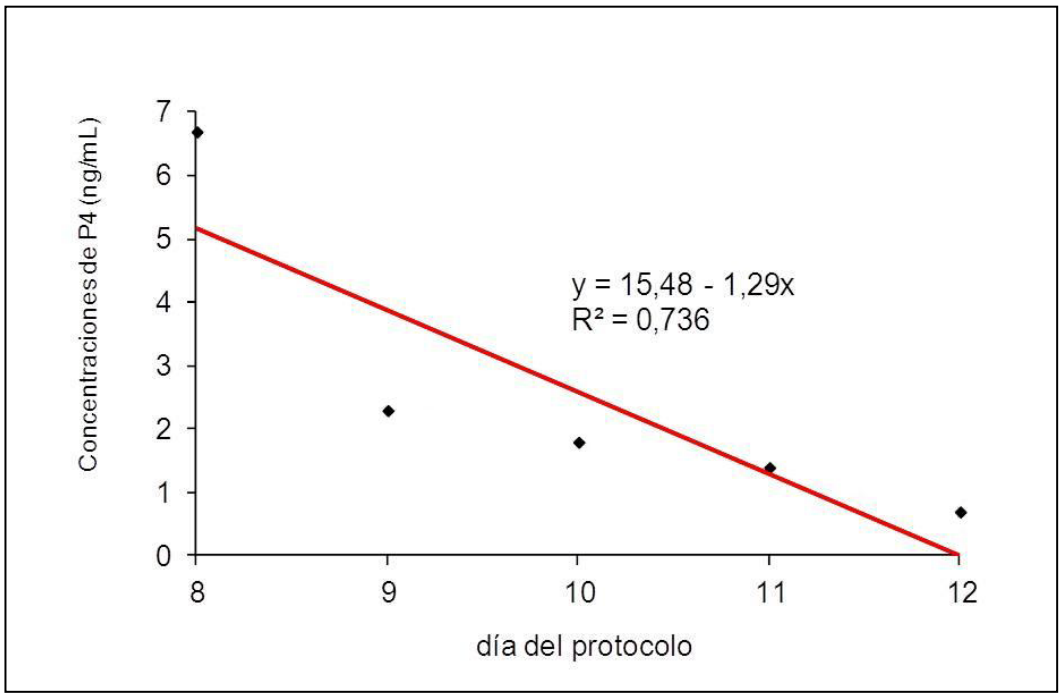

Figura 5. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA POST INYECCIÓN CON 25 mg DE PGF_{2alfa}.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que al aplicar el protocolo Select-Synch en vacas con una buena condición corporal, se logra sincronizar el 59,4% de los animales, similar a lo descrito por otros autores. La aparición de celos se observa en mayor proporción en las vacas sincronizadas (55,5%) entre los días 5–6 luego de la aplicación de PGF_{2alfa}. La concentración de P_4 presenta variación significativa ($P<0,01$) durante la aplicación del protocolo de sincronización, siendo evidente una tendencia fuerte a la disminución luego de aplicada la PGF_{2alfa}, asociada a su efecto luteolítico. La tasa de concepción alcanzada (57,9 %), mediante la determinación de P_4 en plasma a través de la prueba de ELISA, el día 21 post- inseminación, le da un valor predictivo a la prueba para determinación de hembras gestantes y/o vacías.

Foto 4. VERIFICACIÓN DE REGISTROS DEL REBAÑO VACUNO EN CAMPO

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan especial agradecimiento al FONACIT, a través del proyecto de Biotecnología BID-Fonacit II-INIA Nª 2005000008 y al INIA-Ceniap a través del sub proyecto Nº ID-ARA-05-001-005, por el financiamiento de estos trabajos de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHBALD, L.F.; RISCO, C.; CHAVATTE, P.; CONSTANT, S.; TRAN, T.; KLAPSTEIN, E.; ELLIOT, J. 1993. Estrus and pregnancy rate of dairy cows given one or two doses of prostaglandin F2alpha 8 or 24 hours apart. ***Theriogenology.***, 40:873-884.
- BADINGA, L.; DRIANCOURT, M.A.; SAVIO, J.D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. ***Biol. Reprod.***, 47:871-883.
- CORREA, J. 1992. Regulación hormonal del ciclo estral en rumiantes. En: ***I Curso Internacional de Transferencia de Embriones Bovinos.*** Universidad Austral de Chile. JICA., 203-214.
- D'ENJOY, D.; CABRERA, P.; VIVAS, I. y DÍAZ, T. 2012. Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas Brahman. ***Rev. Fac. Cs. Vet. UCV.***, 53:39-47.
- DOLEIEL, R.; CECH, R.; ZAJIC, J.; HAVLICEK, V. 2002. Oestrus synchronization by PGF2α and GnRH in intervals according to stage of follicular development at time of initial treatment in cows. ***Acta Veterinaria.***, 71:101–108.
- ESCA, East of Scotland College of Agriculture. 1976. **Condition Scoring of cattle. *Bulletin ESCA*. Nº 6**. Scotland, UK.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. ***Theriogenology***., 47:1489-1505.
- GEARY, T.W.; DOWNING, E.R.; BRUEMMER, J.E.; WHITTIER, J.C. 1999. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. ***Anim. Sci.***, 16:1−5.
- GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. ***Anim. Reprod. Sci.***, 20:187-200.
- HENRICKS, D.M. and DICKEY, J.F. 1970. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. ***Biol. Reprod.***, 2:346–351.
- HRUSKA, K. 1996. Milk progesterone determination en dairy cows. ***Reprod. Dom. Anim.***, 31: 483–4 85.
- INFOSTAT. 2002. Grupo Infostat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. *Infostat*. version 1.1
- KASTELIC, J.P. and GINTHER, O.J. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. ***Anim. Reprod. Sci.***, 26:13-24.
- LARSON, R.L.; CORAH, L.R.; PETERS, C.W. 1996. Synchronization of estrus in yerling beef heifers with the melengestrol acetate/prostaglandin F2α system: efficiency of timed insemination 72

hours after prostaglandin treatment. ***Theriogenology.,*** 45:851–863.

- LEMASTER, J.W.; YELICH, J.V.; KEMPFER, J.R., FULLENWIDER, J.K.; BARNETT, C.L.; FANNING, M.D.; SELPH, J.F. 2001. Effectiveness of GnRH plus prostaglandin F2*α* for estrus synchronization in cattle of *Bosindicus* breeding. ***J. Anim. Sci.***, 79:309–316.
- MACMILLAN, K.L. and THATCHER, W.W. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. ***Biol. Reprod***., 45:883–889.
- MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. 2000. The use of CIDR-B devices in GnRH/LH-based artificial insemination programs. ***Theriogenology.*** 53 (Suppl.1): 202 (Abstr.).
- MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. ***Physiological Reviews.,*** 79:263-323.
- MOMCILOVIC, D.; ARCHBALD, L.F.; WALTERS, A.; TRAN, T.; KELBERT, D.; RISCO, C.; THATCHER, W.W. 1998. Reproductive performance of lactating dairy cows treated with gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and/or prostaglandin F2α (PGF2α) for synchronization of estrus and ovulation. ***Theriogenology.*** 50: 1131-1139.
- MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R.L.; DÍAZ, T. and THATCHER, W.W. 2000. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. ***J. Anim. Sci.,*** 78: 1568-1576.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R.; DO ENCARNAÇAO, R.O.; PADOVANI, C.R. 1998. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 alpha or norgestomet and estradiol valerate. ***Theriogenology.*** 49:667-681.
- ROA, N.; LINARES, T.; BARRIOS, D.; RAMÍREZ DE ROLO, M. y TAMASAUKAS, R. 1997. Determinación de progesterona plasmática por el método de ELISA en receptoras de embriones bovinos. ***Rev. Cient. Fac Cs Vet.* -LUZ.**, Vol. VII. Nº 2. p: 133-138.
- ROA, N.; LINARES, T.; DÍAZ, T. y CHACÍN LUGO, F. 2006. Ondas foliculares ováricas en vacas Brahman y Mestizas (*Bos indicus x Bos taurus*), ubicadas en Los Llanos Centrales Venezolanos. ***Rev. Zoot. Trop.,*** Vol. 24. Nº 3: 297-306.
- SASSER, R.G. and RUDER, C.A. 1987. Detection of early pregnancy in domestic ruminants. ***J. Reprod. Fert***. Suppl., 34:261-271.
- SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; De la SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in the cow. ***J. Reprod. Fert.***, 97:197-203.
- SHEMESH, M.; AYALON, N.; LINDNER, HR. 1973. Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe. ***J. Anim. Sci***. 36 (4): 726–729.
- TRIMBERGER, G.W. 1943. Conception rate in dairy cattle by artificial insemination at various

stages of estrus by artificial insemination. ***J. Dairy Sci.*** 27:659. (Abstr.)

- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L.A.; DUFOUR, J.J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonodatropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. ***J. Anim. Sci.*** 73:3141-3151.
- TWAGIRAMUNGU, H,; GUILBAULT, L.A.; PROULX, J.G.; VILLENEUVE, P.; DUFOUR, J.J. 1992. Influence of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. ***J. Anim. Sci.*** 70:1904−1910.