



Transferencia de embrións in vivo como estratexia para mellorar a eficiencia reprodutiva en granxas comerciais durante épocas de estrés por calor

Compartimos as conclusións extraídas dunha experiencia práctica na que comparamos os resultados da transferencia de embrións obtidos in vivo en épocas frescas para conseguir a primeira xestación posparto, respecto dunha estratexia baseada na primeira inseminación artificial programada a tempo fixo.

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

¹Instituto Nacional de Investigación e Tecnoloxía Agraria e Alimentaria (INIA)

²Embriovet SL

³Cowvet SL

⁴Vapl SL

⁵Trialvet SL

En vacas de leite, as altas temperaturas relaciónanse directamente con niveis baixos de eficiencia reprodutiva (Lucy, 2001; López-Gatius, 2003; Roelofs *et al.*, 2010). Índices que se ven afectados son o aumento dos días abertos, a redución da taxa de concepción, a elevación da porcentaxe de vacas en anestro en momentos nos que xa deberían ciclar, a presenza de folículos anovulatorios ou persistentes e a maior frecuencia de quistes ováricos (Caraviello *et al.*, 2006; Colazo *et al.*, 2014; López-Helguera *et al.*, 2012).

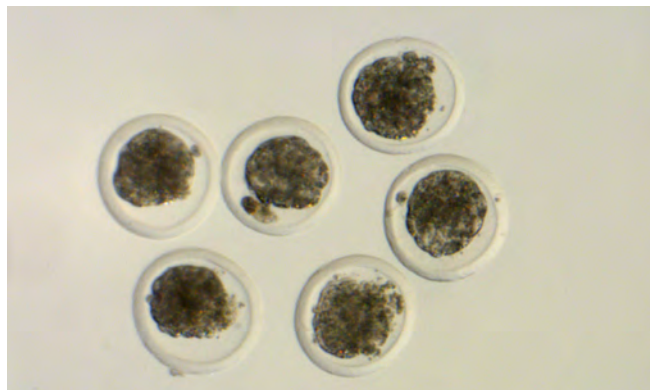
En calquera fase da vida produtiva da vaca, o estrés por calor é negativo, pero durante o posparto, momento crítico para garantir o rendemento reprodutivo, éo aínda máis, xa que eleva drasticamente a porcentaxe de animais non cíclicos unha vez superado o período de espera voluntaria (PEV) (Galvao *et al.*, 2007). A incidencia deste tipo de animais faise máis patente nas últimas décadas nas granxas leiteiras (Bartolomé *et al.*, 2009).

Os mecanismos polos que o estrés por calor reduce a fertilidade das vacas son diversos. Entre eles inclúense unha menor produción de estradiol por parte dos folículos nos ovarios e o atraso da selección dos folículos, alterando a cronoloxía das ondas foliculares, o que prexudica a calidade e, polo tanto, a capacidade de producir un embrión viable por parte dos ovocitos (Astiz e Fargas, 2013; Colazo *et al.*, 2015; Yousuf *et al.*, 2016). O estrés calórico tamén altera a zona uterina (DeKruif, 1978; De Rensis *et al.*, 2017), acelera a luteólise e reduce a produción de proxesterona, hormona

vital para o mantemento da xestación e para asegurar a calidade do ovocito do ciclo seguinte (Roman-Ponce *et al.*, 1978). Estes mecanismos, observados especificamente nas fases temperás posparto, poden atrasar a primeira ovulación posparto ao afectarlle ao desenvolvemento folicular e ao reducir a produción de estradiol (De Rensis e Scaramuzzi, 2003). Ademais, poden afectar a viabilidade do corpo lúteo e o nivel de proxesterona (Kornmatitsuk *et al.*, 2008).

O alivio do estrés por calor téntase mediante estratexias de refrixeración ou *cooling* que se implantan nas granxas e constitúen xa ferramentas habituais nas nosas explotacións en España, que inclúen combinación do uso de ventiladores e irrigadores con ciclos alternados de duración determinada (Flamenbaum e Galon, 2010). Con todo, e a pesar de reducir en parte estes efectos deletéreos na eficiencia reprodutiva dos nosos rabaños, hai niveis de estrés por calor que non lo-

► AS ESTRATEXIAS DE REFRIXERACIÓN DÉBENSE UNIR A OUTRAS DE MANEXO ESPECIFICAMENTE REPRODUTIVO



gramos controlar, especialmente nas vacas de alta produción. Así pois, as estratexias de refrixeración débense unir a outras de manexo especificamente reprodutivo, entre as que se inclúen sistemas de inseminación artificial programada (AI) a tempo fixo ou a realización da transferencia embrionaria de embrións recollidos durante a estación fría e implantados en fases de estrés por calor en animais nos que os seus ovocitos aínda se verían afectados polo estrés por calor sufrido previamente (Ambrose *et al.*, 1999; Flamenbaum e Galon, 2010). En última instancia xa se valora a identificación da base xenética que favoreza a resistencia á calor en vacas individuais, que serían as máis adecuadas para ser seleccionadas como reprodutoras (Hansen, 2007).

DESCRICIÓN DO ESTUDO

Nesta experiencia práctica que plasmos no presente artigo e que se realizou nunha granxa comercial española en fases de estrés por calor, comparamos a eficiencia reprodutiva para conseguir a primeira xestación posparto segundo realizamos transferencia de embrións obtidos in vivo en épocas frescas, respecto dunha estratexia baseada na primeira IA a tempo fixo. ►►

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, Nº 23 1º B
33211 Gijón (Asturias)



Para iso elixíronse 11 xovencas que se superovularon cun protocolo clásico segundo bibliografía (Bó *et al.*, 2010), utilizando seme dun mesmo touro (Gerard, ABS) que tamén se utilizou para efectuar as inseminacións. A obtención de embrións foi efectuada sete días despois dos celos, todas o mesmo día e polo mesmo equipo de ET (Nr. ES11ET05B). Unicamente se conxelaron en etilenglicol e se utilizaron no estudo os embrións de calidade 1.

A continuación, un total de 170 vacas primíparas (DIM = $158 \pm 17,9$) sincronizáronse para o seu primeiro ciclo co protocolo G6G segundo Bello *et al.* (2006). Este protocolo consiste en prostaglandina a día 0, GnRH a días 2 e 8, prostaglandina a días 15 e 16, GnRH a día 17 (pola tarde) e, finalmente, inseminación a tempo fixo a día 18 en caso de inseminar e ovulación a día 18 pola tarde. Destas vacas, as incluídas no Grupo AI, cunha $n = 82$ (DIM = $159 \pm 16,3$), recibiron inseminación artificial a tempo fixo no momento indicado e as vacas do Grupo ET, con $n = 88$ (DIM = $157 \pm 19,4$), sometéronse a exploración ecográfica (transdutor lineal de 7,5 MHz, Ibex®Prol) e se se observaba, polo menos, corpo lúteo (CL) cun diámetro ≥ 18 mm recibían a implantación dun embrión 7 días tras a sincronización da ovulación. Os días en leite medios dos dous grupos non diferiron estatisticamente entre si ($P = 0,402$), o que é importante para poder comparar os resultados de fertilidade entre grupos.

A día 28-34 postovulación efectuouse o diagnóstico de xestación primeiro (DX), tamén por ecografía, e as vacas preñadas confirmáronse a día 56-63 (DX-2) para detectar a taxa de perda de xestación ou fetal temperá.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

Os datos globais reprodutivos obtidos foron os seguintes:

O número de embrións calidade 1/doante foi de 5,36. Un total de 32,9 % das vacas foron rexeitadas como receptoras. A superficie luteal media foi de $460 \pm 223,5$ mm² e non lle afectou á probabilidade de xestación.

Dous doantes produciron embrións máis fértiles [fertilidade = 88,9 % (8/9) e = 75 % (6/8)] e dous deron embrións menos fértiles [0 % (0/4) e 14,3 % (1/7), $P = 0,009$], aínda que estas diferenzas individuais non introduciron sesgo no estudo comparativo entre grupos de vacas AI *vs.* ET. A distribución de embrións máis ou menos fértiles foi do 28 % (17/59), de alta fertilidade; 19 % (11/59), de baixa fertilidade, e 52 % (31/59), de fertilidade media. A perda de xestación temperá entre os animais xestantes do grupo ET (tras un DX positivo) non se diferenciou segundo doantes de embrións ($P = 0,114$).

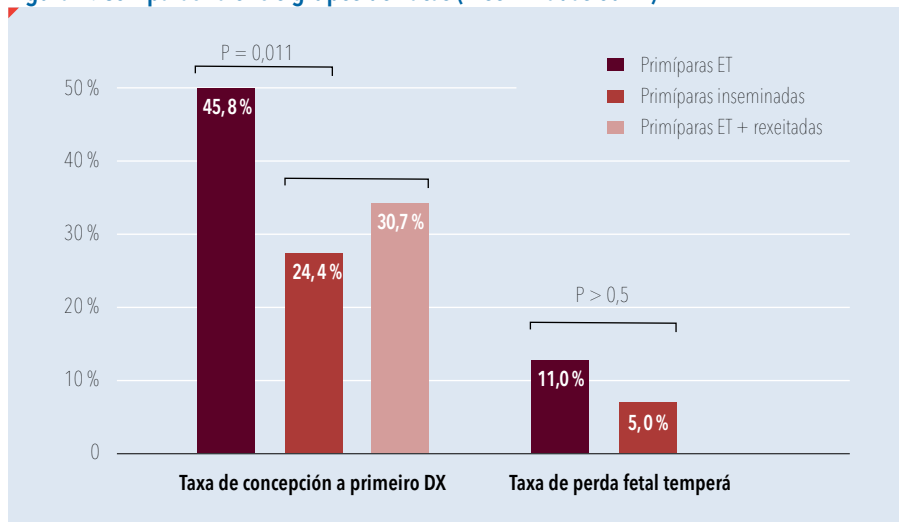
Os días en leite non lle afectaron á taxa de concepción ($P = 0,7$) e esta foi, ademais, similar entre grupos que foron comparados e para vacas xestantes e non xestantes (DO xestantes = $158,8 \pm$ *vs.* DO non xestantes = $157,5 \pm 18,1$).

▶ A OBTENCIÓN DE EMBRIÓN
FOI EFECTUADA SETE DÍAS
DESPOIS DOS CELOS, TODAS
O MESMO DÍA E POLO MESMO
EQUIPO DE ET

A taxa de concepción foi maior nas vacas do grupo ET [45,8 % (27/59)] que nas vacas inseminadas [24,4 % (20/82), $P = 0,009$]. Con todo, se dentro do grupo ET as vacas rexeitadas tras a ecografía por non ter un CL adecuado se inclúen como non preñadas, a fertilidade non variaría entre grupos [24,4 % (20/82) en IA e 30,7 % (27/88) no grupo ET; $P = 0,39$].

En realidade, a capacidade de concepción nestas vacas revélase igual, variando realmente a diferenza en ciclicidade ovárica. No grupo ET somos capaces de rexeitar os animais que non ciclan de maneira normal nese momento, o que resalta a relevancia da actividade ovárica temperá en fases de estrés por calor, de maneira que descartar receptoras significa rexeitar vacas cunha funcionalidade ovárica aínda alterada nese momento e que non serán capaces de manter unha xestación normal, aínda cando os seus ovocitos xa sexan competentes. Por tanto, esta afección reprodutiva demóstrase superada mediante a implantación dun programa de ET.

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



*Taxa de concepción a primeiro diagnóstico de xestación e taxa de perda de xestación comparada de vacas primíparas (de primeiro parto) segundo recibiron un embrión (primíparas ET), inseminadas (primíparas inseminadas) ou agrupando todas as vacas destinadas a ET, as que recibiron embrión e as rexeitadas por non ter corpo lúteo (primíparas ET + rexeitadas)

Hai estudos que corroboran a afectación da fertilidade por redución da calidade ovocitaria (Roth, 2008), o que neste caso parece non observarse. Debemos facer notar que os elevados días en leite de cada grupo implican que se deixou transcorrer un intervalo amplo tras o comezo da época de estrés por calor (máis de dous meses). Por experiencia nestas granxas, desde finais de xuño ata mediados de setembro non se aborda ningún protocolo de manexo reprodutivo, o cal comeza en outubro-novembro, cando xa se asegura unha fertilidade aceptable. Isto é o que pode explicar que no noso estudo xa non comprobemos unha redución da fertilidade vía ovocitaria no grupo das vacas inseminadas. De feito, xa se publicou noutros traballos que a estratexia reprodutiva global debe ser específica de granxa, combinando as diferentes posibilidades reprodutivas e incluíndo as diferentes biotecnoloxías dispoñibles (Heikkilä e Peippo, 2012).

No caso dos animais inseminados, non podemos avaliar se a vaca ciclará ou non de maneira normal nese ciclo, de maneira que se inclúen todos. Ata ratificar un DX negativo, non poderemos levar a cabo tratamentos ou medidas para facer recuperar a ciclicidade a estes. No noso estudo supoñen un 75,6 % das vacas inseminadas as que se atopan nesta situación; polo tanto, poderemos comezar a traballar sobre estes animais a día 28, tras a ovulación inducida co protocolo de sincronización. Con todo, no grupo ET, entre as receptoras rexeitadas, que foron un 32,9 % dos animais deste grupo, estas podíanse xa tratar especificamente a día 7 tras a ovulación inducida co protocolo de sincronización. No noso estudo non consideramos os efectos de acelerar o ritmo reprodutivo dos animais non xestantes ou rexeitados como receptores, pero é de esperar que teña un impacto positivo na taxa de preñez (no ritmo reprodutivo do grupo) e que aumente o beneficio da implantación do programa de ET aplicada para a primeira IA.

A perda de xestación temperá non diferiu entre os grupos [5 % (1/20) en IA vs. 11 % (3/27) en ET; $P = 0,63$], de acordo con traballos previos que mostran unha perda de xestación tras un DX positivo previo similar (figura 1).

CONCLUSIÓN

Nesta experiencia que mostramos, a implantación dunha estratexia de ET para a primeira xestación posparto en épocas de estrés por calor resultou nunha maior eficiencia reprodutiva por vaca e nunha taxa de preñez esperada mellor, e non por mellorar a fertilidade individual das vacas que recibiron embrións, senón pola capacidade de excluír da estratexia reprodutiva os animais que aínda non están ciclando e que non poderán manter unha xestación, aínda cando teñan 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, Tríbulo A, Tríbulo H, Tríbulo 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 I, 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.

► A IMPLANTACIÓN DUNHA ESTRATEXIA DE ET PARA A PRIMEIRA XESTACIÓN POSPARTO EN ÉPOCAS DE ESTRÉS POR CALOR RESULTOU NUNHA MAIOR EFICIENCIA REPRODUTIVA POR VACA