

# Nuevas estrategias para prevenir la mortalidad embrionaria en el ganado lechero

## Parte 2

William Thatcher; José E. P. Santos

### Resumen

La población actual de vacas lecheras de alta producción es subfétil. Las vacas lecheras experimentan respuestas regulatorias homeoréticas y homeostáticas en la distribución de los nutrientes para sostener la lactancia. Las respuestas hormonales y metabólicas durante la lactancia combinadas con el manejo de la vaca llevaron a una reducción en la fertilidad. Los sistemas de IATF para las primeras IA y las subsecuentes han restablecido parcialmente la eficiencia reproductiva de los tambos, con preñeces de alrededor del 45% para las primeras IA y las inseminaciones resincronizadas. Los programas de manejo de la "fertilidad" han optimizado el desarrollo folicular en sincronía con las inducciones de regresión del CL y ovulación. Estos programas permitieron identificar los factores que contribuyen a la fertilidad reducida, como la anovulación, condición corporal, salud uterina y estrés calórico. La disponibilidad de progesterona durante el reclutamiento programado de un folículo preovulatorio para una IATF tiene grandes efectos benéficos sobre la subsecuente preñez. La aplicación de tecnologías de reproducción asistida, como la transferencia embrionaria a tiempo fijo, la inducción de CL accesorios con hCG, la administración de bST, ha mejorado la preñez por IA en vacas lecheras en lactancia.

### New strategies to prevent embryo mortality in dairy cattle

#### Summary

The current population of high producing dairy cows is sub-fertile. Dairy cows undergo transitional homeorhetic and homeostatic regulatory responses to partition nutrients to support lactation. The hormonal and metabolic responses during lactation coupled with management of the cow have contributed to the reduction in fertility.

Systems of programmed timed insemination for first and re-occurring inseminations have partially restored herd reproductive performance with Pregnancy per AI approximating 45% for first and resynchronized second inseminations of non-pregnant cows. These "fertility" management programs have optimized ovarian follicle development in synchrony with inductions of CL regression and ovulation. Such programs identified occurrence of anovulation, body condition, uterine health and summer heat stress as factors contributing to reduced fertility. Availability of progesterone during the programmed recruitment of a preovulatory follicle for a timed insemination has major beneficial effects on subsequent Pregnancy per AI. Application of assisted reproductive technology such as timed embryo transfer, induction of accessory CL with hCG, and administration of bST have stimulated pregnancy per AI in lactating dairy cows.

## Parte 1

### 1. Introducción

### 2. El periparto

### 3. Pérdidas embrionario/fetales en vacas lecheras en lactancia

### 4. Optimización de los programas de IATF

## 5. Estrategias suplementarias para mejorar las tasas de preñez y reducir la mortalidad embrionaria

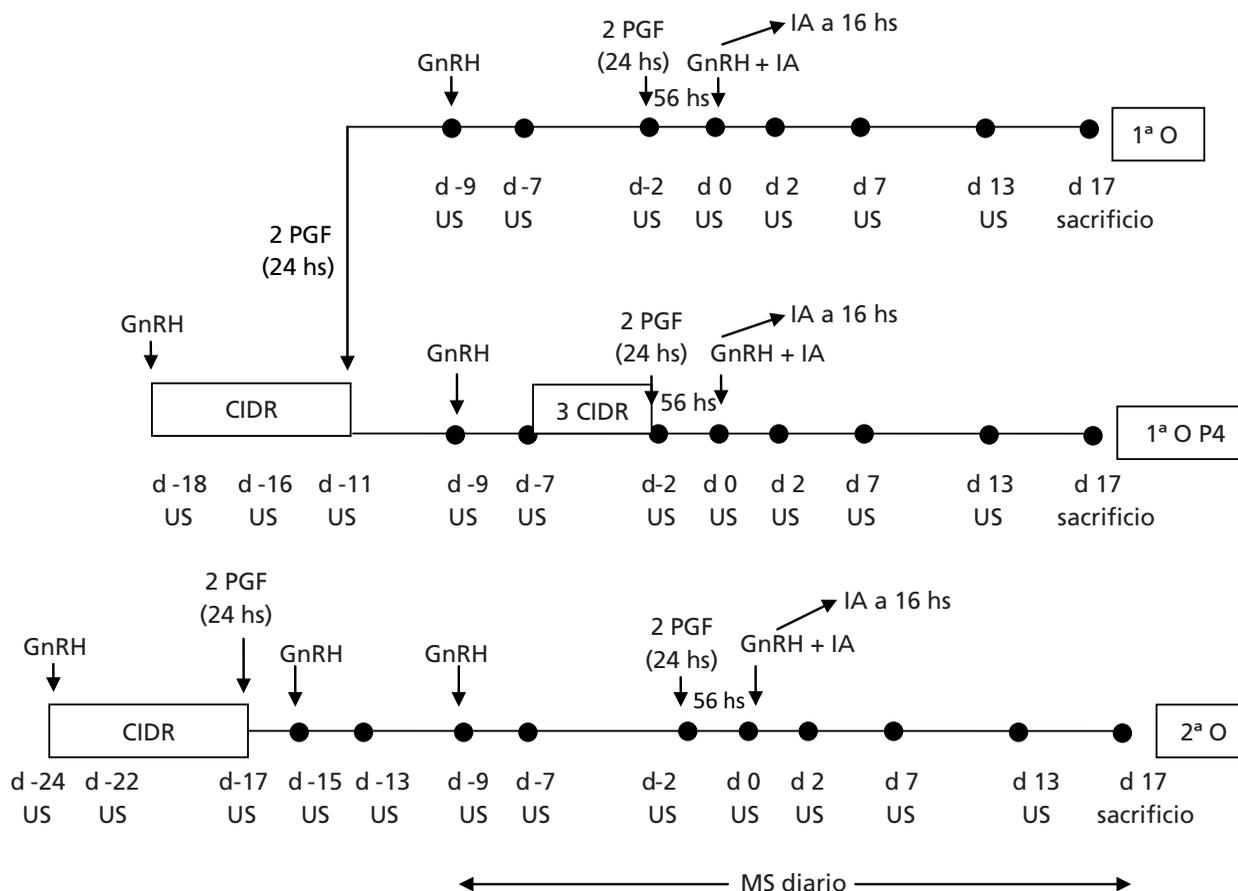
### 5.1 Efecto de la onda folicular ovulatoria y la concentración de progesterona durante el desarrollo folicular en la función luteal, desarrollo del concepto y preñez por IA

La onda folicular del folículo ovulatorio en los programas Ovsynch u Ovsynch modificado afecta la fertilidad de la vaca sometida a protocolos de sincronización <sup>(9)</sup>. La preñez por IA fue mayor al día 30 en vacas que se provocó la ovulación del folículo dominante de la segunda onda (2<sup>a</sup> O) (43,0%) comparadas con las vacas en las que se indujo la ovulación del folículo de la primera onda (1<sup>a</sup> O) (31,3%) y en vacas anovulares (29,7%). La proporción de vacas con intervalos cortos a la reinseminación difirió entre grupos de vacas, y fue 7,1, 15,7 y 11,9% para la segunda onda, primera onda y vacas anovulares, respectivamente. Consecuentemente, la onda folicular

del folículo ovulatorio y el estado de no ciclicidad tienen el mayor efecto en reducir la preñez de vacas lecheras.

Bisinotto y col. <sup>(6)</sup> diseñaron un experimento para determinar los efectos de la onda del folículo ovulatorio y las concentraciones de P4 durante la fase de crecimiento folicular sobre la respuesta reproductiva de vacas lecheras. Vacas Holstein que no estaban en lactancia fueron pre-sincronizadas con una inyección de GnRH y un CIDR, seguido del retiro del dispositivo a los 7 días y dos inyecciones de PGF separadas por 24 hs (Figura 4). Todas las vacas recibieron una inyección de GnRH 1 día después de la segunda PGF, que fue la primera GnRH del protocolo de sincronización (día -9 GnRH, día -2 y -1 PGF, día 0 GnRH) para inducir a ovulación en la primera onda folicular (1<sup>a</sup> O; n=13) o primera onda folicular suplementada con P4 (1<sup>a</sup> O P4; n=8). Las vacas inducidas a ovular en la segunda onda folicular (2<sup>a</sup> O; n=12) recibieron el protocolo de sincronización comenzando 6 días después de la

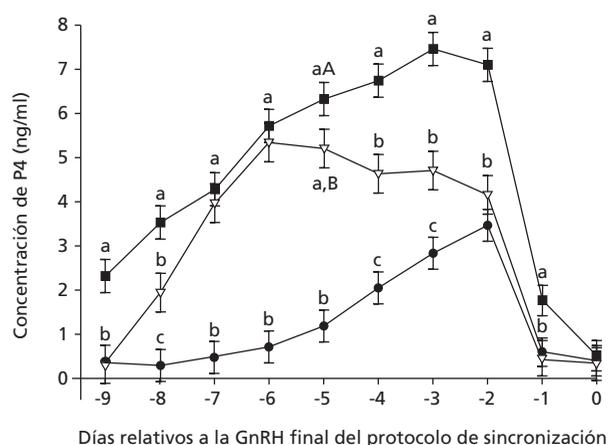
**Figura 4.** Diagrama de actividades durante el experimento. IA=inseminación artificial; MS=muestras de sangre para análisis de estradiol y/o P4; sacrificio=las vacas fueron sacrificadas con insensibilización y sangrado; US=ultrasonografía ovárica.



**Figura 5.** Concentraciones de progesterona en plasma durante el tratamiento en vacas inducidas a ovular el folículo dominante de la primera onda folicular (1ª O, círculos sólidos), primera onda concurrente con suplementación de P4 (1ª O P4, triángulos blancos) o segunda onda (2ª O, cuadrados negros).

a,b,c promedios con diferente superinscripción difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos en el mismo día.

A,B promedios con superinscripción diferente tendieron ( $0,05 < p < 0,10$ ) a ser diferentes entre tratamientos en el mismo día.



GnRH. Las vacas del grupo 1ª O P4 recibieron 3 CIDR a las 12, 24 y 48 hs posteriores a la GnRH (día -9) que fueron removidos al momento de la inyección de PGF (día -2). Las vacas fueron inseminadas al momento de la última GnRH (día 0) y 16 hs más tarde. Las vacas fueron sacrificadas en el día 17 posterior a la última GnRH. La concentración de P4 durante la fase de crecimiento folicular fue mayor en el grupo 2ª O, intermedio en el grupo 2ª O P4 y menor en el grupo 1ª O (Figura 5). Las vacas de 1ª O ovularon folículos más grandes, que resultaron en CL mayores y concentraciones de P4 más elevadas desde el día 4 al 16 posteriores a la GnRH final. La concentración de estradiol máxima fue mayor en el grupo 1ª O que en los grupos 1ª O P4 y 2ª O. La proporción de vacas preñadas al día 17 tendió a ser menor en el grupo 1ª O que en los grupos 1ª O P4 y 2ª O. La longitud de los conceptus no fue diferente entre tratamientos. Hubo una tendencia a producir menos interferon-tau (INF-t) en los conceptus de la 2ª O, sin embargo no hubo diferencias en la cantidad relativa de ARNm para INF-t entre tratamientos.

Como se dijo antes<sup>(9)</sup>, la ovulación de los folículos dominantes de la primera onda folicular redujo la fertilidad de las vacas lecheras, y basa-

do en las presentes observaciones<sup>(8)</sup>, el efecto negativo parece estar mediado por concentraciones subóptimas de P4 durante el crecimiento del folículo ovulatorio. Además, la función luteal durante la preñez temprana y la capacidad del conceptus elongado para producir INF-t no estuvieron relacionados con una reducción en la fertilidad de vacas que ovularon en la primera onda.

Trabajos recientes (comunicación personal Bisinotto, R. y Santos, J.E.P) en los que se evaluó la fertilidad de vacas lecheras sincronizadas con dos inyecciones de PGF (intervalo de 14 días) y 12 días después el inicio de un protocolo Cosynch 72 hs de 5 días con dos inyecciones de PGF (día 61 GnRH, días 66 y 67 PGF, día 69 GnRH + IATF). El foco del experimento estuvo en las vacas que no tenían CL al inicio del Cosynch. Las vacas sin CL fueron asignadas al azar para recibir o no dos CIDR al momento de la inyección de la primera GnRH. Todas las vacas que tenían CL sirvieron como grupo control de diestro. Fueron registrados datos de 1.392 vacas, de las cuales 233 y 217 fueron asignadas a los grupos sin CIDR y con CIDR, respectivamente y 946 al grupo control. Las preñeces por IA para los grupos control, sin CL y sin CL + 2 CIDR fueron 49,2, 30,9 y 47,0% al día 32 ( $P < 0,0001$ ) y 46,2, 28,8 y 43,7% ( $P < 0,0001$ ), al día 60, respectivamente.

Esta serie de experimentos indica que los programas de sincronización de vacas lecheras deberían ser diseñados para inducir la ovulación del folículo dominante de la segunda onda a la IA, y que el desarrollo de folículo con altas concentraciones de P4 es necesario para optimizar la fertilidad. Además, la evaluación del CL al inicio del programa de IATF permite suplementar con P4 a las vacas sin CL (vacas con folículo dominante en la primera onda o en anestro) como forma de mejorar la fertilidad ante la subsecuente IATE. Estos resultados podrían explicar parcialmente las observaciones de Melendez y col.<sup>(47)</sup>, en las cuales vacas en lactancia sometidas a un programa Ovsynch suplementadas con P4 exógena tuvieron mayores preñeces/IA que las que tuvieron un Ovsynch sin suplementación de P4. Únicamente las vacas que no expresaron celo y que no fueron inseminadas luego de la presincronización con PGF fueron incluidas a los dos protocolos Ovsynch.

La elevada P4 durante el desarrollo del folícu-

lo de la segunda onda en el Ovsynch redujo marcadamente la selección de folículos codominantes y disminuyó la tasa de ovulación doble, comparado con vacas en las que se inicia el Ovsynch con un folículo de la primera onda <sup>(26)</sup>. A pesar de ovular menos folículos, las vacas con elevada P4 durante el protocolo (segunda onda) tuvieron mejor fertilidad que las vacas que tuvieron menos P4 (primera onda) durante el Ovsynch. Por lo tanto, comenzar el protocolo con un ambiente de alta P4 puede tanto reducir la tasa de mellizos como aumentar la fertilidad a la IATF.

Cerri y col. <sup>(17)</sup> evaluaron los efectos de las concentraciones reducidas o normales de P4 durante el reclutamiento y crecimiento de los folículos ovulatorios, con similar largo de dominancia, sobre la fertilización y desarrollo embrionario en ovulaciones únicas en vacas lecheras en lactancia temprana. Las bajas concentraciones de P4 tuvieron mayores efectos sobre la dinámica folicular, concentración de estradiol durante el proestro y expresión de celo a la IA. Sin embargo, mantener bajas concentraciones de P4 (1 y 2 ng/ml) durante el desarrollo del folículo ovulatorio no afectó la calidad embrionaria, excepto por un ligero descenso en la proporción de blastómeros viables. Se concluyó que las concentraciones de P4 durante el desarrollo folicular no tienen mayores efectos sobre la fertilización y desarrollo embrionario hasta el día 6 post IA. Las respuestas a las bajas concentraciones de P4 durante el reclutamiento y crecimiento preovulatorio del folículo dominante, que interrumpen la preñez, están relacionadas con los cambios en las concentraciones de hormonas preovulatorias que afectan la posterior función uterina y el desarrollo embrionario luego de los 6 días post IA.

En otros dos experimentos, las bajas concentraciones de P4 durante el reclutamiento y desarrollo del folículo ovulatorio causó un más rápido crecimiento del folículo dominante e incrementó las concentraciones de estradiol y LH <sup>(21)</sup>. Además, las concentraciones de estradiol en el fluido folicular antral del folículo dominante fueron mayores en vacas con bajas concentraciones de P4, y la IGF-1 total fue menor que en vacas con alta P4 del experimento 1. La exposición de vacas a bajas concentraciones de P4 durante el desarrollo del folículo ovulatorio aceleró la posterior luteólisis y aumentó la cantidad de receptores a estrógenos al día 12

y aumentó la liberación de PGF en respuesta a la oxitocina al día 16 del ciclo estral.

En conjunto, estos resultados sugieren que la reducción en la fertilidad de vacas lecheras con baja P4 durante el desarrollo del folículo ovulatorio puede ser mediada por cambios en la composición del fluido folicular, función uterina y vida media del CL.

## **5.2 Inducción de un CL accesorio, tres ondas foliculares por ciclo y aumento de la tasa de preñez por administración de hCG**

La posibilidad de regular la función ovárica post IA para mejorar la tasa de preñez es una estrategia de manejo adicional. Inducir la ovulación de un folículo sano de la primera onda en el día 5, tanto del ciclo como post IA, resulta en dos cambios endócrinos. La hCG induce la ovulación con la consecuente formación de un CL funcional accesorio, y las vacas experimentarán tres ondas foliculares por ciclo debido a la emergencia más temprana de la segunda onda folicular. Se han realizado numerosos estudios para evaluar el efecto de la administración de hCG post ovulatoria sobre la fertilidad, arrojando diferencias entre razas, dosis inyectadas, día de la inyección relativo a la IA, inyecciones seguidas de IA a celo detectado vs IATF, tipo de protocolo, primíparas vs multíparas, estación del año y número de unidades experimentales por grupo de tratamiento. La inyección de 3.300 UI de hCG a los 5 días post IA a vacas lecheras en lactancia (n=203) aumentó la tasa de preñez al día 28 (45,8 vs 38,7%), al día 42 (40,4 vs 36,5%) y al día 90 (38,4 vs 32,0%), pero las pérdidas embrionarias tardías (día 28-día 45; 9,3%) y fetales (día 45-día 90; 9,0%) no fueron alteradas <sup>(65)</sup>. Por lo tanto, el efecto positivo de la hCG fue a través de reducir las pérdidas embrionarias tempranas. El beneficio de la hCG en la preñez al día 28 (57,1 vs 24,25) fue más evidente en vacas en lactancia que perdían CC entre la IA y el diagnóstico de gestación.

El diseño del experimento incluyó solamente vacas que fueron detectadas en celo e inseminadas luego de un programa de sincronización. Los efectos de la hCG fueron dirigidos hacia las vacas cíclicas detectadas en celo para minimizar la presencia de vacas lecheras en anestro, y 5 días después de la IA fueron elegidas para maximizar la incidencia de CL accesorios inducidos (86,2% de

las vacas tratadas con hCG tuvieron más de un CL comparado con el 23,2% de los controles).

En conjunto, estos experimentos mostraron la ventaja del tratamiento con hCG sobre la preñez. Cuando se utilizaron en vacas Nelore (*Bos indicus*) (n=975), en un experimento factorial, el tratamiento con hCG (2.500 UI) al día 7 post IATF mejoró la preñez (63,0 vs 55,4%)<sup>(58)</sup>. En vacas lecheras en lactancia (n=667), la preñez al primer servicio fue mayor cuando fueron tratadas con hCG (3.000 UI) al día 5 post IATF, comparado con solución salina (43,2 vs 30,2%)<sup>(41)</sup>. Se evaluaron los efectos de administrar CIDR, GnRH y hCG (3.300 UI) entre los 4 y 9 días post IATF en 2.852 vacas en lactancia procedentes de 5 rodeos. Aproximadamente 710 vacas por grupo<sup>(74)</sup>. Fue detectado un efecto positivo de la hCG comparado con el control (33,6 vs 28,3%), y una tendencia a una interacción tratamiento/rodeo, en las cuales la hCG tuvo una ventaja numérica comparada con el control en tres de los cinco rodeos.

Vacas Holstein en lactancia (n=2.979) procedentes de seis rodeos comerciales de Wisconsin, fueron sincronizadas e IATF y asignadas posteriormente al azar a dos grupos: control (sin tratamiento posterior, n=1.519) o hCG (2.000 UI en 4 rodeos o 3.300 UI en 2 rodeos, n=1.460) dada a los 5 días post IATF<sup>(4)</sup>. La preñez promedio por IA fue mayor (p=0,01) en vacas tratadas con hCG (41,9; 612/1.460) que en las control (37,0%; 562/1.519). Fue observada una triple interacción entre tratamiento, número de parto y momento del servicio. En las primíparas, hubo una mayor preñez al primer servicio (p=0,013) en las vacas tratadas con hCG (56,2%; 176/313) que en las control (46,3%; 152/328). En las vacas de segundo servicio, la preñez fue mayor (p=0,012) en las tratadas con hCG (40,5%; 90/222) que en las control (29,2%; 63/216). Sin embargo, las vacas multíparas tratadas con hCG (n=925) tuvieron preñeces similares a las control (n=975), tanto para el primer servicio (p= 0,26; 40,5% vs 37,1%) y posteriores (p=0,13; 29,6% vs 34,6%). Por lo tanto, el uso de hCG 5 días después de la IATF aumentó la fertilidad en vacas primíparas, tanto al primer servicio como en los posteriores, pero no mejoró la preñez en las vacas de mayor edad. La administración de hCG post ovulatoria a los 5 días no aumentó las concentraciones de P4 sustancialmente hasta el día 10<sup>(30)</sup>, y parecería que

los efectos benéficos serían durante el período de expansión del embrión o posterior (Tabla 1), en oposición al período más temprano, antes de los 5 a 7 días post IA. El tratamiento con GnRH o hCG a los 7 días posteriores a la ovulación inducida aumentó la tasa de concepción en vacas en lactancia sometidas a TETF en el día 7 pero no en la IATF<sup>(58)</sup>. Un estudio anterior demostró que el aumento de P4 posterior a la administración de GnRH a los 5 días post ovulación fue significativamente menor comparado al inducido por hCG<sup>(69)</sup>. La falta de respuesta en vacas lecheras en lactancia a la GnRH o hCG a los 7 días post IATF en el estudio<sup>(78)</sup> puede estar asociada con una inyección de hCG tardía (ej. a los 7 días en lugar de a los 5 días). Quizás los embriones de buena calidad transferidos en el día 7 pueden responder mejor a la administración tardía en oposición a los embriones desarrollados *in vivo* hasta el día 7. Una investigación realizada en ganado para carne en 3 establecimientos diferentes (n=719), evaluó el efecto de la hCG (1.000 UI) administradas al momento de la transferencia del embrión (fresco o congelado) con una mediana del día 7 del ciclo estral o 7 días después de la ovulación inducida<sup>(79)</sup>. La inyección de hCG a la TE aumentó la incidencia de CL accesorios, las concentraciones de P4 en receptoras preñadas y la tasa de preñez al día 35 (61,8 vs 53,9%). Se infirió que la mayor concentración de P4 resultante de la ovulación inducida por hCG redujo las pérdidas embrionarias posteriores a la transferencia a las receptoras. La incidencia de inadecuados niveles de P4 (definidos como < 3 ng/ml) en las vacas repetidoras fue 34% comparadas con 11,4% en vacas de primera IA<sup>(42)</sup>. Los tratamientos con dispositivos liberadores de P4 durante 7 días, comenzando a los 5 o 6 días no mejoró las tasas de preñez. El tratamiento con hCG (1.500 UI) en el día 5 aumentó la tasa de preñez, que fue dependiente de la concentración de P4 inicial, y la preñez fue significativamente mayor (p<0,05) en vacas multíparas (56% vs 35%) pero no en primíparas (37% vs 33%), respectivamente.

En conjunto, los estudios que utilizaron hCG a los 5-7 días posteriores al celo o IA fueron asociados con aumento en las concentraciones de P4 y un desarrollo folicular alterado debido a la ovulación inducida del folículo dominante de la primera onda. El resultado del uso de hCG para aumen-

tar la preñez parece variar en función de la CC, número de parto y fertilidad de las vacas.

### 5.3. Somatotrofina Bovina (bST)

Los sistemas de control de ovulación proveyeron una plataforma a los investigadores para analizar el impacto cuantitativo de los factores limitantes de la fertilidad del rodeo y probar protocolos para mejorar la preñez. La observación de que la bST (500 mg en liberación lenta) estimula la tasa de concepción cuando es administrada a vacas lecheras fue primeramente realizada cuando se administró como parte de un programa de IATF<sup>(53)</sup>. La capacidad de sincronizar la ovulación y reducir las variables de manejo con el uso de IATF aportó mayor sensibilidad para detectar diferencias experimentales en la fertilidad<sup>(51)</sup> y permitió mayor precisión en la investigación de los mecanismos de acción<sup>(7)</sup>. La Tabla 2 resume los diferentes estudios que reportaron un efecto significativo sobre la preñez en vacas lecheras por la administración de bST.

**Tabla 2.** Efecto de la bST sobre la eficiencia reproductiva en vacas lecheras en lactancia

Respuesta	Control	bST	Referencia
Tasa de preñez a los 45 días	22	38	61
Tasa de preñez a los 74 días			62
Todas las vacas	34	47	
Vacas cíclicas	43	57	
Tasa de concepción a los 45 días			64
Vacas cíclicas	38	44	
Pérdidas de preñez desde 31 a 45 días (%)	14	7	
Tasa de concepción a los 45 días	17	29	68
Tasa de concepción a los 28-36 días	40	60	70
Tasa de concepción a los 17 días	40	83	63

Varios de los estudios que evaluaron los efectos de la bST se enfocaron en la interacción factorial como vacas cíclicas o no cíclicas *vs* todas las vacas (anovulatorias + cíclicas). Las preñeces fueron evaluadas en distintos momentos, con un rango de 17 a 74 días post IA. Además de estimular la tasa de concepción o preñez a la IA, la bST redujo las pérdidas de preñez entre los días 31 y 45 de gestación<sup>(61)</sup>. Los distintos mecanismos a través de los cuales la bST mejora el desarrollo del conceptus, asociados con alteraciones en la expresión de genes endometriales, han sido descritos<sup>(5,7,75)</sup>. Los resultados de Morales-Roura y col.<sup>(49)</sup> indican un posible uso clínico de la bST al

momento de la IA para aumentar la concepción en vacas repetidoras que fallan en concebir. En contraste a estos resultados positivos, Jousan y col.<sup>(39)</sup> no observaron efectos benéficos por la administración de bST en la preñez a primer servicio en vacas lecheras expuestas a estrés calórico. Incluso hubo estimulación a la producción de leche con efectos negativos sobre la fertilidad. Los autores especularon que los efectos sobre la mejora en la preñez de la bST fueron contrarrestados por un ligero aumento de la temperatura corporal experimentado por las vacas tratadas con bST. Parecería haber efectos directos e indirectos de la bST sobre la fertilidad. Como fue discutido<sup>(76)</sup>, hay distintos efectos de interacción de la administración de bST con la alimentación con ácidos grasos inertes bypass o aceite de pescado para generar mecanismos de acción sobre el endometrio para sostener la preñez. Dado que la IGF-I estimula el desarrollo del blastocisto durante el cultivo *in vitro*<sup>(52)</sup>, Block y col.<sup>(13)</sup> cultivaron embriones con IGF-I para estimular la preñez al ser posteriormente transferidos frescos a receptoras (ej. TETF al día 8 luego de dos GnRH de un protocolo de Presincronización/Ovsynch) bajo estrés calórico. Hubo un efecto beneficioso de la IGF-I luego de la transferencia en fresco en vacas lecheras al ser transferidos en verano (preñez a la TE a los 41-49 días: 41,8% 28/67 *vs* 18,3%, 13/71, respectivamente), pero no durante los meses más frescos (preñez a la TE a los 41-49 días: 21,9%, 16/73 *vs* 28,4%, 21/74), respectivamente) del año<sup>(14)</sup>.

En conjunto, los trabajos con TETF<sup>(28,66)</sup> que incluyeron el tratamiento de embriones<sup>(13,14)</sup> indican que es una opción de manejo para mejorar la tasa de preñez en vacas lecheras en lactancia, superando parcialmente los efectos negativos de la alta producción<sup>(28)</sup> y del estrés por calor<sup>(1,2)</sup>.

## Bibliografía

Publicada en *Taurus*. Año 15, N°57, Abril 2013. Pág. 22-25.