



Transferencia de embriones *in vivo* como estrategia para mejorar la eficiencia reproductiva en granjas comerciales durante épocas de estrés por calor

Compartimos las conclusiones de una experiencia práctica en la que comparamos los resultados de la transferencia de embriones obtenidos *in vivo* en épocas frescas para conseguir la primera gestación posparto, respecto de una estrategia basada en la primera inseminación artificial programada a tiempo fijo.

Susana Astiz¹, Daniel Martínez², Francisco Sebastián³, Octavi Fargas⁴, Raquel Patrón⁵, José Luis Pesantez¹

¹Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

²Embriovet SL

³Cowvet SL

⁴Vapl SL

⁵Trialvet SL

En vacas de leche, las altas temperaturas se relacionan directamente con niveles bajos de eficiencia reproductiva (Lucy, 2001; López-Gatius, 2003; Roelofs *et al.*, 2010). Índices que se ven afectados son el aumento de los días abiertos, la reducción de la tasa de concepción, la elevación del porcentaje de vacas en anestro en momentos en los que ya deberían ciclar, la presencia de folículos anovulatorios o persistentes y la mayor frecuencia de quistes ováricos (Caraviello *et al.*, 2006; Colazo *et al.*, 2014; López-Helguera *et al.*, 2012).

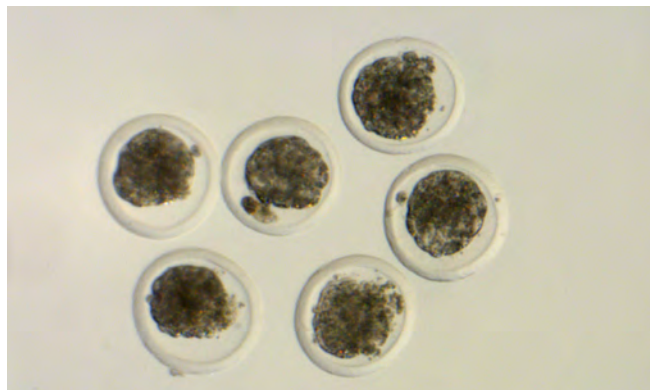
En cualquier fase de la vida productiva de la vaca, el estrés por calor es negativo, pero durante el posparto, momento crítico para garantizar el rendimiento reproductivo, lo es aún más, ya que eleva drásticamente el porcentaje de animales no cíclicos una vez superado el período de espera voluntaria (PEV) (Galvão *et al.*, 2007). La incidencia de este tipo de animales se hace más patente en las últimas décadas en las granjas lecheras (Bartolome *et al.*, 2009).

Los mecanismos por los que el estrés por calor reduce la fertilidad de las vacas son diversos, entre ellos se incluye una menor producción de estradiol por parte de los folículos en los ovarios y el retraso de la selección de los folículos alterando la cronología de las olas foliculares, lo que perjudica la calidad y, por lo tanto, la capacidad de producir un embrión viable por parte de los ovocitos (Astiz y Fargas, 2013; Colazo *et al.*, 2015; Yousuf *et al.*, 2016). El estrés calórico también altera la zona uterina (DeKruif, 1978; De Rensis *et al.*, 2017)], acelera la luteoli-

sis y reduce la producción de progesterona, hormona vital para el mantenimiento de la gestación y para asegurar la calidad del ovocito del ciclo siguiente (Roman-Ponce *et al.*, 1978). Estos mecanismos, observados específicamente en las fases tempranas posparto, pueden retrasar la primera ovulación posparto al afectar al desarrollo folicular y al reducir la producción de estradiol (De Rensis y Scaramuzzi, 2003). Además, pueden afectar a la viabilidad del cuerpo lúteo y al nivel de progesterona (Kornmatitsuk *et al.*, 2008).

El alivio del estrés por calor se intenta mediante estrategias de refrigeración o *cooling* que se implantan en las granjas y constituyen ya herramientas habituales en nuestras explotaciones en España, que incluyen combinación del uso de ventiladores e irrigadores con ciclos alternados de duración determinada (Flamenbaum y Galon, 2010). Con todo, y a pesar de reducir en parte estos efectos deletéreos en la eficiencia reproductiva de

► LAS ESTRATEGIAS DE REFRIGERACIÓN SE DEBEN UNIR A OTRAS DE MANEJO ESPECÍFICAMENTE REPRODUCTIVO



nuestros rebaños, hay niveles de estrés por calor que no logramos controlar, especialmente en las vacas de alta producción. Así pues, las estrategias de refrigeración se deben unir a otras de manejo específicamente reproductivo, entre las que se incluyen sistemas de inseminación artificial programada (IA) a tiempo fijo o la realización de la transferencia embrionaria de embriones recogidos durante la estación fría e implantados en fases de estrés por calor en animales en los que sus ovocitos aún se verían afectados por el estrés por calor sufrido previamente (Ambrose *et al.*, 1999; Flamenbaum y Galon, 2010). En última instancia ya se valora la identificación de la base genética que favorezca la resistencia al calor en vacas individuales, que serían las más adecuadas para ser seleccionadas como reproductoras (Hansen, 2007).

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

En esta experiencia práctica que plasmamos en el presente artículo y que se realizó en una granja comercial española en fases de estrés por calor, comparamos la eficiencia reproductiva para conseguir la primera gestación posparto según realizamos transferencia de embriones obtenidos al vivo en épocas frescas, respecto de una estrategia basada en la primera IA a tiempo fijo. ►►

GREEN
chemical
www.greenchemical.es

GREEN COKRIPTOS

**Bolos ruminales para
terneros recién nacidos**

Prevención de las diarreas neonatales
por Cryptosporidios y Coccidios



Distribuidores interesados enviar mail a
info@greenchemical.es

Tlf. 628 117 577

GREEN CHEMICAL
C/ Naranjo de Bulnes, N° 23 1º B
33211 Gijón (Asturias)



Para eso se eligieron 11 novillas que se superovularon con un protocolo clásico según bibliografía (Bó *et al.*, 2010), utilizando semen de un mismo toro (Gerard, ABS) que también se utilizó para efectuar las inseminaciones. La obtención de embriones fue efectuada siete días después de los celos, todas el mismo día y por el mismo equipo de ET (Nr. ERES11ET05B). Únicamente se congelaron en etilenglicol y se utilizaron en el estudio los embriones de calidad 1.

Posteriormente, un total de 170 vacas primíparas (DIM = $158 \pm 17,9$) se sincronizaron para su primer ciclo con el protocolo G6G según Bello *et al.*, (2006). Este protocolo consiste en prostaglandina a día 0, GnRH a día 2 y 8, prostaglandina a días 15 y 16, GnRH a día 17 (por la tarde) y, finalmente, inseminación a tiempo fijo a día 18 en caso de inseminarse y ovulación a día 18 por la tarde. De estas vacas, las incluidas en el Grupo IA, con una $n = 82$ (DIM = $159 \pm 16,3$) recibieron inseminación artificial a tiempo fijo en el momento indicado y las vacas del Grupo ET, con $n = 88$ (DIM = $157 \pm 19,4$), se sometieron a exploración ecográfica (transdutor lineal de 7,5 MHz, Ibex®Prol) y si se observaba, por lo menos, cuerpo lúteo (CL) con un diámetro ≥ 18 mm recibían la implantación de un embrión 7 días tras la sincronización de la ovulación. Los días en leche medios de los dos grupos no difirieron estadísticamente entre sí ($P = 0,402$), lo que es importante para poder comparar los resultados de fertilidad entre grupos.

A día 28-34 postovulación se efectuó el diagnóstico de gestación primero (DG), también por ecografía, y las vacas preñadas se confirmaron a día 56-63 (DG-2) para detectar la tasa de pérdida de gestación o fetal temprana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos globales reproductivos obtenidos fueron los siguientes:

El número de embriones calidad-1/donante fue de 5,36. Un total de 32,9 % de las vacas fueron rechazadas como receptoras. La superficie luteal media fue de $460 \pm 223,5$ mm² y no afectó a la probabilidad de gestación.

Dos donantes produjeron embriones más fértiles [fertilidad = 88,9 % (8/9) e = 75 % (6/8)] y dos dieron embriones menos fértiles [0 % (0/4) y 14,3 % (1/7), $P = 0,009$], aunque estas diferencias individuales no introdujeron rumbo en el estudio comparativo entre grupos de vacas IA vs. ET. La distribución de embriones más o menos fértiles fue del 28 % (17/59), de alta fertilidad; 19 % (11/59), de baja fertilidad, y 52 % (31/59), de fertilidad media. La pérdida de gestación temprana entre los animales gestantes del grupo ET (tras un DG positivo) no se diferenció según donantes de embriones ($P = 0,114$).

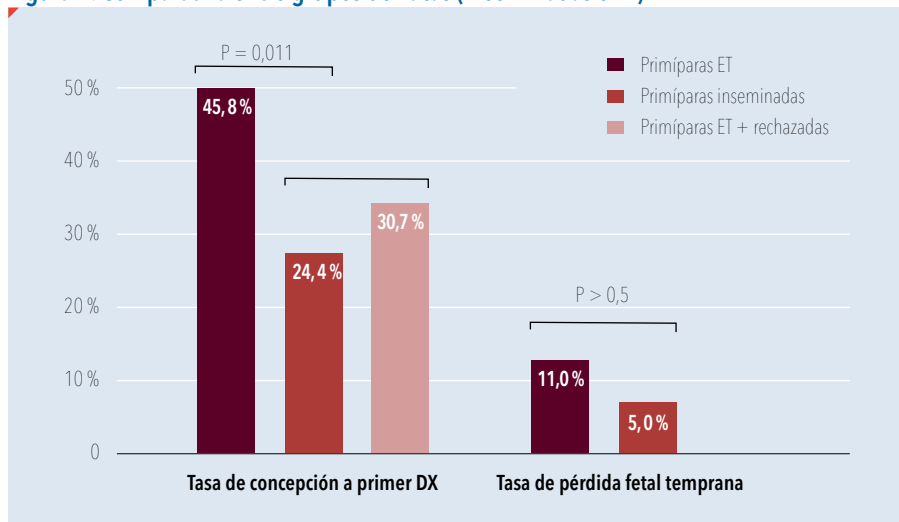
Los días en leche no afectaron a la tasa de concepción ($P = 0,7$) y esta fue, además, similar entre grupos que fueron comparados y para vacas gestantes y no gestantes (DO gestantes = $158,8 \pm$ vs. DO no gestantes = $157,5 \pm 18,1$).

► LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES FUE EFECTUADA SIETE DÍAS DESPUÉS DE LOS CELOS, TODAS EL MISMO DÍA Y POR EL MISMO EQUIPO DE ET

La tasa de concepción fue mayor en las vacas del grupo ET [45,8 % (27/59)] que en las vacas inseminadas [24,4 % (20/82), $P = 0,009$]. Con todo, si dentro del grupo ET las vacas rechazadas tras la ecografía por no tener un CL adecuado se incluyeran como no preñadas, la fertilidad no varía entre grupos [24,4 % (20/82) en IA y 30,7 % (27/88) en el grupo ET; $P = 0,39$].

En realidad, la capacidad de concepción en estas vacas se revela igual, variando realmente la diferencia en ciclicidad ovárica. En el grupo ET somos capaces de rechazar a los animales que no ciclan de manera normal en ese momento, lo que resalta la relevancia de la actividad ovárica temprana en fases de estrés por calor, de manera que descartar receptoras significa rechazar vacas con una funcionalidad ovárica aún alterada en ese momento y que no serán capaces de mantener una gestación normal, aun cuando sus ovocitos ya sean competentes. Por tanto, esta afición reproductiva se demuestra superada mediante la implantación de un programa de ET.

Figura 1. Comparativa entre grupos de vacas (inseminadas o ET)*



*Tasa de concepción a primer diagnóstico de gestación y tasa de pérdida de gestación comparada de vacas primíparas (de primer parto) según recibieron un embrión (primíparas ET), inseminadas (primíparas inseminadas) o agrupando todas las vacas destinadas a ET, las que recibieron embrión y las rechazadas por no tener cuerpo lúteo (primíparas ET + rechazadas)

Hay estudios que corroboran la afición de la fertilidad por reducción de la calidad ovocitaria (Roth, 2008), lo que en este caso parece no observarse. Debemos hacer notar que los elevados días en leche de cada grupo implican que se dejó transcurrir un intervalo amplio tras el comienzo de la época de estrés por calor (más de dos meses). Por experiencia en estas granjas, desde finales de junio hasta mediados de septiembre no se aborda ningún protocolo de manejo reproductivo, lo cual comienza en octubre-noviembre, cuando ya se asegura una fertilidad aceptable. Esto es lo que puede explicar que en nuestro estudio ya no comprobemos una reducción de la fertilidad vía ovocitaria en el grupo de las vacas inseminadas. De hecho, ya se publicó en otros trabajos que la estrategia reproductiva global debe ser específica de granja, combinando las diferentes posibilidades reproductivas e incluyendo las diferentes biotecnologías disponibles (Heikkilä y Peippo, 2012).

En el caso de los animales inseminados, no podemos evaluar si la vaca ciclará o no de manera normal en ese ciclo, de manera que se incluyen todos. Hasta ratificar un DG negativo, no podremos llevar a cabo tratamientos o medidas para hacer recuperar la ciclicidad a estos. En nuestro estudio suponen un 75,6 % de las vacas inseminadas las que se encuentran en esta situación; por lo tanto, podremos comenzar a trabajar sobre estos animales a día 28, tras la ovulación inducida con el protocolo de sincronización.

Con todo, en el grupo ET, entre las receptoras rechazadas, que fueron un 32,9 % de los animales de este grupo, estas se podían ya tratar específicamente a día 7 tras la ovulación inducida con el protocolo de sincronización. En nuestro estudio no consideramos los efectos de acelerar el ritmo reproductivo de los animales no gestantes o rechazados como receptores, pero es de esperar que tenga un impacto positivo en la tasa de preñez (en el ritmo reproductivo del grupo) y que aumente el beneficio de la implantación del programa de ET aplicado para la primera IA.

La pérdida de gestación temprana no difirió entre los grupos [5 % (1/20) en IA *vs.* 11 % (3/27) en ET; $P = 0,63$], de acuerdo con trabajos previos que muestran una pérdida de gestación tras un DG positivo previo similar (figura 1).

CONCLUSIÓN

En esta experiencia que mostramos, la implantación de una estrategia de ET para la primera gestación posparto en épocas de estrés por calor resultó en una mayor eficiencia reproductiva por vaca y en una tasa de preñez esperada mejor, y no por mejorar la

► LA IMPLANTACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE ET PARA LA PRIMERA GESTACIÓN POSPARTO EN ÉPOCAS DE ESTRÉS POR CALOR RESULTÓ EN UNA MAYOR EFICIENCIA REPRODUCTIVA POR VACA

fertilidad individual de las vacas que recibieron embriones, sino por la capacidad de excluir de la estrategia reproductiva a los animales que aún no están ciclando y que no podrán mantener una gestación, aún cuando tengan un embrión viable. ■

BIBLIOGRAFÍA

- Ambrose JD1, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Thatcher MJ, Kassa T, Binelli M, Hansen PJ, Chenoweth PJ, Thatcher WW. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1999 Nov;82(11):2369-76.
- Astiz S, Fargas O. Pregnancy per AI differences between primiparous and multiparous high-yield dairy cows after using Double Ovsynch or G6G synchronization protocols. *Theriogenology.* 2013;79:1065-70.
- Bartolome JA, van Leeuwen JJ, Thieme M, Sa'filho OG, Melendez P, Archbald LF, et al. Synchronization and resynchronization of inseminations in lactating dairy cows with the CIDR insert and the Ovsynch protocol. *Theriogenology.* 2009;72:869-78.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2006;89:3413-24.
- Bó GA, Carballo Guerrero D, Trifúlo A, Trifúlo H, Trifúlo R, Rogan D and Mapletoft RJ. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(1):106-12. doi: 10.1071/RD09226.
- Caraviello DZ, Weigel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB, et al. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J Dairy Sci.* 2006;89:4723-35.
- Colazo MG, Ambrose DJ. Effect of initial GnRH and duration of progesterone insert treatment on the fertility of lactating dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2015;50:497-504.
- Colazo MG, Mapletoft RJ. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J.* 2014;55:772-80.
- De Kruijff A. Factors influencing the fertility of a cattle population. *J Reprod Fertil.* 1978;54:507-18.
- De Rensis F, Lopez-Gatius F, García-Ispuerto I, Morini G, Scaramuzzi RJ. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology.* 2017 Mar 15;91:145-153. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.024. Epub 2016 Dec 24. Review.
- Flamenbaum II, Galon N. Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. *J Reprod Dev.* 2010 Jan;56 Suppl:S36-41.
- Galvao KN, Santos JE, Cerri RL, Chebel RC, Rutigliano HM, Bruno RG, et al. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. *J Dairy Sci.* 2007;90:4240-52.
- Hansen PJ. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology.* 2007 Sep 1;68 Suppl 1:S242-9. Epub 2007 May 7.
- Heikkilä AM, Peippo J. Optimal utilization of modern reproductive technologies to maximize the gross margin of milk production. *Anim Reprod Sci.* 2012 Jun;132(3-4):129-38. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.004. Epub 2012 May 15.
- Kornmatitsuk B, Chantaraprateep P, Kornmatitsuk S, Kindahl H. Different types of postpartum luteal activity affected by the exposure of heat stress and subsequent reproductive performance in Holstein lactating cows. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43:515-9. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00945.x.
- Lopez-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology.* 2003;60:89-99.
- Lopez-Helguera I, Lopez-Gatius F, García-Ispuerto I. The influence of genital tract status in postpartum period on the subsequent reproductive performance in high producing dairy cows. *Theriogenology.* 2012;77:1334-42.
- Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci.* 2001;84:1277-93.
- Roelofs J, Lopez-Gatius F, Hunter RH, van Eerdenburg FJ, Hanzen C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology.* 2010;74:327-44.
- Roman-Ponce H, Thatcher WW, Caton D, Barron DH, Wilcox CJ. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *J Anim Sci.* 1978;46:175-80.
- Roth Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2008 Jul;43 Suppl 2:238-44. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x.
- Yousuf MR, Martins JP, Ahmad N, Nobis K, Pursley JR. Presynchronization of lactating dairy cows with PGF2alpha and GnRH simultaneously, 7 days before Ovsynch have similar outcomes compared to G6G. *Theriogenology.* 2016;86:1607-14.