



**UNIVERSIDAD DE LEÓN  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**

**“APORTACIONES AL CONTROL REPRODUCTIVO DE  
LAS NOVILLAS FRISONAS  
EN LA PROVINCIA DE LEÓN (ESPAÑA)”**

***“CONTRIBUTIONS TO REPRODUCTIVE CONTROL  
OF THE HOLSTEIN HEIFERS  
IN THE PROVINCE OF LEÓN (SPAIN)”***

Memoria presentada por:

ANGEL FRANCISCO ALVAREZ BALDOR

para optar al grado de Doctor  
por la Universidad de León

León, Noviembre de 2015



Memoria de Tesis Doctoral presentada por  
Angel Francisco Álvarez Baldor

Y dirigida por los Drs.:

D. Marcelino Álvarez Martínez  
D. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina  
D. Miguel Angel Tesouro Díez



*"El ojo clínico en nuestra profesión,  
es la suma de conocimientos más  
una cierta agudeza mental".*

*Juan Abascal Mazorra  
Maestro veterinario*

***A Begoña, mi mujer, por su cariño y paciencia.***

***A Víctor, Jorge y Raúl, mis hijos.***

***A mis padres Angel (†) y Rosi por su gran  
esfuerzo para que yo estudiara.***



## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Miguel Ángel Tesouro Díez, por su apoyo y dedicación permanentes. De él partieron tanto el diseño como la orientación de este trabajo. Ha sido tan buen director como amigo.

Al Dr. D. Marcelino Álvarez Martínez por su amistad y confianza.

Al Dr. D. Juan Carlos Domínguez Fernández-Tejerina por su apoyo incondicional en momentos difíciles.

A Rubén Iglesias Álvarez "Candás", mi compañero de trabajo por haberme aguantado todo este tiempo.

A Fernando González de Juan, por su amistad y su total disponibilidad en los momentos en que he necesitado su ayuda.

A Ismael Villar Gómez, por haberme introducido sabiamente en el mundo de la reproducción bovina.

A José Luis Díaz-Palacios Castanedo, "el auténtico", por su apoyo y amistad en mis comienzos en la profesión.

A Ángel Revilla y Paco Pfizer, por su apoyo y por darme el *capricho* de La Cavada.

A Eugenio Fernández Ruíz y José Gutiérrez Pérez, por compartir amistad y profesión.

A los ganaderos de AFRIVEPA, por su paciencia.

Finalmente, a todas las personas que, de manera directa o indirecta, han hecho posible la realización de este trabajo.







## ***ÍNDICE GENERAL***

<b>Índice general</b> .....	<b>I</b>
<b>Glosario y abreviaturas</b> .....	<b>VII</b>
<b>Listado de Figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Listado de Tablas</b> .....	<b>XI</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1.- BASES FISIOLÓGICAS DE LA REPRODUCCIÓN EN LA VACA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1.1.- Inicio de la capacidad reproductiva</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1.2.- Fases/etapas del ciclo estral</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.3.- Regulación hormonal del ciclo estral</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.4.- Crecimiento folicular y ovulación</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.5.- Formación y destrucción del cuerpo lúteo</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.6.- Diferencias entre el ciclo estral de novillas y vacas en lactación de raza Holstein</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2.- MANEJO REPRODUCTIVO DEL GANADO VACUNO DE LECHE</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.1.- Inseminación artificial</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.2.- Protocolos para inducción/sincronización de celo/ovulación</b> . .....	<b>36</b>
▪ <b>Protocolos a de progesterona</b> . .....	<b>37</b>

▪	Protocolos que combinan progesterona y estrógenos.....	38
▪	Protocolos a base de prostaglandina $F_{2\alpha}$ .....	40
▪	Protocolos basados en la combinación de GnRH y $PGF_{2\alpha}$ .....	42
▪	Variantes de los protocolos tradicionales a base de GnRH y de $PGF_{2\alpha}$ .....	48
▪	Otras alternativas complementarias al método Ovsynch.....	54
▪	Protocolos que combinan progesterona (PRID <sup>®</sup> /CIDR <sup>®</sup> ), GnRH y $PGF_{2\alpha}$ .....	56
<b>2.2.3.- Particularidades del manejo reproductivo de las novillas de reposición del ganado vacuno lechero. ....</b>		<b>60</b>
▪	Protocolos de inducción/sincronización de la ovulación .....	61
▪	Resincronización de novillas no gestantes después de la primera IA.....	69
<b>2.2.4.- Diagnóstico de gestación .....</b>		<b>70</b>
<b>2.3.- FACTORES QUE AFECTAN A LA FERTILIDAD DE LAS NOVILLAS.</b>		<b>72</b>
<b>2.3.1.- El estrés por calor .....</b>		<b>73</b>
<b>2.3.2.- Manejo y técnica de la inseminación artificial .....</b>		<b>74</b>
<b>2.3.3.- Calidad del semen y fertilidad de los sementales.....</b>		<b>76</b>
<b>2.3.4.- Factores del ciclo estral que afectan a la fecundación y a la supervivencia del embrión. ....</b>		<b>77</b>
▪	Duración del proestro y la maduración del folículo.....	78
▪	Mantenimiento y grado de funcionamiento del cuerpo lúteo .....	81
<b>2.4.- SEMEN SEXADO.....</b>		<b>83</b>
<b>2.4.1.- Características del semen sexado .....</b>		<b>84</b>
<b>2.4.2.- Utilización del semen sexado .....</b>		<b>85</b>
<b>2.4.3.- Procedimiento de obtención del semen sexado: clasificación de los espermatozoides X e Y.....</b>		<b>86</b>
<b>2.4.4.- Obtención del semen sexado "Tecnología Sexing Beltsville Sperm" .....</b>		<b>88</b>

<b>2.4.5.- Inconvenientes del semen sexado .....</b>	<b>92</b>
<b>2.4.6.- La fertilidad del semen sexado frente al semen convencional .....</b>	<b>93</b>
<b>2.4.7.- Validación del semen sexado en novillas de leche .....</b>	<b>94</b>
<b>2.4.8.- Utilización del semen sexado en las granjas lecheras ....</b>	<b>96</b>

### **Capítulo 3**

<b>3.- JUSTIFICACIÓN, PLAN DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>101</b>
---	------------

### **Capítulo 4**

#### **4.- ESTUDIO CLÍNICO 1:**

**"OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO OVSYNCH (GPG) EN NOVILLAS FRISONAS /HOLSTEIN, MEDIANTE LA SELECCIÓN DE LAS NOVILLAS A INSEMINAR" 107**

<b>4.1.- RESUMEN .....</b>	<b>107</b>
<b>4.2.- SUMMARY .....</b>	<b>109</b>
<b>4.3.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>111</b>
<b>4.4.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>114</b>
<b>4.5.- RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>117</b>
<b>4.5.1.- Resultados Grupo A. ....</b>	<b>117</b>
<b>4.5.2.- Resultados Grupo B. ....</b>	<b>117</b>
<b>4.5.3.- Comparación de los resultados.....</b>	<b>119</b>
<b>4.6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>122</b>

### **Capítulo 5**

#### **5.- ESTUDIO CLÍNICO 2:**

**"PORCENTAJES DE FECUNDIDAD EN NOVILLAS DE LECHE: COMPARACIÓN DE DISTINTOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN/SINCRONIZACIÓN DEL CELO FRENTE AL CELO NATURAL" .....**

<b>5.1.- RESUMEN .....</b>	<b>125</b>
----------------------------	------------

<b>5.2.- SUMMARY</b> .....	127
<b>5.3.- INTRODUCCIÓN</b> .....	129
<b>5.4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	131
<b>5.4.1.- Materiales y métodos: Ensayo Clínico 1</b> .....	131
<b>5.4.2.- Materiales y métodos: Ensayo Clínico 2</b> .....	135
<b>5.5.- RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	138
<b>5.5.1.- RESULTADOS DEL ENSAYO CLINICO 1</b>	
▪ Resultados Grupo 1. ....	138
▪ Resultados Grupo 2 .....	138
▪ Resultados Grupo 3 .....	139
▪ Comparación de los resultados. ....	140
<b>5.5.2. RESULTADOS ENSAYO CLÍNICO 2</b> .....	143
▪ Resultados Grupo 4. ....	143
▪ Comparación de los resultados. ....	145
<b>5.5. CONCLUSIONES</b> .....	147

## Capítulo 6

### 6.- ESTUDIO CLÍNICO 3:

**“VALORACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE SEMEN SEXADO EN LA INSEMINACIÓN DE NOVILLAS FRISONAS: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CELO NATURAL Y CON DISTINTOS PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN/ SINCRONIZACIÓN DE CELO/OVULACIÓN”** .....

.....	151
<b>6.1.- RESUMEN</b> .....	151
<b>6.2.- SUMMARY</b> .....	152
<b>6.3.- INTRODUCCIÓN</b> .....	154
<b>6.4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	155
<b>6.4.1.- Novillas</b> .....	155
<b>6.4.2.- Método reproductivo</b> .....	157
<b>6.4.3.- Semen sexado</b> .....	160
<b>6.4.4.- Inseminación artificial</b> .....	161

6.4.5.- Diagnóstico de gestación .....	161
6.4.6.- Partos e incidencias .....	162
6.4.7.- Análisis y estudio estadístico de los resultados .....	162
<b>6.5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>163</b>
6.5.1.- Porcentaje de fecundidad global .....	163
6.5.2.- Porcentaje de fecundidad según manejo reproductivo .....	163
6.5.3.- Comparación de los porcentajes de fecundidad del semen sexado y el semen convencional. ....	166
6.5.4.- Porcentajes de fecundidad según granja.....	168
6.5.5.- Porcentajes de fecundidad según número de IA.....	169
6.5.6.- Porcentaje de fecundidad según semental utilizado en la IA .....	170
6.5.7.- Sexo de la descendencia .....	173
6.5.8.- Viabilidad de la descendencia: abortos y nacidos muertos. ....	177
<b>6.4.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>178</b>

## **Capítulo 7**

<b>7.- DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>181</b>
<b>7.1.- OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO OVSYNCH (GPG) EN NOVILLAS FRISONAS/HOLSTEIN, MEDIANTE LA SELECCIÓN DE LAS NOVILLAS A INSEMINAR.....</b>	<b>182</b>
<b>7.2.- PORCENTAJES DE FECUNDIDAD EN NOVILLAS DE LECHE: COMPARACIÓN DE DISTINTOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN /SINCRONIZACIÓN DEL CELO FRENTE AL CELO NATURAL.....</b>	<b>187</b>
<b>7.3.- VALORACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE SEMEN SEXADO EN LA INSEMINACIÓN DE NOVILLAS FRISONAS: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CELO NATURAL Y CON DISTINTOS PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN/SINCRONIZACIÓN DE CELO/OVULACIÓN.....</b>	<b>191</b>

<b>7.4.- ESTRATEGIAS A DESARROLLAR EN EL CONTROL REPRODUCTIVO DE LAS NOVILLAS DE NUESTRAS GRANJAS. ....</b>	<b>196</b>
---	------------

## **Capítulo 8**

<b>8.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>207</b>
-------------------------------	------------

## **Capítulo 9**

<b>9.1.- RESUMEN .....</b>	<b>213</b>
----------------------------	------------

<b>9.2.- SUMMARY.....</b>	<b>219</b>
---------------------------	------------

## **Capítulo 10**

<b>10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>227</b>
---	------------



## ***GLOSARIO Y ABREVIATURAS***

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **ADSA:** American Dairy Science Association
- **AFRIVEPA:** Asociación Frisona Vega-Páramo
- **AINE:** Antiinflamatorio no esteroideo.
- **AM:** Por la mañana
- **CIDR® :** Acrónimo de "Controlled internal Drug Release"
- **CL:** Cuerpo lúteo
- **CN:** celo natural
- **CONAFE:** Confederación nacional de Frisona española.
- **C-R:** Cría-Recría.
- **DG:** Diagnóstico de gestación
- **eCG:** Gonadotropina coriónica equina. Antes PMSG.
- **FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos.
- **FM:** Flunixin Meglumine.
- **FSH:** Hormona folículo estimulante
- **GH:** Somatotropina u hormona del crecimiento
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas.
- **GPG:** ovsynch (GnRH-Prostaglandina-GnRH)
- **G 6 G:** Programa de sincronización (PR-GnRH-6 días-GPG estándar)
- **HDL:** Lipoproteínas de alta densidad
- **IA:** Inseminación artificial
- **IATF:** Inseminación artificial a tiempo fijo.
- **IGF-I:** Factor de crecimiento Insulina tipo I
- **IM:** Intramuscular.
- **ICSH:** Hormona estimulante de las células intersticiales
- **LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.
- **LH:** Hormona luteinizante
- **MAP:** acetato de medroxiprogesterona.

- **MGA:** Acetato de melengestrol.
- **MSD:** Acrónimo de Merck Sharp Dohme.
- **n:** Tamaño muestra.
- **NO:** Óxido nítrico.
- **OD:** Ovario derecho.
- **OI:** Ovario izquierdo.
- **p:** Probabilidad.
- **pLH:** LH porcina.
- **pm:** Por la tarde.
- **PMSG:** Gonadotropina suero yegua gestante. Tiene predominante actividad folículo estimulante (FSH).
- **PR:** Prostaglandina.
- **PRID:** Dispositivo intravaginal liberador de progesterona.
- **PGF<sub>2α</sub>:** Prostaglandina F<sub>2α</sub>.
- **P:** Preñada.
- **SC:** Subcutáneo.
- **U.I.:** Unidades internacionales.
- **%F = (P/IA) x100** Porcentaje de fecundidad (novillas gestantes/novillas inseminadas).
- **%G = (P/totales o tratadas) x100.** Porcentaje de gestación.
- **%S = (celo/tratadas) x100.** Porcentaje de sincronización.
- **USDA:** Acrónimo de United States Department of Agriculture.

## ***LISTADO DE FIGURAS***

### **Capítulo 2**

**Figura 2.1.1** Etapas del ciclo estral de la vaca y su duración (Elli, 2009).

**Figura 2.1.2.** Hormonas implicadas en el ciclo estral (Elli, 2009).

**Figura 2.1.3.** Fase folicular (Fernández Sánchez, 2008).

**Figura 2.1.4.** Esquema de la foliculogénesis y ovulación en el ciclo estral (de 2 ondas foliculares)

(Adams et., al. 2008).

**Figura 2.1.5.** Fase luteínica (Fernández Sánchez, 2008).

**Figura 2.2.1.** Esquema y ejemplo de calendario del protocolo CRESTAR<sup>®</sup> para vacas.

**Figura 2.2.2.** Esquema y ejemplo de calendario del protocolo Ovsynch. Adaptado de Pursley et al., (1995).

**Figura 2.2.3.** Esquema y ejemplo de calendario del protocolo Co-Synch. Adaptado de Geary y Whittier (1998).

**Figura 2.2.4.** Esquema y ejemplo de calendario del protocolo Pre-Synch-Ovsynch. Adaptado de Moreira et al., (2001).

**Figura 2.2.5.** Esquema y ejemplo de calendario del protocolo denominado G6G. Adaptado de Bello et al., (2006).

**Figura 2.2.6** Esquema y ejemplo de calendario de tratamientos del protocolo denominado Doble Ovsynch. Adaptado de Souza et al., (2008).

**Figura 2.2.7** Esquema y ejemplo de calendario del protocolo CIDR<sup>®</sup>/Co-Synch 56 opción 1 (Domínguez et al., 2008).

**Figura 2.2.8.** Esquema del protocolo CRESTAR<sup>®</sup> para novillas.

**Figura 2.2.9.** Esquema del protocolo Ovsynch para novillas.

**Figura 2.2.10.** Esquema del protocolo Co-Synch/Dispositivo Intravaginal Progesterona 56 horas. Opción 2 (Domínguez et al., 2008).

**Figura 2.2.11.** Esquema del protocolo Co-Synch modificado de 5 días, con la adición de un dispositivo de progesterona (Bridges et al., 2008).

**Figura 2.4.1.** Esquema de la obtención de semen sexado. (Velasco, 2011).

## **Capítulo 5**

**Figura 5.1.** Tratamiento sincronización grupo 1: Protocolo Crestar<sup>®</sup>.

**Figura 5.2.** Tratamiento sincronización grupo 2: Método Ovsynch (GPG).

**Figura 5.3.** Tratamiento sincronización grupo 4. Método CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56-opción 2.

## **Capítulo 6**

**Figura 6.1.** Modelo de ficha de recogida de datos.

**Figura 6.2.** Tratamiento sincronización grupo B: Método Ovsynch (GPG).

**Figura 6.3.** Tratamiento sincronización grupo C: CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-opción 2.

**Figura 6.4.** Distribución de los porcentajes de fecundidad según granja.

**Figura 6.5.** Distribución en valores absolutos del sexo de la descendencia y la viabilidad de la misma según el método empleado en el manejo reproductivo.

## ***LISTADO DE TABLAS***

### **Capítulo 2**

**Tabla 2.2.1.** Medicamentos con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  comercializados en España a fecha de octubre 2015.

**Tabla 2.2.2.** Medicamentos con GnRH comercializados en España a fecha de octubre 2015.

### **Capítulo 4**

**Tabla 4.1.** Resultados obtenidos en las novillas de los grupos A y B y resultados estadísticos de la comparación entre los porcentajes de fecundidad (%F).

### **Capítulo 5**

**Tabla 5.1.** Porcentajes de sincronización (%S), de fecundidad (%F) y de gestación (%G) obtenidos en los grupos 1, 2 y 3.

**Tabla 5.2.** Resultados estadísticos de la comparación de los porcentajes de fecundidad (%F) entre los tres grupos.

**Tabla 5.3.** Resultados estadísticos de la comparación de los porcentajes de sincronización (%S) entre los grupos 1 y 2.

**Tabla 5.4.** Resultados estadísticos de la comparación de los porcentajes de gestación (%G) entre los tres grupos (\* Valores estimados, considerando el 80% de celos detectados).

**Tabla 5.5.** Resultados Porcentaje fecundidad (%F) Grupo 4.

**Tabla 5.6.** Resultados estadísticos de la comparación de los Porcentajes fecundidad (%F) entre el grupo 4 y los grupos 1, 2 y 3.

**Tabla 5.7.** Resultados estadísticos de la comparación de los Porcentajes de gestación (%G) entre el grupo 4 y los grupos 1,2 y 3. (\* Valores estimados, considerando el 80% de celos detectados).

## **Capítulo 6**

**Tabla 6.1.** Distribución de los resultados del diagnóstico de gestación (DG) según el método de reproducción.

**Tabla 6.2.** Distribución de los resultados del diagnóstico de gestación (DG) en función del número de IA al que fue sometida la novilla.

**Tabla 6.3.** Relación de los porcentajes de fecundidad y otros parámetros reproductivos según sementales empleados en la IA.

**Tabla 6.4** Tabla de asociación estimada a partir de las tasas obtenidas de hembras nacidas en función del tipo de semen utilizado.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**





## **1.- INTRODUCCIÓN**

---

Desde los años 70 del siglo pasado, tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados, el consumo de alimentos ha ido incrementándose exponencialmente como consecuencia del aumento poblacional en el mundo. Esta alta demanda sostenida no sólo exige cantidad, sino también calidad.

La fuerte tendencia hacia el consumo de alimentos de calidad ha llevado a aumentar rápidamente la población bovina mundial de leche y carne, como fuente de la industria alimentaria desarrollada en estas últimas décadas. Todo esto ha contribuido a un progresivo cambio en la estructura productiva y en la gestión técnica de las granjas, incorporando actuaciones a todos los niveles (alimentación, manejo, instalaciones, reproducción, sanidad etc.).

El acontecimiento que abrió las puertas hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías reproductivas y su aplicación comercial fue la criopreservación exitosa del semen, a mediados del siglo XX. Hasta entonces la inseminación artificial (IA) se realizaba a través de la dilución del semen y su aplicación en fresco. Una década más tarde se publicaron las primeras experiencias con buenos resultados utilizando semen congelado en glicerol, lo que facilitó el uso masivo de sementales seleccionados y el comercio internacional de germoplasma.

De esta forma, la IA se ha convertido en una de las técnicas más importantes para la mejora genética del ganado vacuno lechero. Casi el 80% de los productores de leche de Estados Unidos utilizan la IA, en comparación con sólo el 4% de los productores de carne (Colazo et al. 2014).

En la actualidad, una amplia mayoría, por no decir la práctica totalidad de los ganaderos de vacuno de leche en nuestro País, utilizan la inseminación

artificial (IA) en el manejo reproductivo. Esta práctica requiere la detección del celo, que además de precisar tiempo y de estar sujeta a errores, no resulta fácil o posible en todos los casos.

Una detección de celo en torno al 80% sería considerada como muy buena (Domínguez, 2009); sin embargo esta cifra se alcanza difícilmente ya que está sujeta a factores de los propios animales, de la personas que los cuidan y de influencias ambientales; así en países con amplia tradición ganadera, tales como Estados Unidos y Canadá, la eficacia de detección de celo en los rebaños de vacuno de leche no alcanza el 50% (Colazo et al. 2014). La mala o inadecuada detección de celo es la principal causa de la pérdida de eficiencia reproductiva de la IA. Ineficiencia que suele acentuarse en las novillas de reposición, las que ocupan unas instalaciones generalmente más alejadas y menos vigiladas, que las vacas en producción.

El desarrollo de métodos de IA a tiempo fijo (IATF), a partir de la manipulación artificial del ciclo estral y la ovulación, han proporcionado respuesta a esta necesidad de detectar los celos, haciendo posible aplicar programas de IA a todas las vacas, muestren o no celo. Hoy en día los programas de IATF se han convertido en una parte integral del manejo reproductivo de muchas granjas de vacuno de leche en los países desarrollados.

La importancia de la cría de novillas de reposición supone un capítulo importante en las inversiones de una explotación (Doblas y Ruiz, 2015a). En cuanto a costes por litro de leche, la reposición representa el 15-20%, después de la alimentación (53%) y seguido por la mano de obra (17%) y amortización y conservación (10%), completando esta estructura la medicación y desinfección (4,8%), la energía (4%), veterinario (2%) y los gastos financieros (2%) (Domínguez et al, 2008).

Por tanto, la reposición representa la segunda partida en los costes de producción en una explotación de vacuno de leche, por lo que resulta imprescindible un buen manejo de la **cría-recría** (CR) de las novillas.

La **fase de cría** es el periodo desde el nacimiento hasta del destete, hacia el segundo-tercero mes de vida, y la **fase de recría** es el periodo que le sigue hasta el parto. En este segundo periodo el crecimiento de las futuras vacas debe ser modulado o controlado para evitar deposiciones altas de grasa, especialmente en la ubre.

Una correcta secuencia de ternera-becerra-novilla es una de las premisas fundamentales en el funcionamiento de las granjas lecheras. Tengamos en cuenta que el porcentaje de reposición anual de novillas lecheras en primera lactación se encuentra comprendido en la actualidad entre el 21% y 33% anual (Margerison, 2004 citado por Álvarez Nogal, 2008), siendo las causas más frecuentes de este hecho, los consabidos problemas de la ubre, cojeras, etc., pero destacando que la principal causa es sin duda, tal como han constatado otros autores, el bajo rendimiento reproductivo (Durr et al, 1997).

El control de los factores que influyen tanto la vida productiva como reproductiva de las novillas, tras su primer parto, para expresar todo su potencial lechero, es un modo de contener o disminuir los porcentajes de reposición y de ampliar, simultáneamente, el índice de longevidad del rebaño (Álvarez Nogal, 2008). La capacidad productora de leche de las novillas está influida en primer término por el grado y evolución de su desarrollo mamario (Sejrsen, 2005) y en segundo lugar por el desarrollo corporal alcanzado al primer parto dado que condiciona la capacidad de ingesta voluntaria y por tanto de energía (Lee, 1997). Podemos decir que el éxito productivo de la novilla depende de un modelo de crecimiento desde su nacimiento hasta el primer parto, que puede controlarse de acuerdo con una cronología de edades (pubertad, inseminación y parto). Este

desarrollo somático debe estandarizarse mediante el control de la ganancia media diaria de peso, así como con medidas zoométricas como puede ser la alzada o el perímetro torácico.

Las repercusiones económicas en las deficiencias tanto de manejo como de alimentación durante la fase de cría y recría de la novilla son evidentes, no solamente por el valor absoluto del coste de amortización de cada novilla, que se elevan a 1.712 euros de media (también depende del valor genético en cuanto a su potencial de producción de leche), sino también por el momento en que comienzan su gestación (óptimo 15 meses) y el momento en que se produce el primer parto (óptimo 24 meses) (Doblas y Ruiz, 2015b). En términos de amortización real por litro de leche producido en la granja el mencionado autor determina que varía entre 0,043 euros y 0,069 euros para el grupo de granjas de alta producción y baja producción, respectivamente.

Otras facetas de interés con evidentes implicaciones económicas son el retraso en la aparición de la pubertad y la relación que existe entre el inicio de la pubertad y la eficiencia reproductiva y productiva de la novilla.

Podemos dividir el período CR en cuatro fases sucesivas bien diferenciadas:

- Fase 1.- Crecimiento inicial (90 primeros días de vida), donde interesa garantizar una ganancia de peso media de 820 gramos diarios, a base de leche hasta el destete y posteriormente con piensos de arranque hasta los 90 días de vida.
- Fase 2.- Desde el destete hasta los 6-7 meses. Deberán alcanzar un peso equivalente al 30% del peso adulto (en torno a los 200 Kg). La ganancia de peso es muy elevada (0.9-1.1Kg/día). Prácticamente se puede recurrir al suministro de la misma ración que la que reciben las vacas en lactación, o

al suministro de piensos de crecimiento *ad libitum* junto con paja o heno de gramíneas.

- Fase 3.- Hasta el año de edad, siendo considerado como el período de recría propiamente dicho. La ganancia de peso de ser controlada (750 gr/día) para evitar el engrasamiento de la ubre. Durante este periodo se sientan las bases de la futura capacidad lechera de la ubre de la novilla, toda vez que durante este intervalo de tiempo el crecimiento de la ubre es superior (alométrico) al del resto del cuerpo. Está comprobado (Sejrsen et al, 1982, 1998) que la sobrealimentación durante esta fase produce una notable infiltración grasa de la ubre en perjuicio de su capacidad productora durante la primera y sucesivas lactaciones. Se deben emplear altos niveles de forraje en la dieta para favorecer la capacidad digestiva y de ingesta.
- Fase 4.-De los 12 meses a la IA (14-15 meses). Se recupera un nivel energético más elevado y se mantienen los altos niveles de forraje en la dieta. En esta fase se alcanza la pubertad, a través de mecanismos neuroendocrinos, no completamente conocidos y que se detallaran en la revisión bibliográfica. La aparición de la pubertad está regulada en gran medida por la edad y el peso, aunque estos dos factores varían, obviamente, de acuerdo con la raza, la línea genética, el medio ambiente, la nutrición, etc. Debemos programar la primera inseminación de la novilla como muy tarde a los 15 meses, de forma y manera que haya adquirido un 55-60% del peso adulto (350 kg), una altura a la cruz de 120-130 cm y un área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup> (Domínguez et al, 2008).

Una vez que la novilla está gestante se debe evitar su sobreengrasamiento, con el fin de que en el momento del parto tenga el 82-90% del peso vivo adulto. Representa el segundo periodo alométrico de crecimiento mamario pero sin el peligro de la infiltración grasa del periodo anterior.

Por tanto, los objetivos de la recría son (Doblas y Ruiz, 2015 a):

- 1.- Crecimiento idóneo. La recría no es igual que el cebo. La altura adecuada es uno de los indicadores más empleados para controlar el crecimiento. La anchura del cuerpo, tanto del tórax como del abdomen, está relacionada con la capacidad lechera. La alta producción implica un nivel metabólico y, por tanto, respiratorio muy elevado, y una gran capacidad de ingesta de materia seca.
- 2.- Desarrollo de la ubre. El tejido glandular presenta un crecimiento isométrico desde el nacimiento hasta los 6 meses. Desde los 6 meses y hasta alrededor del año, la ubre acelera su crecimiento respecto al resto de los órganos (crecimiento alométrico). Para que este crecimiento se realice de forma correcta es necesario que el aporte energético a la novilla sea restringido, pues se corre el riesgo de que con un plano de alimentación alto, se engrase la ubre. En torno a los 12 meses, la ubre vuelve a un crecimiento isométrico con el resto del cuerpo y así lo mantendrá hasta el final de su crecimiento. Un correcto crecimiento de la ubre proporcionará una mayor capacidad lechera gracias al gran desarrollo del tejido glandular y una buena inserción de la misma.
- 3.- Vida productiva y producción: la conjunción de todas las características anteriores, permite alcanzar el objetivo de una más larga vida de las vacas, con lo que se pone el primer eslabón de la cadena de la eficiencia en la producción de leche.

La recría y manejo de las novillas es uno de aspectos menos atendidos y punto crítico de nuestras explotaciones, a pesar de que representan el 30% del efectivo y la genética más avanzada de la explotación. Los factores de riesgo que nos llevan a esta situación son los siguientes: mecanización del trabajo,

alojamientos alejados y deficientes, falta de concienciación del ganadero, mano de obra poco especializada con errores frecuentes en el manejo, especialmente en lo que se refiere a la alimentación, deficiente detección de celo, etc.

El periodo que pasa desde el nacimiento de una ternera hasta su primer parto aparentemente no reporta beneficios, pero la edad al primer parto es un factor de primera magnitud en el coste total de la reposición. Diferentes estudios han demostrado que el intervalo óptimo nacimiento-parto es de unos 24 meses (Ettema y Santos, 2004, Bach et. al., 2008, Domínguez et al., 2008). Edades más tempranas comprometen la producción láctea durante la primera lactación, la composición de la leche y los resultados reproductivos, por lo que la inseminación con sementales probados y de alto valor genético es aún más ventajosa que en vacas adultas.

Por ello se hace imprescindible tener un programa de control reproductivo que permita acercarnos al objetivo del primer parto a los 2 años, inseminando a las novillas, como antes hemos señalado, entre los 14 y 15 meses de vida, para lo cual es necesario que hayan adquirido al menos un 55% del peso adulto (350 kg), una altura a la cruz de 120-130 cm y un área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup>.

En este sentido, desde hace años venimos aplicando en el manejo de la reproducción en las granjas de nuestra cooperativa distintos protocolos de inducción/sincronización de celo/ovulación, tanto en vacas como en novillas.

Nuestro trabajo diario nos ha permitido experimentar con la amplia mayoría de los tratamientos hormonales a medida que estaban disponibles en el mercado, incrementando sucesivamente nuestra experiencia y resultados, algunas veces de forma más empírica y cotidiana, y en otras proponiéndonos la realización de algunos ensayos más controlados, como los que forman parte del trabajo presentado. Dichos ensayos fueron diseñados y realizados a lo largo de más de

una década, con el fin de poder valorar la eficacia de distintos protocolos de inducción/sincronización de celo/ovulación en novillas.

Recientemente la disponibilidad de semen sexado, en nuestro caso para obtener más cantidad de hembras en la descendencia, favorece el balance económico de las explotaciones, facilitando la reposición e incluso permitiendo hacer lotes para la venta. La valoración de esta nueva herramienta también constituye una parte importante de nuestro estudio, especialmente aplicada en las novillas.



## **CAPÍTULO 2**

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## **2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---

### **2.1.- BASES FISIOLÓGICAS DE LA REPRODUCCIÓN EN LA VACA**

#### **2.1.1.- Inicio de la capacidad reproductiva**

Una novilla adquiere la capacidad reproductiva cuando alcanza la madurez sexual o pubertad, la que habitualmente coincide en torno al año de edad. Los mecanismos neuroendocrinos implicados no son del todo precisos, siendo una de las hipótesis más aceptada, la denominada "gonadostato" (Gordon, 2004), por la cual el centro tónico hipotalámico que controla la secreción pulsátil de hormona luteinizante (LH) tendría una alta sensibilidad a los estrógenos, por lo que desde el nacimiento a la pubertad sólo funcionaría la actividad básica ovárica con pequeños crecimientos foliculares y su subsiguiente atresia. En la pubertad disminuye la sensibilidad a los estrógenos lo que ocasiona un cambio en las ondas pulsátiles de LH, incrementándose su frecuencia e intensidad, permitiendo que los folículos lleguen a preovulatorios y que se produzcan las ondas preovulatorias de LH que desencadenan la ovulación. Este cambio en la sensibilidad estrogénica del gonadostato está regulado en gran medida por la edad y el peso, aunque estos dos factores varían, obviamente, de acuerdo con la raza, la línea genética, el medio ambiente, la nutrición, etc.

También se ha puesto de manifiesto que el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) y la leptina están relacionadas con el inicio de la pubertad y con el desarrollo folicular. Ambos factores correlacionan el estado nutritivo corporal y la función reproductora. Se cree que la leptina actúa como señal periférica que indica la idoneidad del estado nutricional para la función reproductora. Las bajas concentraciones de leptina indican un estado de insuficiencia de reservas

nutricionales, que podrían contribuir a la prevención de gestaciones no adecuadas a estados de insuficiencia nutricional (Gordon, 2004).

Las hembras, después de la pubertad, a diferencia de los machos que producen gametos durante toda su vida, los reclutan de una población finita de ovocitos que se estableció durante su desarrollo embrionario. Esta población de ovocitos va a constituir la reserva ovárica para la vida reproductiva de la hembra, teniendo en cuenta tanto la cantidad de ovocitos (óvulos) como la calidad de los mismos.

En el nacimiento, una hembra ya presenta su capital folicular completo, no se forma ningún folículo nuevo después del nacimiento. La organización del "pool" ovárico de folículos primordiales, constituidos por un solo oocito rodeado de epitelio de revestimiento simple, se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario. Estos folículos primordiales representan la reserva de células germinales, de las cuales se desarrollarán los folículos destinados a crecer (Elli, 2009).

Para determinar esta reserva ovárica o número de ovocitos sanos se ha propuesto de forma novedosa la valoración plasmática de la hormona antimülleriana (AMH) (Ribeiro et al., 2013). Esta hormona secretada por los folículos ováricos refleja la capacidad reproductiva de una hembra y en el caso del ganado vacuno su valoración está siendo utilizada para la predicción de resultados en transferencia de embriones (TE), y en un futuro podría aplicarse a otras técnicas de biotecnología de la reproducción, en las que se precise conocer previamente el potencial reproductivo de la hembra (Pfeiffer et al., 2014).

### **2.1.2.- Fases/etapas del ciclo estral**

Como ha sido señalado, el comienzo de la actividad sexual tiene lugar en la pubertad o madurez sexual, que en la novilla comienza aproximadamente a los 12

meses de edad, y está estrechamente correlacionada con la actividad endocrina de los ovarios.

Antes de la pubertad los ovarios presentan continuamente y en sucesión el desarrollo de folículos primordiales hasta folículos cavitarios, que no tienen actividad hormonal y regresan en un tiempo breve y desaparecen.

En la pubertad se produce la maduración de un folículo, la aparición del primer celo o estro (receptividad sexual) y el animal está en condiciones de quedar gestante.

El ciclo ovárico se repite regularmente a intervalos de  $21 \pm 3$  días. En la especie bovina no presenta anestro estacional y continúa durante toda la vida sexual.

Este ciclo estral se interrumpe sólo durante la gestación o como consecuencia de condiciones medioambientales inusualmente estresantes y por causas patológicas. Una vez que se ha producido el parto, se reanuda después de unos 30 días y el primer celo es generalmente silencioso (Elli, 2009).

En función de la estructura dominante que está presente en el ovario, el ciclo estral se divide en dos fases: folicular y luteínica. En la **fase folicular** la estructura primaria presente en el ovario es un folículo dominante que produce estradiol. Esta fase es corta (20% del ciclo estral) y transcurre desde el momento de la regresión del cuerpo lúteo (CL) hasta la ovulación del folículo dominante. La **fase luteínica** es mucho más larga (80% del ciclo estral), donde la estructura dominante presente en el ovario es el CL que produce progesterona y transcurre desde el momento de la ovulación hasta la regresión del CL.

Las etapas del ciclo estral son subdivisiones de las dos fases anteriores (Figura 2.1.1), denominadas como proestro y estro dentro de la fase folicular y metaestro y diestro dentro de la fase luteínica.

El **proestro** precede al estro. Comienza cuando la secreción de progesterona disminuye como resultado de la luteolisis (regresión del CL) y dura aproximadamente 3 días (días 18-21 del ciclo estral). Dicha regresión del CL es producida por acción de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) el día 16, cesando la producción de progesterona. Dicha caída estimula al hipotálamo a liberar rítmicamente la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y esto hace que se libere la hormona folículo estimulante (FSH).

El **estro o celo** es el período de la receptividad sexual. Da inicio al ciclo ovárico y tiene una duración media entre 15-21 horas (con una amplitud entre 6-24 horas). El estradiol alcanza un nivel muy alto, mientras que la progesterona desciende a niveles mínimos. La ovulación se produce en un intervalo de tiempo entre 24 y 36 horas después del inicio del estro, debido a la alta influencia del estradiol. Dicho estradiol estimula la liberación de GnRH, que a su vez provoca la liberación a nivel hipofisiario de la hormona luteinizante (LH).

El **metaestro** es el período de formación del CL después de la ovulación, y tiene una duración de 2 a 5 días. Es el final de la fase folicular y el comienzo de la fase luteínica. En esta fase la concentración de todas las hormonas sexuales en sangre es mínima.

Por último, el **diestro** es la etapa más larga del ciclo estral (entre 10 y 14 días), transcurre desde el día 5 al 18 del ciclo ovárico y es el período en que el CL es completamente funcional y la concentración de progesterona es alta y termina con la regresión del CL (Senger, 2003).

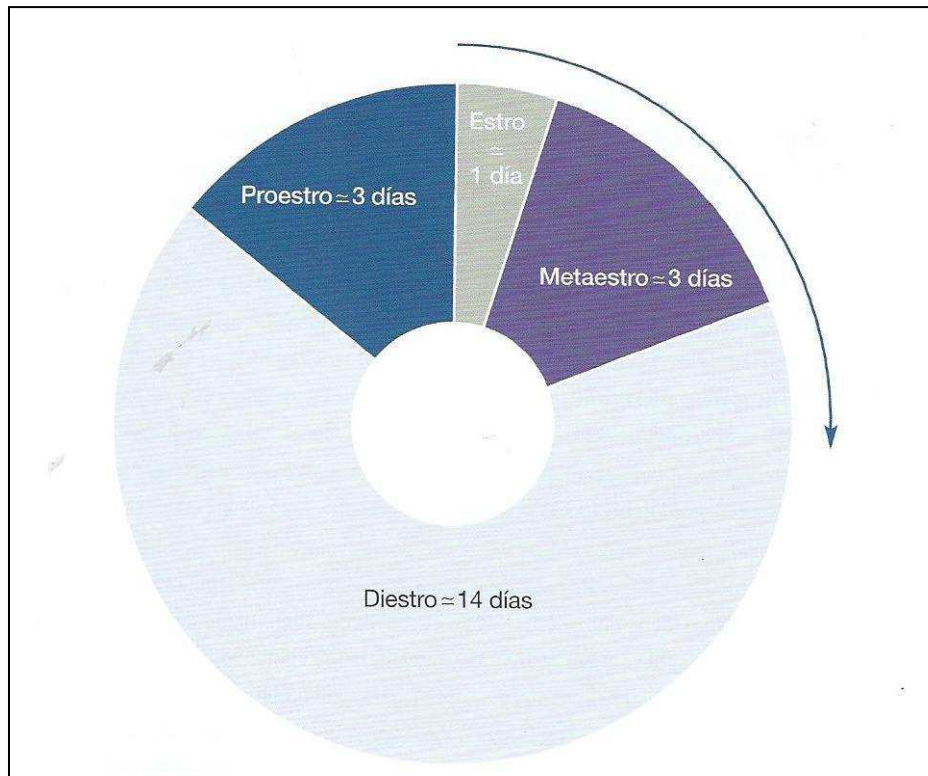


Figura 2.1.1 Etapas del ciclo estral de la vaca y su duración (Elli, 2009).

### 2.1.3.- Regulación hormonal del ciclo estral

El ciclo estral está regulado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Figura 2.1.2.). El hipotálamo segrega la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Las hormonas pituitarias o hipofisarias son la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), y las hormonas secretadas por el ovario son las hormonas esteroides: estradiol y progesterona

La **hormona liberadora de gonadotropina** (GnRH), es un decapeptido (de 92 aminoácidos) producido por las neuronas neurosecretoras cuyos axones terminales están situados en la eminencia media del hipotálamo. Es secretada al torrente sanguíneo, pero llega directamente a la hipófisis mediante el sistema vascular hipotálamo-hipófisis, una pequeña circulación con una estructura

particular de tipo portal. De esta forma evita la circulación general, donde habría sido diluida y en parte degradada en sustancias inactivas, pudiendo alcanzar la hipófisis en concentración elevada, aunque siempre del orden de ng/ml.

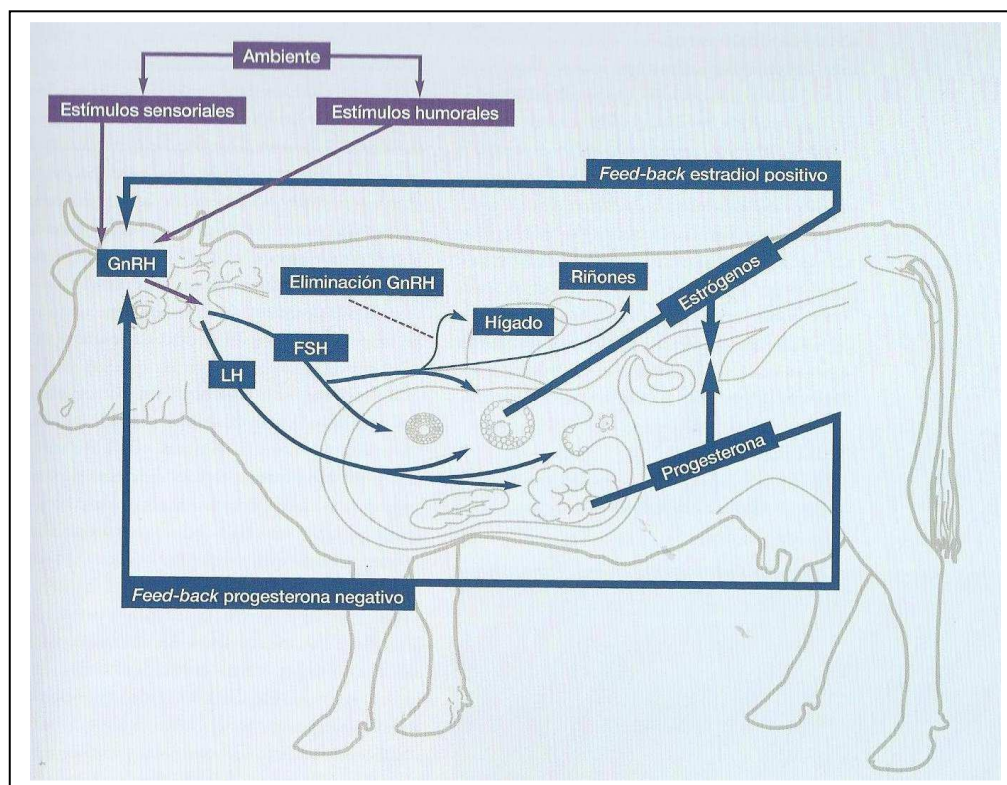


Figura 2.1.2. Hormonas implicadas en el ciclo estral (Elli, 2009).

Una vez en la hipófisis se une a receptores específicos en las células gonadotropas (luteotropas y foliculotropas) para inducir la liberación de LH y FSH, respectivamente, al torrente sanguíneo (Norman y Litwack, 1998) y así llegar a sus células dianas. La frecuencia del estímulo de la GnRH puede ser el principal regulador de la síntesis y secreción de las proporciones relativas de FSH y LH. Así los momentos con pulsos de GnRH de baja frecuencia conducen a la secreción preferencial de FSH y los momentos con pulsos con mayor frecuencia estimulan preferentemente la secreción de LH (Hadley, 2000). Los niveles de GnRH están regulados por mecanismos de retroalimentación gracias a los andrógenos y estrógenos liberados por las gónadas, que actúan en el hipotálamo rápidamente.



La secreción de GnRH es rítmica y pulsátil y se repite cada dos o tres horas durante la fase de maduración del folículo, y cada 15-20 minutos cuando está próxima la rotura del mismo.

Las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) son glicoproteínas compuestas de dos cadenas, subunidades alfa y beta. La subunidad alfa es idéntica dentro de las especies, mientras que la subunidad beta es estructuralmente distinta, proporcionando especificidad hormonal (Bousfield *et al.*, 1994).

El crecimiento de los folículos preovulatorios en el ovario depende tanto de la FSH como de la LH, las cuales actúan sinérgicamente. La secreción diferencial de las gonadotropinas en diversas etapas de crecimiento folicular está asociada con la iniciación y el crecimiento continuo de los folículos hacia la ovulación, o bien con la atresia, en las diferentes etapas de crecimiento. La FSH es importante para la iniciación y el crecimiento temprano de los folículos antrales, y la LH se vuelve más importante a medida que aumenta el desarrollo y la maduración de los folículos (Lucy *et al.*, 1992). El crecimiento folicular y 19-esteroidogénesis dependen de la acción coordinada de la FSH y la LH con sus receptores en las células de la granulosa y células de la teca de los folículos ováricos, respectivamente (Bao y Garverick, 1998).

La FSH induce la expresión del citocromo P450 aromatasa (P450arom) que convierte los andrógenos en estradiol en las células de la granulosa (Hillier *et al.*, 1994). Las células de la granulosa también expresan receptores de estradiol para amplificar las acciones globales de FSH (Richards, 1994).

Los receptores de la LH están presentes en células de la teca para inducir la síntesis de andrógenos, aunque receptores de la LH aparecen en las células de la granulosa en etapas posteriores del desarrollo del folículo. Los andrógenos se sintetizan en las células tecaes a través de la expresión específica de célula de

P450 17 alfa-hidroxilasa (P450c17), que está bajo control de la LH (Smyth *et al.*, 1993). Durante la oleada preovulatoria, la LH actúa directamente sobre células de la granulosa e inicia la luteinización, para inducir la síntesis y secreción de progesterona de las células de la granulosa que se transforman en pequeñas y grandes células luteínicas para convertirse en el CL después de la ovulación (Hadley, 2000).

El **estradiol** es un derivado del colesterol como lo son todas las hormonas esteroideas. Su producción se explica por la teoría de dos células-dos gonadotropinas, propuesta por Fortuna y Quirk (1988) y revisado por Hill *et al.*, (1994) (citado por Elli, 2009). Esta teoría afirma que células de la teca con receptores FSH y células de la granulosa con receptores LH tienen ambas el citocromo P450 de cadena lateral (P450scc), enzima necesaria para la conversión del colesterol a C-21 esteroides: pregnenolona o progesterona, precursores para la síntesis de la androstenediona en las células de la teca. La unión de la LH a su receptor en las células de la teca estimula la actividad de la citocromo P450c17 induciendo la conversión de C-21 esteroides en androstenediona. Este compuesto, es más tarde metabolizado en estradiol en las células de la granulosa por el citocromo P450arom, inducida por la unión de la FSH a sus receptores (Bao y Garverick, 1998). El estradiol y la FSH inducen la síntesis de receptores de LH en las membranas de las células de la granulosa durante las etapas posteriores del desarrollo folicular, y, en consecuencia, el estradiol aumenta su propia secreción (Richards, 1980).

La producción de estradiol aumenta en el folículo durante la fase preovulatoria y alcanza el pico más alto en el momento de la oleada de GnRH. Los principales efectos del estradiol, en las hembras con los órganos reproductores desarrollados, son permitir la fecundación de óvulos en el oviducto e inducir la receptividad sexual. En el sistema nervioso central (SNC), tiene un efecto negativo (la mayor parte del ciclo) por la estimulación tónica del centro tónico en el

hipotálamo (Hadley, 2000). En contraste, durante el período de proestro, el aumento de las concentraciones de estradiol con la disminución de progesterona después de la luteolisis aumentan la frecuencia del pulso de LH, culminando aún más en un gran aumento de LH preovulatorio (Adams *et al.*, 2008). El estradiol, actuando sinérgicamente con la progesterona induce el celo o estro conductual (Hafez y Hafez, 2000).

La **progesterona** es la principal hormona secretada por el cuerpo lúteo, deriva de la transformación del colesterol sanguíneo (LDL y HDL o lipoproteínas de baja y alta densidad, respectivamente). Los receptores para las lipoproteínas presentes en la célula luteal permiten la entrada del colesterol en la célula. Entonces éste es transformado en pregnenolona en las mitocondrias antes de ser convertido en progesterona por la 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3 $\beta$ -HSD) (Rekawiecki *et al.*, 2008; Elli, 2009).

La progesterona es la hormona de la gestación, siendo responsable de la preparación del tracto reproductivo para la implantación del cigoto y el posterior mantenimiento de la gestación. A nivel del SNC, la progesterona inhibe la secreción de gonadotropina hipofisaria por su acción a nivel del hipotálamo; por lo tanto, inhibe el desarrollo folicular (Hadley, 2000).

La producción de la progesterona es cuantitativamente elevada en relación con el peso del tejido que la produce: el cuerpo lúteo de la vaca, de unos 5-6 gramos, sintetiza una media de 200 mg de progesterona en 24 horas. Dicha síntesis es realizada por las células luteales.

Es necesaria una acción preliminar del estradiol para la actividad de la progesterona, la cual interviene sobre todos los tejidos implicados en la regulación sexual de la hembra. Así la progesterona, inhibe la ovulación con una acción permisiva sobre la reanudación del crecimiento folicular al final del período luteal,

condiciona el descenso del embrión en el interior del oviducto, asegura la preparación del útero para la recepción del embrión y el inicio de la gestación. Por la adaptación de la mucosa uterina y la inhibición de la contractibilidad del miometrio que conlleva, esta hormona representa un factor esencial en el inicio y en la regulación de la gestación, ya que modifica las características del moco cervical, provoca la producción de moco en el epitelio vaginal y participa en el desarrollo de la glándula mamaria ejerciendo una acción hiperplásica sobre los acinis glandulares.

La progesterona es necesaria para el mantenimiento de la gestación. En la vaca, la placenta sustituye al CL en la producción de progesterona, entre el día 50 y el día 200 de la gestación. La caída de la progesteronemia al final del ciclo condiciona, directa o indirectamente, la secreción de las gonadotropinas hipofisarias de las que depende la maduración folicular, la ovulación y la reanudación de un nuevo ciclo (Elli, 2009).

#### **2.1.4.- Crecimiento folicular y ovulación**

La foliculogénesis es el proceso de maduración del folículo ovárico, una estructura compuesta por células de la granulosa que rodea el ovocito y dentro de la cual se desarrolla la ovogénesis o división meiótica del ovocito (Figura 2.1.3).

Hay dos etapas de desarrollo del folículo antral en el ovario. En primer lugar, una etapa "lenta", fase de crecimiento que tiene más de 30 días de duración, en la que los folículos de 300 micras alcanzan un crecimiento de hasta 3-5 mm de diámetro. La segunda fase de crecimiento "rápido" sólo suele durar de 5 a 7 días, y por lo general se describe como una onda folicular (Busier *et al.*, 1987).

En la especie bovina, la dinámica del ovario se caracteriza por dos o tres ondas foliculares consecutivas por cada ciclo estral (Sabio *et al.*, 1988; Sirios y Fortuna, 1988; Gunter *et al.*, 1989a). Cada onda involucra el crecimiento repentino, en el plazo de 2-3 días, de una cohorte de pequeños folículos (Figura 2.1.4). La tasa de crecimiento es similar entre los folículos de la onda durante aproximadamente los dos primeros días. A partir de este momento, sucede la selección de un folículo dominante, que sigue creciendo y madurando en la etapa preovulatoria, mientras que el resto (folículos subordinados) sufren una atresia por apoptosis (Austin *et al.*, 2001) (Adams *et al.*, 2008). El **reclutamiento** es el proceso mediante el cual una cohorte, de entre 8 a 41 folículos, comienza a madurar por la acción de la FSH. La **selección** es el proceso mediante el cual un folículo evita la atresia y sufre más desarrollo y se convierte en competente (folículo de Graf) para lograr una ovulación oportuna. El folículo dominante, es el que posee en un primer momento más receptores de FSH, hasta se vuelve independiente de la hormona FSH (es entonces autosuficiente), aumenta al doble su vascularización y comienza a secretar más inhibina-A y estrógenos que el resto de los folículos, inhibiendo de esa forma la producción de FSH por parte de la hipófisis y, por tanto, inhibiendo el crecimiento del resto de los folículos. La **dominación** es el proceso por la cual un único folículo alcanza y mantiene su dominio sobre los otros folículos reclutados, que se someten a la atresia (Hodgen, 1982).

El comienzo de la selección en las tasas de crecimiento de los folículos más grandes se produce con 2,8 días de media, cuando el diámetro medio del futuro folículo dominante es de 8,5 mm y el diámetro medio del mayor folículo subordinado es 7,2 mm (Ginther *et al.*, 1996). Si el animal está en la fase luteal del ciclo estral (diestro), entonces el folículo dominante alcanza su tamaño máximo (12 a 20 mm) y se mantiene durante 3 a 6 días antes de someterse a atresia (Ginther *et al.*, 1989b; Knopf *et al.*, 1989), lo que permite otro aumento de FSH y la emergencia de una nueva onda folicular. El folículo dominante de la

primera onda (para los ciclos de dos ondas) y de la primera y segunda ondas (en ciclos de tres ondas), se someten a atresia.

Si la regresión luteal se produce (en el principio del proestro) durante la fase de crecimiento del folículo dominante (bien de la segunda o tercera onda), entonces el folículo dominante responde a la disminución en la progesterona circulante, que provoca un aumento de la GnRH y el posterior aumento de la frecuencia de impulsos LH. El folículo segrega estradiol suficiente que a su vez provoca un aumento del cociente LH/FSH y ovula después del estro (Fortune, *et al.*, 2001). No obstante, el folículo dominante de cualquier onda folicular, incluyendo la primera, puede ovular si las condiciones endocrinas apropiadas concurren para inducir la luteolisis durante su mandato de dominancia (Kastelic *et al.*, 1990).

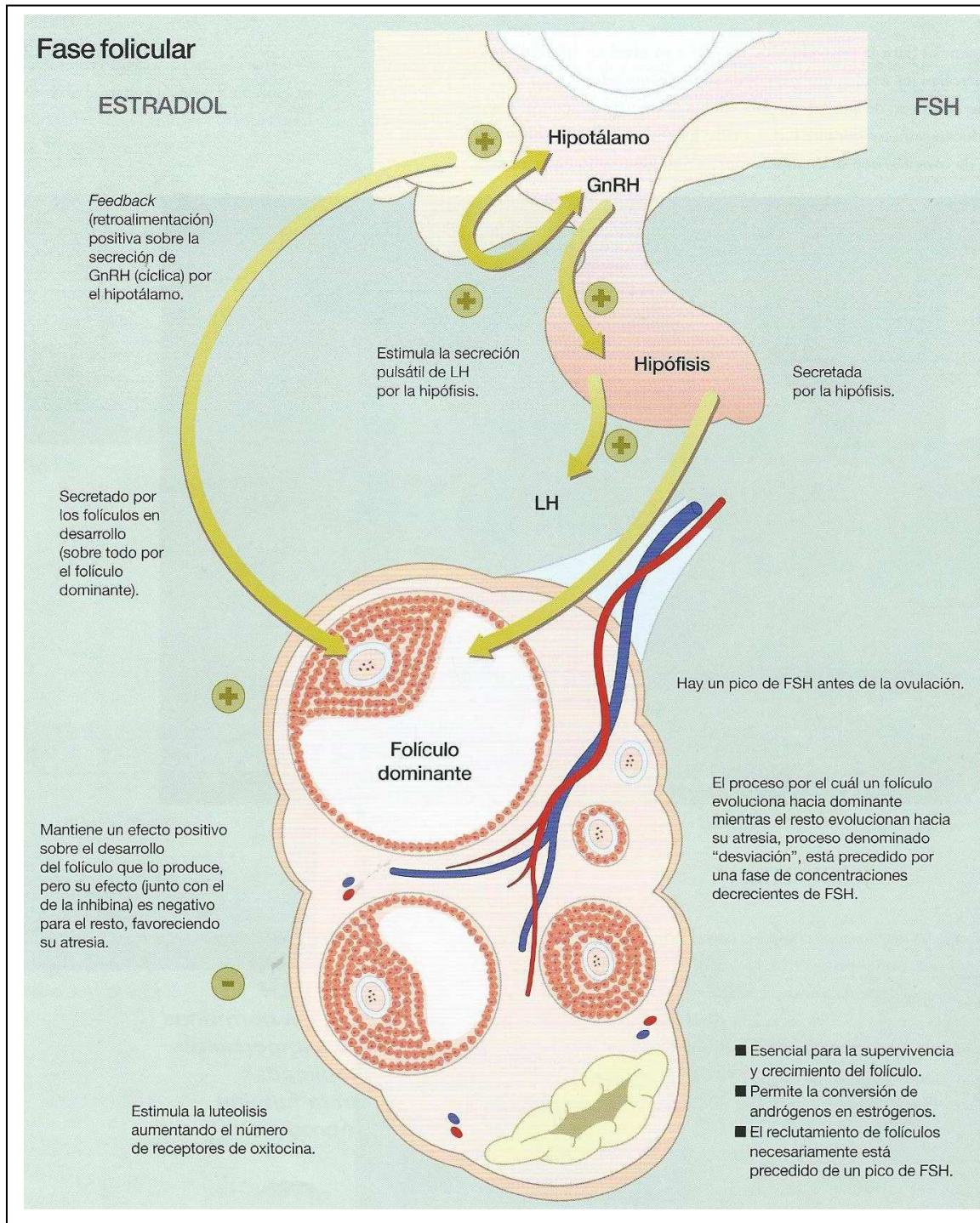


Figura 2.1.3. Fase folicular (Fernández Sánchez, 2008).



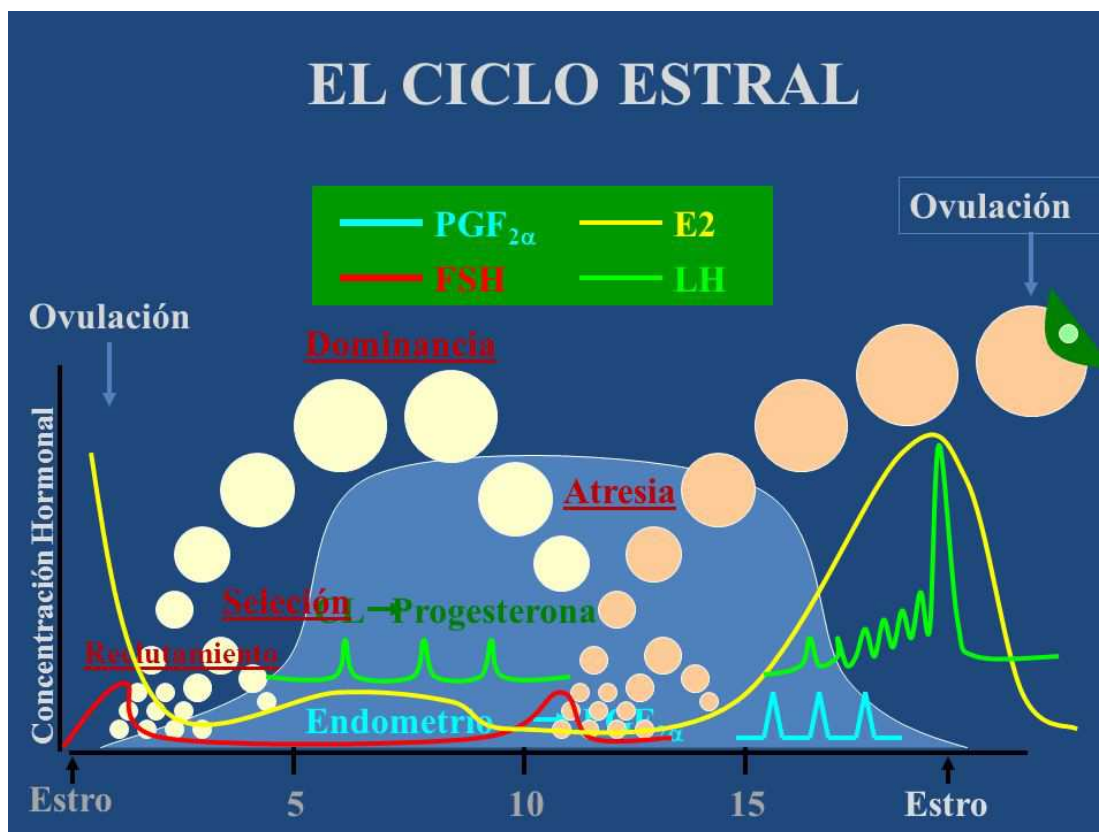


Figura 2.1.4. Esquema de la foliculogénesis y ovulación en el ciclo estral (de 2 ondas foliculares) (Adams et., al. 2008).

### 2.1.5.- Formación y destrucción del cuerpo lúteo

El CL es una glándula endocrina transitoria del ovario que segrega principalmente progesterona, pero también, otras sustancias como oxitocina, noradrenalina, prostaglandina I<sub>2</sub> y E<sub>2</sub> (Rekawiecki *et al.*, 2008), prolactina (Shibaya *et al.*, 2007) y estradiol (Okuda *et al.*, 2001); y tiene un papel clave en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en los mamíferos domésticos (Niswender *et al.*, 1994; Fields y Fields, 1996). En el ganado y otros animales domésticos, la vida útil del CL es limitada principalmente por la luteolisis que, provocada por estimulación uterina a partir del efecto de la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), afecta a la duración del ciclo estral (Milvae, 2000). El CL es uno de los pocos tejidos que exhibe períodos regulares de tiempo, en su crecimiento (formación de CL), la función y la luteolisis (Schams y Berisha, 2004).



El pico de LH preovulatorio induce una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y células de la granulosa del folículo preovulatorio que se diferencian a su vez en células lúteas pequeñas y grandes después de la ovulación. Este proceso se denomina **luteinización** (Berisha y Schams, 2005). La luteinización se caracteriza por el aumento de la producción de progesterona. Esto es debido a una reducción o supresión de los enzimas responsables de la transformación de la progesterona en estradiol, como la P450c17 y P450arom (Juengel y Niswender, 1999). El crecimiento del tejido depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y del establecimiento de un suministro de sangre funcional (Berisha y Schams, 2005). El flujo sanguíneo del ovario disminuye poco después de la ovulación, pero aumenta a continuación, entre los 2 y 5 días, gradualmente y en paralelo con los aumentos en las concentraciones de progesterona plasmáticas y en el CL y la angiogénesis (Acosta *et al.*, 2003) a través de los reflejos provocados por el desarrollo normal del CL.

Las hormonas principales que apoyan el desarrollo y la función del CL son la LH y la hormona del crecimiento (GH) (Schams y Berisha, 2004). Los receptores de membrana para la LH se encuentran principalmente en las células lúteas pequeñas y su unión con la LH induce la producción de progesterona (Niswender y Nett, 1988). Los receptores para la GH se encuentran principalmente en las células lúteas grandes (Lucy *et al.*, 1993), que son responsables del 80% de la producción total de la progesterona por el CL (Niswender *et al.*, 1985). La progesterona también se ha demostrado que regula su propia síntesis en el CL (Kotwica *et al.*, 2004). La progesterona aumenta su propia síntesis mediante la estimulación de la expresión de enzimas en la ruta que transforman el colesterol en progesterona, como la proteína StAR, el citocromo P450scc y 3 $\beta$ -HSD (Kotwica *et al.*, 2004). Otro factor que aumenta la expresión de las mismas enzimas es PGE<sub>2</sub> que conduce también a un aumento en la síntesis de progesterona (Rekawiecki *et al.*, 2005). El aumento de las concentraciones de progesterona en las células lúteas, las protegen de la apoptosis, mientras que la interrupción de la

esteroidogénesis y la disminución de la capacidad de las células para producir progesterona lútea induce su apoptosis (Liszewska *et al.*, 2005).

En la Figura 2.1.5 se recogen los detalles de la formación del cuerpo lúteo.

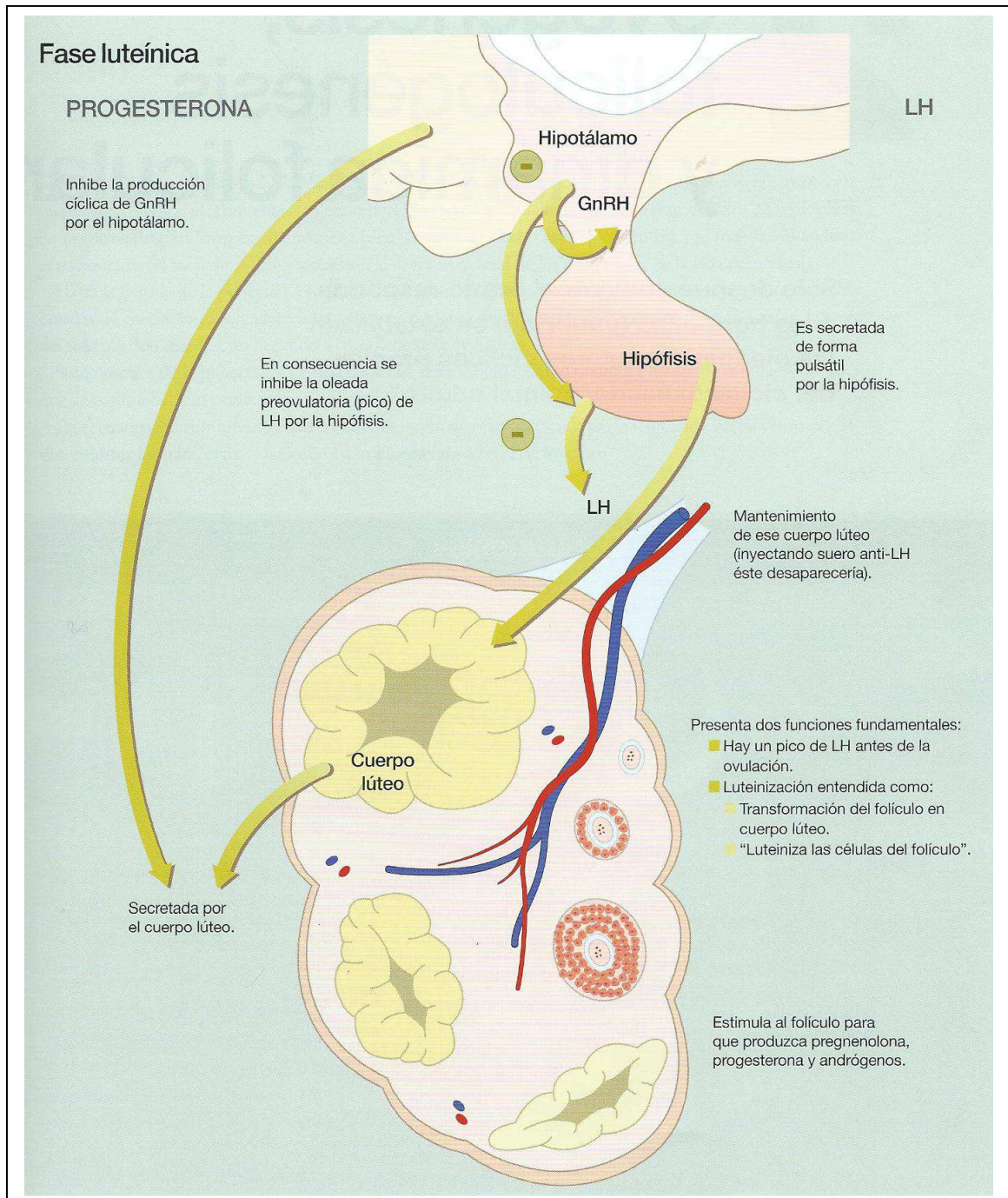


Figura 2.1.5. Fase luteínica (Fernández Sánchez, 2008).

Si no se produce la fecundación, la regresión funcional y estructural del CL comienza a ocurrir alrededor del día 16 en las novillas (Ginther *et al.*, 2007) y es causada por la liberación episódica de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  desde el útero, que llega al CL a través de un sistema de contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica (Thorburn *et al.*, 1973). La progesterona es la hormona que regula la vida útil del CL. Ejerce una acción inhibitoria sobre la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  debido a una regulación que mantiene bajos los receptores de estradiol y oxitocina en el endometrio hasta el día 12. Esto es seguido por la desensibilización a la progesterona y un aumento de receptores de estradiol y de oxitocina después de este período. Esto es esencial para la iniciación de los mecanismos luteolíticos endometriales (Mayer *et al.*, 1988, citado por Elli, 2009; Schams y Berisha, 2004). Por lo tanto, hay un aumento en la activación de receptores de estradiol por el estradiol circulante que estimulan la síntesis de receptores de oxitocina endometrial. La secreción de oxitocina es inducida posteriormente por la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina, creándose un mecanismo de retroalimentación positivo entre estas hormonas hasta alcanzar niveles de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a concentraciones luteolíticas (Silvia *et al.*, 1991). La fuente de estradiol durante la luteolisis son los folículos ováricos, especialmente del más grande o del futuro folículo dominante que se convertiría en el folículo ovulatorio (Beg y Ginther, 2006). El estradiol folicular es un importante regulador de la sincronización de la secreción uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el ganado bovino (Araujo *et al.*, 2009).

Una de las acciones luteolíticas de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  liberada desde el útero es estimular la producción de óxido nítrico (NO), que provoca la vasodilatación y el consiguiente aumento de flujo sanguíneo de las arteriolas de la circulación periférica del CL maduro. Este aumento agudo en el flujo de sangre ha sido señalado como desencadenante de la cascada de la luteolisis (Miyamoto *et al.*, 2005).

Por otra parte, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina o exógena aumenta directamente la secreción de endotelina-1 y de angiotensina II a partir de vasos microcapilares dentro del CL, sin la mediación del flujo sanguíneo. Estos péptidos vasoactivos suprimen la secreción de progesterona a partir de células lúteas (Girsh *et al.*, 1996; Miyamoto *et al.*, 1997) y pueden inducir vasoconstricción a largo plazo de las arteriolas lúteas cuando la progesterona plasmática disminuye. Otras acciones luteolíticas de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sirven para estimular la afluencia de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Davis *et al.*, 1987) y la proteína quinasa C (Wiltbank *et al.*, 1989). Además, se ha sugerido la migración de células del sistema inmunitario durante las primeras etapas de la luteolisis, las que interaccionan fisiológicamente con las células lúteas, produciéndose una liberación de quimiocinas y una mayor expresión del complejo de histocompatibilidad como parte del proceso luteolítico (Townson *et al.*, 2003; Cannon y Pate, 2003).

Condición indispensable para una producción regular de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la consiguiente luteolisis es la integridad del endometrio. En presencia de endometritis, piómetra, feto momificado, etc., el cuerpo lúteo persiste y el ciclo ovárico se suspende.

Hay dos factores que controlan la transformación del CL cíclico en CL gestacional: la producción hipofisiaria de LH y prolactina, y el propio embrión, que inhibe la regresión del CL mediante la secreción de trofoblastina en el estadio precoz del desarrollo (17 días en la vaca) (Elli, 2009).

### **2.1.6.- Diferencias entre el ciclo estral de novillas y vacas en lactación de raza Holstein.**

Aunque algunos autores no han encontrado una diferencia significativa en la presentación de ciclos de dos o tres ondas foliculares en el ciclo estral entre vacas y novillas, se ha informado de que en la raza Nelore (*Bos indicus*) la

mayoría de las novillas exhiben un patrón folicular de tres ondas mientras que la mayoría de las vacas tienen un patrón de dos ondas (Figuereido *et al.*, 1997). En la raza Holstein (*Bos Taurus*) se ha informado de que las novillas tienen un ritmo más rápido de crecimiento folicular (Pursley *et al.*, 1997), siendo el patrón más común el de tres oleadas foliculares (Sirois y Fortune, 1988),

No se han observado diferencias, entre las vacas y novillas, en el tamaño máximo alcanzado por el folículo dominante más grande para las ondas no ovulatorias, pero, si para la onda ovulatoria. El folículo dominante (preovulatorio) es más grande de tamaño en vacas en lactación que en las novillas (Sartori *et al.*, 2004) con una tendencia a una mayor duración de la dominancia (Wolfenson *et al.*, 2004).

Independientemente de tener folículos ovulatorios más grandes, las vacas en lactación tienen concentraciones máximas de estradiol sérico alrededor del celo inferiores a las de las novillas y las vacas no lactantes (De La Sota *et al.*, 1993, Ahmad *et al.*, 1996; Inbar *et al.*, 2001; Sartori *et al.*, 2004) Estas menores concentraciones de estradiol en las vacas en lactación se ha relacionado con una capacidad esteroideogénica inferior del folículo preovulatorio o con un mayor metabolismo del estradiol en las vacas en lactación que en novillas o vacas no lactantes (Sangsritavong *et al.*, 2002). No obstante, en la vaca en lactación el folículo preovulatorio dominante tiene que crecer a un tamaño más grande y estar presente durante más tiempo para llegar a una concentración de estradiol suficiente para iniciar la cascada luteolítica y posteriormente inducir el aumento de GnRH para la ovulación (Sartori *et al.*, 2004). Las concentraciones reducidas de estradiol preovulatorio circulante podrían ser una de las principales razones de la alteración de la fisiología reproductiva en vacas en lactación, lo que conduce a una menor duración e intensidad del estro conductual (Nebel *et al.*, 1997).

También, la menor concentración de estradiol alrededor de la ovulación podría causar una mala fertilización y pobre desarrollo embrionario temprano (King *et al.*, 1994). Si los niveles séricos de estradiol son bajos, la influencia inhibidora de estradiol sobre la liberación de FSH disminuye. Precisamente, una pequeña pero significativa concentración de FSH más alta se produce durante el ciclo estral en las vacas en comparación con las novillas. Una concentración más alta de FSH induciría el crecimiento de más de un folículo grande y una mayor tasa de ovulaciones dobles (Wolfenson *et al.*, 2004). Las vacas en periodo de lactación presentan una mayor incidencia de ovulaciones múltiples (Fricke y Wiltbank, 1999). Este hecho explica también la mayor tasa de gemelos en las vacas multíparas en comparación con las vacas primíparas (Kinsel *et al.*, 1998).

Las vacas en lactación desarrollan más volumen de tejido luteal que las novillas, que puede ser detectado desde el día 4 del ciclo (Sartori *et al.*, 2004). Existe una correlación positiva entre el tamaño del folículo ovulatorio y el volumen de tejido luteal (Vasconcelos *et al.*, 2001). Si las vacas en lactación tienen un folículo ovulatorio más grande, el volumen del CL será mayor. A pesar de que el tejido luteal es más grande, la concentración de progesterona en suero es menor en las vacas que en las novillas, detectada a partir del sexto día post-ovulación (Sartori *et al.*, 2004; Wolfenson *et al.*, 2004). Cuanto más alto es el metabolismo de esteroides en vacas en lactación mejor se podría explicar esta diferencia. La menor concentración de progesterona sérica permitiría una mayor frecuencia de pulso de LH, causando una maduración prematura del ovocito (Revah y Butler, 1996), dando lugar a la ovulación de un oocito de menor edad después del pico de GnRH inducido por el estradiol. Esto podría contribuir también a reducir la fecundidad observada en vacas en lactación en comparación con las novillas.

## **2.2.- MANEJO REPRODUCTIVO DEL GANADO VACUNO DE LECHE**

### **2.2.1.- Inseminación artificial**

La inseminación artificial (IA) es un método de reproducción, que consiste en depositar semen de forma instrumental en el tracto genital de una hembra en el momento más adecuado para que se produzca la gestación. En este método no existe contacto directo entre el macho y la hembra (Evans *et al.*, 2004), ya que el papel del macho queda limitado al aporte del semen, obtenido mediante alguna de las técnicas empleadas para su extracción, generalmente la vagina artificial.

Una de las primeras citas sobre la IA se remonta al año 1780, cuando el fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani, ensayó la IA en perras (citado por Hafez y Hafez, 2000).

No obstante, existen noticias de que los árabes ya utilizaban la inseminación siglos antes (año 1300 d.C.) para fecundar yeguas con semen robado de garañones.

En 1782, Rossi y Branchi, repitieron con éxito el experimento de Spallanzani. En 1803, el mismo Spallanzani informó que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que sólo se volvían inmóviles y que tras exponerlos al calor recuperaban la motilidad por varias horas (citado por Hafez y Hafez, 2000).

A partir de esta última fecha no hubo comunicados adicionales sobre la inseminación artificial hasta finales del siglo XIX. Entre 1884 y 1887 Everett Milais

inseminó 19 perras consiguiendo que 10 de ellas quedaran gestantes (citado por Hafez y Hafez, 2000). En 1897, Wealter Heape, en Inglaterra, trabajó sobre la inseminación artificial en perras y concluyó que un solo eyaculado podría servir para inseminar varias hembras y que la inseminación podría ser una herramienta valiosa para estudiar los factores genéticos (citado por Hafez y Hafez, 2000).

Al principio del siglo XX en Rusia y Japón se empieza a aplicar la IA en los animales de granja (Hafez y Hafez, 2000), siendo Ivanoff el que empezó a trabajar con caballos, bovinos y ovinos, obteniendo los mejores resultados en las dos últimas especies.

En 1936, Sorensen y Gylling-Holm crearon la primera cooperativa de IA en Dinamarca. En el año 1952, alrededor del 55% de las vacas de ese país eran inseminadas artificialmente (citado por Hafez y Hafez, 2000).

En Estados Unidos, la primera cooperativa de IA se fundó en el año 1938 y se popularizó en la década de 1950, con el desarrollo del semen bovino congelado.

A partir de estos antecedentes, la IA se expandió por todos los países, hasta llegar a constituir una técnica rutinaria en el manejo reproductivo de las diferentes especies animales, especialmente en la especie bovina, y más concretamente en el vacuno de leche.

Entre las ventajas que proporciona la IA destacaremos:

- Ofrece la oportunidad de avanzar genéticamente en todos los animales de la granja, mediante la selección y uso de sementales mejorantes



- Incrementa el potencial reproductivo de un semental. A través de la IA y con el uso de semen congelado se pueden inseminar miles de vacas por año.
- Permite valorar en un corto periodo de tiempo el potencial productivo y reproductivo de un semental. Cada semental se podría evaluar de una forma fiable en un grupo de vacas en una sola generación, mientras que por monta natural se tardaría demasiado tiempo.
- Facilita el transporte de material genético. Resulta más económico transportar semen que un semental.
- Permite conservar semen durante muchos años, aún después de la muerte del semental. Especialmente importante para la conservación y recuperación de razas en peligro de extinción.
- Permite reducir o eliminar la presencia de los toros en las granjas.
- Impide la transmisión de enfermedades, mediante un control estricto de los sementales, no procesando semen de animales enfermos.
- Garantiza el control de registros, cubriciones y nacimientos.
- Posibilita la utilización de sementales valiosos incapaces de copular por lesión física.

Pueden ser servidas hembras jóvenes o de talla pequeña por toros grandes o pesados sin temor de lastimarlas o por el contrario, en ocasiones se pueden emplear sementales jóvenes o pequeños de talla para realizar la cópula.

La IA también comporta algunas desventajas o inconvenientes que deben ser controladas, tales como:

- Incrementa la consanguinidad, al aumentar el número de descendientes por semental.

- Precisa personal capacitado tanto para el proceso de obtención, manejo y conservación del semen como para la práctica de la inseminación.
- Necesita una inversión monetaria alta al iniciar un programa de IA en una explotación (compra de equipo, instalaciones, etc.).
- Facilita la propagación de enfermedades transmisibles por el semen sino se lleva un control muy exhaustivo.

En resumen, la IA se considera que es la técnica más importante desarrollada para la mejora genética de los animales de granja, porque unos pocos machos seleccionados producen suficiente semen para fecundar a miles de hembras al año (Hafez y Hafez, 2000). La inseminación artificial continúa siendo el método de elección para los productores de leche para aumentar la calidad genética de su ganado (Vishwanath, 2003). Otras ventajas de la IA en contraposición a la monta natural serían: el control de las enfermedades venéreas, la disponibilidad de registros, un servicio más económico y una mayor seguridad al eliminar los machos de las granjas (Hafez y Hafez, 2000). Sin embargo, la necesidad de la detección de celos diaria es el principal inconveniente para la implementación con éxito de la IA, especialmente en el ganado vacuno. Por esta razón, el desarrollo de protocolos que controlan el estro y la ovulación son de gran importancia para los productores de ganado bovino lechero (Lauderdale, 2009).

### **2.2.2.- Protocolos para inducción/sincronización de celo/ovulación.**

Con el paso del tiempo se han ido desarrollando distintos protocolos de tratamiento hormonal que provocaran la inducción/sincronización del celo. Algunos de estos protocolos han estado sujetos a las normativas sanitarias vigentes de

cada momento en los diferentes países. Dependiendo del tipo de hormona u hormonas empleadas, podemos clasificar estos protocolos en los siguientes grupos: aquellos que utilizan sólo progesterona, los que incorporan progesterona y estrógenos, los que utilizan progesterona más prostaglandinas, los que se componen de sólo prostaglandinas, los que incorporan el empleo de GnRH combinado sólo con prostaglandinas o bien con prostaglandinas y progestágenos.

### **Protocolos a base de progesterona.**

Los primeros protocolos a base de progesterona consistían en inyectar por vía subcutánea 25 mg de progesterona en aceite de maíz, lo cual impedía el estro y favorecía la formación del CL (Ulber *et al.*, 1951). Hansel *et al.*, 1961 y Zimbelman, 1963 utilizaron acetato de medroxiprogesterona (MAP), una progestina sintética por vía oral, para la sincronización estral de los bovinos. Tras la administración durante 18 días con 180 mg de MAP, se producía el celo entre 1 y 6 días después. Se reportó una tasa de detección del estro del 90%. A pesar de estos resultados, el elevado coste del producto hizo que fuera retirado del mercado a finales de los 60. El acetato de melengestrol (MGA premezcla, Pfizer Animal Health, Nueva York), fue otro producto de progestina oral utilizado para suprimir el estro y prevenir la ovulación (Zimbelman y Smith, 1966a, b).

Aunque la intención de los primeros estudios fue aplicar MGA para el control del estro del ganado, se observaron que se producían incrementos en el peso corporal de las novillas tratadas con 0,25 a 0,75 mg de MGA (Bloss *et al.*, 1966; Zimbelman y Smith 1966b). Este hallazgo condujo a una serie de estudios para el uso de la MGA en ganado de cebo, siendo autorizado su empleo por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en 1968, "para aumentar la tasa de ganancia de peso y mejorar la eficiencia de la alimentación".

Aunque se retrasó hasta 1997 la aprobación del uso de MGA para la sincronización estral de ganado, su utilización ha sido limitada y reducida principalmente al ganado de carne.

### **Protocolos que combinan progesterona y estrógenos.**

Los estrógenos, son otras de las hormonas cuyo empleo en el control reproductivo del ganado vacuno se ha visto limitado en estos últimos años, dado que ha sido prohibida en una gran mayoría de países. Concretamente en la Unión Europea (Directiva 96/22/CE del Consejo de 29 de abril de 1996) y por transposición en España se prohibió a finales del 2004 la administración de estrógenos en el ganado (Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre de 2004). Recientemente esta prohibición también afecta a los Estados Unidos y Canadá. Actualmente su uso es habitual en ganado de carne de los países de América del Sur y Centroamérica para sincronizar la emergencia de la onda folicular y la ovulación.

No obstante, dado que su empleo ha sido objeto de análisis en el presente trabajo, recordaremos que la combinación de estradiol y progesterona suprime la FSH y la liberación de LH y el crecimiento de folículos antrales. En cambio el estradiol solo (en un momento de baja concentración de progesterona circulante), estimula la liberación de LH e induce la ovulación y/o la luteinización de folículos ováricos. Una vez que el estradiol es metabolizado, la FSH en circulación aumenta y una nueva onda folicular emerge con un intervalo de tiempo de cuatro días después del tratamiento.

En España durante el tiempo que estuvo permitido el uso de estrógenos, el producto comercial más utilizado fue Crestar<sup>®</sup> de laboratorios MSD (anteriormente designado como Sincromate-B<sup>®</sup> de laboratorios Intervet).

Crestar<sup>®</sup> es un inductor y sincronizador de celo en bovinos, que consta de un implante que se inserta subcutáneamente en la parte media de la cara posterior de la oreja, y de un inyectable compuesto por un progestágeno más valeriato de estradiol, que provoca una reducción de la vida media del cuerpo lúteo. Cada implante contiene 3 mg de Norgestomet. La solución inyectable contiene 3 mg de Norgestomet y 5 mg de Valeriato de estradiol.

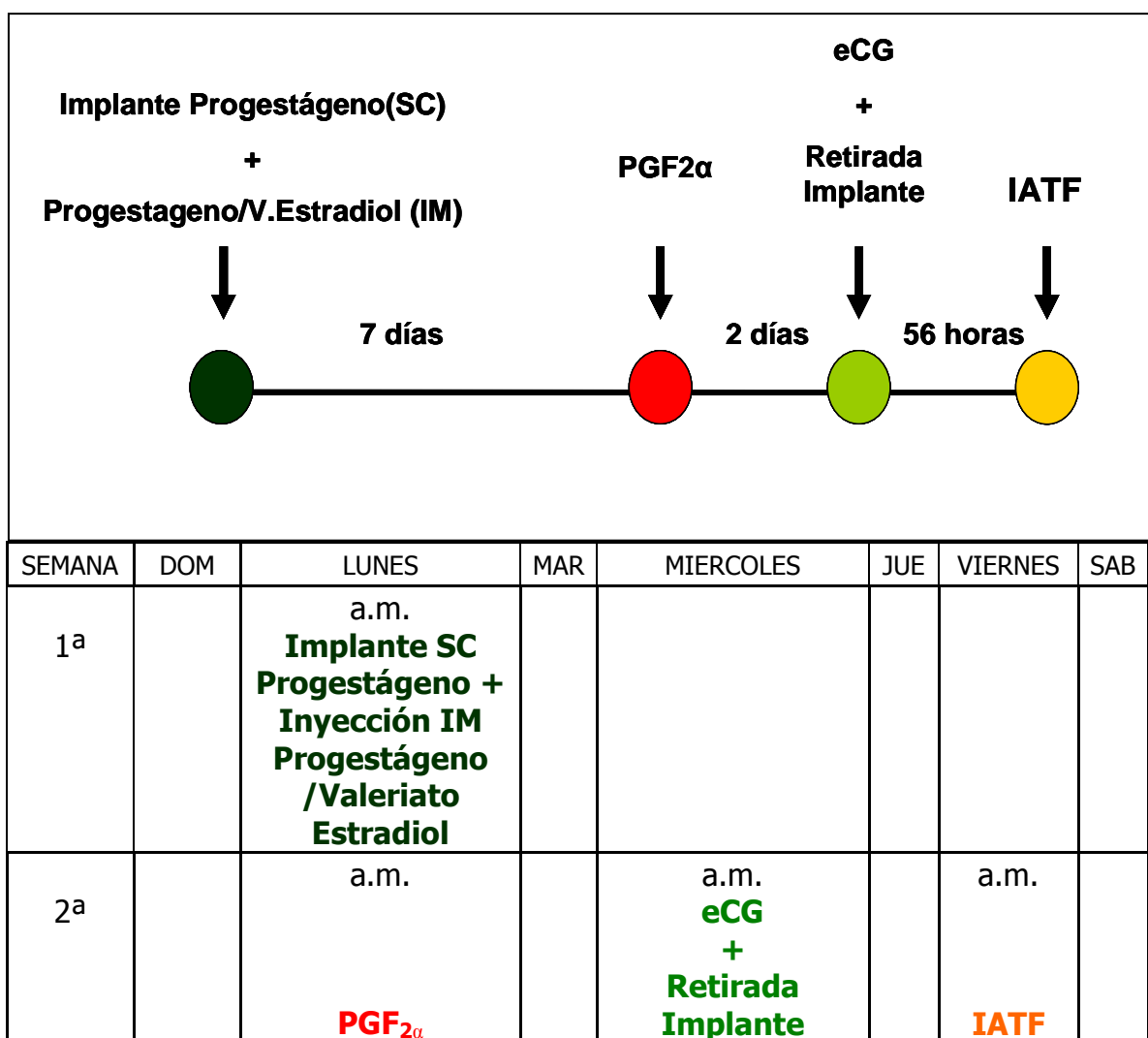


Figura 2.2.1. Esquema y ejemplo de calendario del protocolo CRESTAR para vacas.

El implante Crestar<sup>®</sup> liberará Norgestomet a razón de 200 µg/día, que en la hembra cíclica bloquea la liberación de gonadotropinas. En el momento de la

retirada del implante, cesará bruscamente el bloqueo hipofisiario presentando de forma sincronizada, una fase folicular manifiesta que dará lugar al celo y ovulación a fecha prefijada.

Los detalles del protocolo recomendado por el laboratorio vienen recogidos en la Figura 2.2.1. Cuando el programa Crestar<sup>®</sup> se utiliza en vacas de leche se recomienda administrar 500 U.I de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Folligon<sup>®</sup>), antes conocida como gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG), al retirar el implante para reforzar el efecto gonadotrópico, así como una inyección IM de PGF<sub>2α</sub> 48 horas antes de la retirada del implante. La eCG y la PGF<sub>2α</sub> no son necesarias de aplicar en novillas cíclicas de aptitud láctea.

## **Protocolos a base de prostaglandina F<sub>2α</sub>**

El empleo de la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) para el control reproductivo del ganado vacuno es relativamente reciente, a principios de los 70 del pasado siglo. Estas hormonas son miembros de un grupo de compuestos lipídicos que derivan de ácidos grasos. Se aislaron por primera vez a partir del fluido seminal en 1935 por el fisiólogo sueco Von Euler y por Goldblatt de forma independiente (citado por Caballero, 1992). Se designó con el nombre de prostaglandina porque se creyó que era parte de las secreciones de la próstata. Más tarde se demostró que distintos tejidos secretan prostaglandinas empleadas en diferentes funciones.

La PGF<sub>2α</sub> se puede utilizar para la luteolisis o la regresión del CL en el ganado. Fueron Lauderdale (1.972), Liehr et al. (1972), y Rowson *et al.*, (1972) los que demostraron el efecto luteolítico de la prostaglandina. Lauderdale *et al.*, en 1977, comprobaron que la dosis efectiva para producir luteolisis en el ganado es 25 mg de PGF<sub>2α</sub> administrada por vía intramuscular, y que se podía inyectar a

intervalos de 11 a 14 días (Lauderdale *et al.*, 1981). En este mismo estudio, Lauderdale *et al.* (1981), evaluaron la administración simple o doble de PGF<sub>2α</sub>. El porcentaje de novillas de carne detectadas en celo durante los siguientes 5 días tras la última inyección PGF<sub>2α</sub> fue significativamente mayor tras la doble inyección (64% *vs* 17%, respectivamente). En novillas lecheras, se observó un resultado similar (73% *vs* 12%).

Una limitación del uso de la PGF<sub>2α</sub> para la sincronización del estro, es que su eficacia depende exclusivamente de la presencia de un CL. En consecuencia, no tendrá éxito si tenemos animales en anestro o novillas prepúberes en el grupo que va ser sincronizado (Short *et al.*, 1990; Patterson *et al.*, 1992).

A partir de estos primeros estudios, la utilización de PGF<sub>2α</sub> se ha generalizado en el mundo, aplicada sola o en combinación con otras hormonas. Varios laboratorios de productos farmacológicos veterinarios la incluyen en su catálogo. Los disponibles en el mercado español en este momento se recogen en la Tabla 2.1.1.

Dado que estos protocolos de sincronización no controlan el momento de la ovulación, la detección del estro es obligada y por consiguiente sólo resultan eficaces cuando los porcentajes de detección son buenos o excelentes. Esta necesidad de detectar los celos, es el principal inconveniente del empleo de PGF<sub>2α</sub> (Rivera *et al.*, 2004) y queda lejos del principal propósito de todo protocolo de sincronización de reducir al máximo la mano de obra requerida, si bien es cierto que facilita la observación, centrándola a unos momentos esperados de manifestación de celo. Suelen exhibir signos de celo entre 2 y 5 días. Otros dos inconvenientes de los programas basados exclusivamente en la sincronización del estro son la escasa expresión del mismo que muestran las vacas de alta producción y la elevada prevalencia de anestro durante los primeros 60 días del posparto (Wiltbank *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009).

Medicamento	Laboratorio	Principio activo	Posología
Cyclix <sup>®</sup>	VIRBAC	D-Cloprostenol sódico	2 ml/IM (250 µg/ml)
Dalmazin <sup>®</sup>	FATRO	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)
Dinolytic <sup>®</sup>	ZOETIS	Dinoprost trometamina	5 ml/IM (5 mg/ml)
Enzaprost <sup>®</sup>	CEVA	Dinoprost (trometamol)	5 ml/IM (5 mg/ml)
Estrumate <sup>®</sup>	MSD	D-Cloprostenol	2 ml/IM (250 µg/ml)
Galapan <sup>®</sup>	INVESA	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)
Genestran <sup>®</sup>	ESTEVE	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)
Gestavet-Prost <sup>®</sup>	HIPRA	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)
Indupart <sup>®</sup>	KARIZOO	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)
Luteosyl <sup>®</sup>	SYVA	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)
Prosolvín <sup>®</sup>	VIRBAC	Luprostiol	Vacas: 2 ml/IM (15 mg) Novillas: 1 ml/IM (7,5 mg)
Veteglan <sup>®</sup>	CALIER	D-Cloprostenol	2 ml/IM (75 µg/ml)

Tabla 2.2.1. Medicamentos con PGF<sub>2α</sub> comercializados en España a fecha de octubre 2015.

## Protocolos basados en la combinación de GnRH y PGF<sub>2α</sub>

A mediados de la década de los 90 se comienzan a utilizar los protocolos de inducción/sincronización basados en la combinación de GnRH y prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>), conocidos como **Ovsynch** y **Co-Synch**. Estos protocolos se han utilizado ampliamente para la IATF en rebaños lecheros (Pursley *et al.*, 1995) y de carne (Geary *et al.*, 2001) en los EE.UU. y Canadá. Hoy día se han extendido por todo el mundo.

Estudios posteriores modificaron el Ovsynch original para mejorar la sincronía y la fertilidad del protocolo. Dichas modificaciones incluyen: presincronización con PGF<sub>2α</sub> (Moreira *et al.*, 2001), cambios en los tiempos de la IA en relación a la ovulación y probar diferentes intervalos de las inyecciones del protocolo original (Fricke, 2003). Sin embargo, estos protocolos no sólo tienen que



tener éxito en alcanzar unos porcentajes de fecundidad a la IA aceptables (%FIA), sino que además deben ser prácticos para ser implantados dentro del manejo diario de la granja; o el protocolo fracasará por falta de cumplimiento (Fricke, 2003).

El primer protocolo desarrollado (Pursley *et al.*, 1995) y uno de los tratamientos más empleados en la actualidad es el método Ovsynch y sus variantes (Colazo y Ambrose, 2014). Consiste en la aplicación de dos inyecciones IM de GnRH (100 µg) los días 0 y 9 del tratamiento y una inyección IM de PGF<sub>2α</sub> (25 mg) intercalada entre ambas (el día 7), procediéndose a la IA a tiempo fijo (IATF) entre las 12 y 18 horas después de la segunda aplicación del GnRH. La fertilidad es inferior que con celo natural, pero se consigue una ovulación en el 85% de las vacas tratadas a las 24-32 horas (Pursley *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1996).

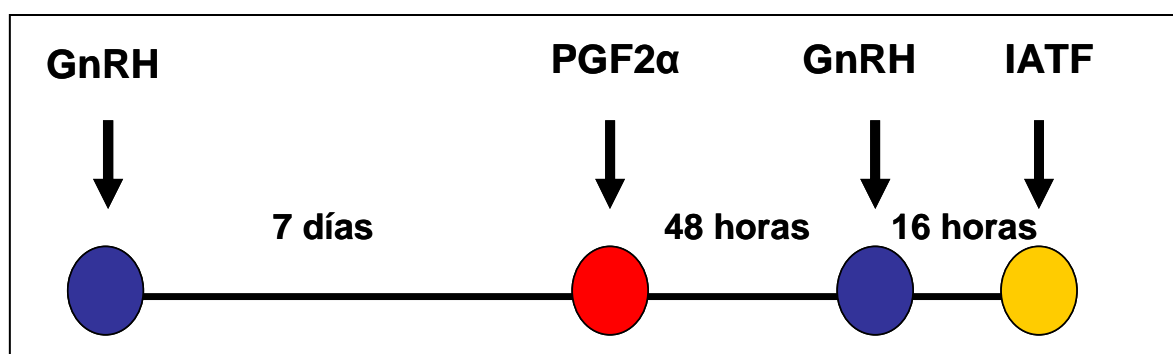
Los fundamentos fisiológicos para el Ovsynch fueron revisados por Pursley *et al.* (1995). La intención de la primera inyección de GnRH es inducir la liberación de LH y causar la ovulación de un folículo grande funcional = dominante > 10 mm de diámetro, que induciría una nueva onda folicular aproximadamente 2 días más tarde y el aumento de la probabilidad de tener un gran folículo en crecimiento en el momento de la inyección de PGF<sub>2α</sub>. (Twagiramungu *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1999). Otra función de esta primera inyección de GnRH es aumentar el porcentaje de animales sincronizados con una sola inyección de PGF<sub>2α</sub>, alcanzándose un porcentaje de sincronización mayor cuando la GnRH se inyecta 6 o 7 días antes de la administración de PGF<sub>2α</sub> (Thatcher *et al.*, 1989). El período de 7 días entre la primera inyección de GnRH y la inyección de PGF<sub>2α</sub> se fundamentó en el hecho de que las vacas lecheras lactantes tienen un CL sensible 7 días después del estro.

El propósito de la segunda inyección de GnRH es hacer ovular el folículo preovulatorio, de la onda folicular inducida después de la primera GnRH, en un momento preciso, a fin de aumentar la sincronía de la ovulación.

En el estudio de Pursley *et al.*, (1995), un alto porcentaje de vacas en lactación inyectadas con GnRH en una fase aleatoria del ciclo estral ovularon un folículo después de esta primera inyección de GnRH (90%). En contraste, sólo aproximadamente el 50% de las novillas ovularon un folículo a esta inyección. Con la segunda inyección de GnRH, la ovulación se sincronizó dentro de un período de 8 h en todas las vacas en lactación y en todas las novillas en el que el CL sufrió regresión.

El tratamiento con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 6 ó 7 días después de la primera GnRH, y la aplicación de una segunda inyección de GnRH entre las 36 y 48 horas después facilita la IATF (Thatcher *et al.*, 1996; Twagiramungu *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1995). La IATF se recomienda entre las 16 y 20 horas después de la segunda GnRH (Pursley *et al.*, 1998). El protocolo de tratamiento que utiliza la GnRH y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para IATF en el ganado lechero que ha sido denominado "Ovsynch" (Figura 2.2.2), en nuestro país ha sido designado con las siglas GPG, iniciales de las hormonas empleadas.

Varios estudios han demostrado que el protocolo Ovsynch parece ser muy eficaz, constituyendo una clara estrategia económica para mejorar el rendimiento reproductivo en vacas lecheras de alta producción (Burke *et al.*, 1996; Pursley *et al.*, 1997; Risco *et al.*, 1998). En la actualidad, el protocolo de IATF más utilizado en las granjas lecheras se denomina Ovsynch-56. Este protocolo mantiene un intervalo de proestro, entre la inyección de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la última GnRH, de 56 horas (Brusveen *et al.*, 2008).



SEMANA	DOMINGO	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO
1ª		a.m. <b>GnRH</b>					
2ª		a.m. <b>PGF<sub>2α</sub></b>		p.m. <b>GnRH</b>	a.m. <b>IATF</b>		

Figura 2.2.2. Esquema y ejemplo de calendario del protocolo Ovsynch. Adaptado de Pursley et al. (1995).

Otras modificaciones del protocolo Ovsynch, como la presincronización con doble inyección de PGF<sub>2α</sub> con 14 días de diferencia entre ellas, antes de la iniciación del protocolo Ovsynch a 12 días después de la segunda PGF<sub>2α</sub> (Moreira *et al.*, 2001) o el uso del programa doble Ovsynch (Souza *et al.*, 2008) han demostrado que mejoran la fertilidad del protocolo original.

Varios laboratorios comercializan la GnRH en España. La relación de dichos laboratorios y sus productos se recogen en la Tabla 2.2.2.

El protocolo Co-Synch es una modificación del protocolo Ovsynch. Se basa en los mismos principios fisiológicos, con la diferencia de que la IATF se realiza en el mismo momento que la segunda inyección de GnRH (Geary y Whittier, 1998) (Figura 2.2.3). Por lo tanto, se requiere una menor manipulación de las vacas, resultando este protocolo un programa de sincronización eficiente con menos mano de obra y con una menor permanencia de animales atrapados. Esto es especialmente importante cuando se aplica el protocolo para el ganado vacuno lechero. También es importante en ganado de carne ya que el manejo de los

animales es más complejo y con este protocolo solo se requieren 3 manipulaciones en lugar de cuatro.

Medicamento	Laboratorio	Principio activo	Posología
Acegon <sup>®</sup>	ZOETIS	Gonadolerina (Acetato)	2 ml (50µg/ml)
Busol <sup>®</sup>	INVESA	Buserelina (Acetato)	0.004 mg/ml.
Cystoreline <sup>®</sup>	CEVA	Gonadorelina (Diacetato tetrahidrato).	2 ml/IM (100 µg/ml)
Dalmarelin <sup>®</sup>	FATRO	Lecirelina	2 ml/IM (25 µg/ml)
Fertagyl <sup>®</sup>	MSD	Gonadorelina (Diacetato tetrahidrato)	2 ml/IM (50 µg/ml)
Gestavet-GnRH <sup>®</sup>	HIPRA	Gonadorelina (Acetato)	1 ml/IM (100 µg/ml)
Gonasy <sup>®</sup>	SYVA	Gonadolerina (Acetato)	2 ml (50µg/ml)
Receptal <sup>®</sup>	MSD	Buserelina (Acetato)	(4.2 µg/ml)
Veterelin <sup>®</sup>	CALIER	Buserelina (Acetato)	2,5 ml/IM (4 µg/ml)

Tabla 2.2.2. Medicamentos con GnRH comercializados en España a fecha de octubre 2015.

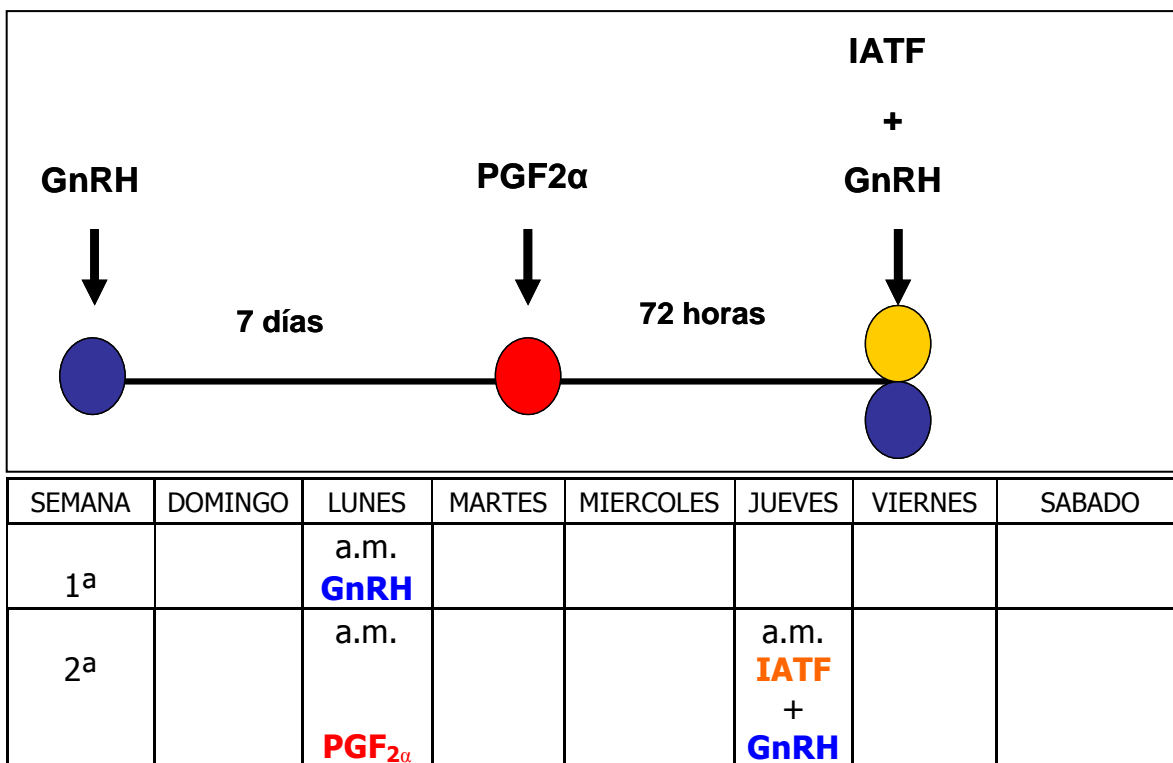


Figura 2.2.3. Esquema y ejemplo de calendario del protocolo Co-Synch. Adaptado de Geary y Whittier (1998)

Un primer estudio que comparó los protocolos Ovsynch y Co-Synch en vacas de carne, encontró un menor % de fecundidad (P/ IATF) para el Co-Synch (49% frente a Ovsynch, 57%), (Geary y Whittier, 1998). Sin embargo, los datos posteriores de estos mismos autores no han mostrado diferencias en los % de fecundidad (P/IATF) entre vacas de carne que recibieron Ovsynch o Co-Synch (Ovsynch: 57%; Co-Synch: 58%) (Geary *et al.*, 2001).

En un protocolo de sincronización de la ovulación, el tiempo esperado en que suceda la ovulación es 24-32 horas después de la segunda inyección de GnRH (Pursley *et al.*, 1995). Por lo tanto, la IATF se podría realizar al mismo tiempo de la oleada de LH inducida (0 h), a las 24 a 32 horas antes de la ovulación, justo antes de la ovulación (24 horas), o entre estos dos tiempos (8 y 16 h). El momento ideal para realizar IATF es de alrededor de 16 horas después de la GnRH, comprobándose una disminución en el % de fecundidad (P/IATF) si se lleva a cabo después del momento de la ovulación (36 horas) (Pursley *et al.*, 1998). Cuando la inseminación se produce más cerca del momento de la ovulación, es decir en torno a las 24 horas después de la GnRH, el % de fecundidad (P/IATF) puede ser mayor que en las que se inseminaron junto con la aplicación de la GnRH. Sin embargo, en otros estudios no se encontraron diferencias en el % de fecundidad (P/IATF) entre las vacas inseminadas a la vez que la aplicación de la GnRH, o las vacas inseminadas a las 8, 16, y 24 horas después de la GnRH (Pursley *et al.*, 1998; Portaluppi y Stevenson, 2005).

Los protocolos Ovsynch en el ganado lechero han proporcionado porcentajes de fecundidad sobre vacas tratadas o elegibles similares a los obtenidos con la IA a celo detectado (Pursley *et al.*, 1997; De la Sota *et al.*, 1998). Sin embargo, el % de fecundidad de vacas inseminadas es generalmente menor en las vacas tratadas con Ovsynch porque la ovulación no se sincroniza adecuadamente en aproximadamente un tercio de los animales.

Ha sido documentado en vacas Holstein en lactación tratadas con el método Ovsynch, que un 11% ovuló antes de la IATF, que un 12% no respondió al tratamiento con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , y que un 9% no ovularon después del segundo tratamiento con GnRH (Colazo *et al.*, 2009b), lo que indica que el porcentaje de sincronización (definido como el porcentaje de vacas cuyo CL sufrió regresión y ovularon dentro de las 24 horas después de IATF) fue sólo del 68%.

Se ha demostrado que la etapa del ciclo estral en el momento en el que se inicia un protocolo Ovsynch afecta a los porcentajes de sincronización y preñez (Vasconcelos *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000). Así, en vacas en las que se administró la GnRH entre los días 1 y 4 o entre los días 14 y 21 del ciclo estral tuvieron unos porcentajes de fecundidad más bajos que aquellas vacas tratadas en otros momentos del ciclo (32% *vs.* 42%, respectivamente) (Vasconcelos *et al.*, 1999). Cuando se administra GnRH durante el metaestro (días 1-3), el folículo dominante no ovula, y comienza a sufrir atresia aproximadamente en el momento en que se inyecta la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , por lo tanto no responderá a la segunda GnRH. El folículo dominante de la segunda onda folicular (días 13-17) tampoco puede ovular en respuesta al primer tratamiento de GnRH, y en ausencia de la ovulación, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  endógena puede causar regresión del CL y la ovulación antes de la IATF, lo que conduce a unos porcentajes de fecundidad bajos. Por lo tanto, para mejorar estos resultados, se debería hacer detección de celo e IA a aquellos animales que muestran celo temprano.

## **Variantes de los protocolos tradicionales a base de GnRH y de $\text{PGF}_{2\alpha}$**

La mayoría de los protocolos de IATF utilizados en el mundo actualmente, son variantes de los protocolos Ovsynch o Co-Synch. Entre estas, describiremos los más utilizados hoy en día.

La presincronización con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , método "**Pre-Synch**" (Figura 2.2.4), se utiliza comúnmente en los rebaños lecheros para asegurar que las vacas se encuentren en la etapa más apropiada del ciclo estral en el momento de la primera GnRH. El objetivo es que la mayoría de los animales estén entre los días 5 y 12 del ciclo estral. La presincronización con dos dosis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  separadas 14 días, y la administración de la primera GnRH del Ovsynch a los 12 días después de la segunda  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aumenta la probabilidad de que un folículo sensible a la liberación de LH esté presente en el momento de la primera GnRH. En dos estudios iniciales (Moreira *et al.*, 2001; El-Zarkouny *et al.*, 2004), el porcentaje de fecundidad después de la IATF fue mayor en vacas tratadas con "Pre-Synch - Ovsynch" que en las tratadas sólo con Ovsynch (49 *vs.* 37 %; 47 *vs.* 38 %,  $p < 0.05$ ).

El efecto de modificar el intervalo de tiempo entre la segunda  $\text{PGF}_{2\alpha}$  del Pre-Synch y la iniciación de Ovsynch sobre la fecundidad en vacas en lactación ha sido recientemente investigado. Aunque quedó demostrado que el intervalo de 12 días entre la segunda  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la primera GnRH mejoró el porcentaje de fecundidad entre un 10-12% (Moreira *et al.*, 2001; El-Zarkouny *et al.*, 2004), los ganaderos han preferido aplicar un intervalo de 14 días, así todos los tratamientos se llevan a cabo en los mismos días de la semana.

Años después, Galvão *et al.*, (2007) demostraron que una reducción en el intervalo entre Pre-Synch y la primera GnRH de 14 a 11 días, incrementaba el porcentaje de vacas que ovulaban a la primera GnRH (61 *vs.* 45%,  $p < 0.01$ ) y en consecuencia aumentaba el % de fecundidad (41 *vs.* 34%,  $p < 0.05$ ). En otro estudio realizado por Stevenson (2011), observó que un intervalo de 12 días desde la última  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la primera GnRH proporcionaba un mayor porcentaje de fecundidad (P/IATF) a los 32 días (37%), que un intervalo de 14 días (32%) ó de 10 días (35%) o sin presincronización (solamente Ovsynch; 34%).

Colazo *et al.*, (2013a) han comparado recientemente la respuesta ovulatoria a la primera GnRH, el porcentaje de sincronización y el porcentaje de fecundidad en 241 vacas lecheras sometidas al protocolo Ovsynch, iniciado ya sea 9 o 12 días después de la segunda PGF<sub>2α</sub> del protocolo Pre-Synch. Las respuestas a los tratamientos fueron determinadas por las concentraciones de progesterona plasmática y examen ecográfico transrectal. Se consideraron como “sincronizadas” las vacas que habían respondido a la PGF<sub>2α</sub> (con una progesterona plasmática < 0.5 ng/ml en el momento de la IATF), y que ovularon dentro de las 24 horas siguientes a la segunda GnRH. El porcentaje de vacas que ovularon después de la primera GnRH (62%) fue similar en ambos grupos. Sin embargo, la reducción del intervalo de 12 a 9 días redujo el porcentaje de sincronización (73 vs. 61%) y el porcentaje de fecundidad a los 32 días (44 vs. 34%) y 60 días (43 vs. 32%) después de la IATF.

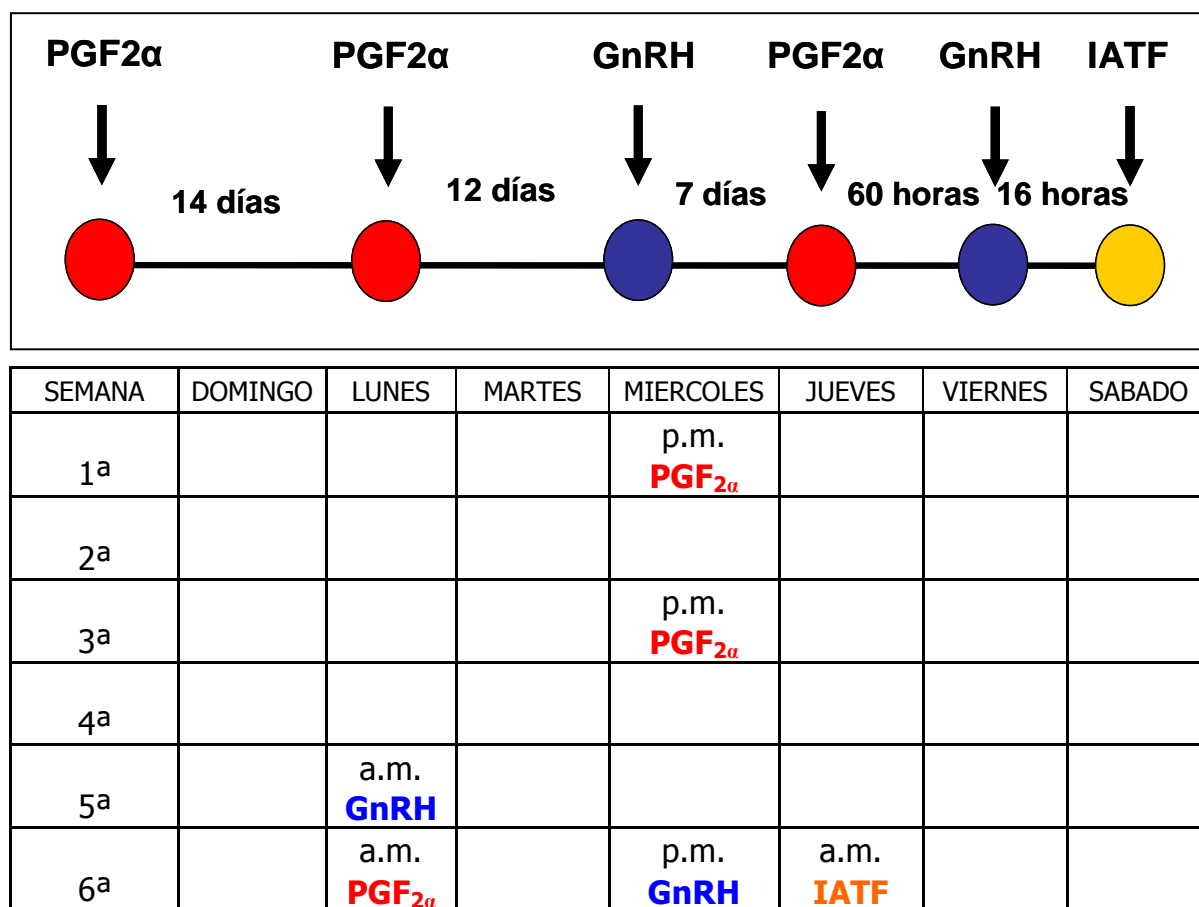


Figura 2.2.4. Esquema y ejemplo de calendario del protocolo Pre-Synch-Ovsynch. Adaptado de Moreira *et al.*, (2001).



Estos mismos autores (Colazo *et al.*, 2013b), también investigaron los efectos de la presincronización con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , antepuesta a un protocolo Co-Synch sobre la sincronización y el porcentaje de fecundidad tras la IATF en novillas de carne. La presincronización redujo el número de novillas con celo adelantado a la IATF (3% *vs.* 24%), lo que sugeriría que este método podría ser útil en la aplicación exitosa de los protocolos basados en GnRH en novillas de carne. Sin embargo, el porcentaje de fecundidad (P/IATF) no se vio estadísticamente afectado en este estudio (38% *vs.* 30%).

La ventaja mayor de la presincronización en Pre-Synch-Ovsynch es en la primera IA posparto (Santos, 2013).

En resumen, la presincronización con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  parece ser eficaz en vacas en lactación, mientras que los beneficios en novillas de carne fueron mucho menos evidentes. Se supone que el ganado que no está ciclando no se beneficiaría de una presincronización con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que no tienen un CL, aunque en un estudio reciente se ha sugerido que el tratamiento con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  adelantaría la primera ovulación en novillas de carne prepúberes (Pfeifer *et al.*, 2009).

Bello *et al.*, (2006) desarrollaron un nuevo protocolo de presincronización que combina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y GnRH, denominado **G6G** (Figura 2.2.5). El objetivo de este protocolo es aumentar el porcentaje de animales que respondan a la primera inyección de GnRH del protocolo Ovsynch, incrementando así, la probabilidad de que un folículo de tamaño ovulatorio se encuentre presente al inicio del Ovsynch. Un total de 137 vacas en lactación se asignaron a uno de cuatro grupos; un grupo no recibió ningún tratamiento de presincronización antes del Ovsynch (Control), mientras que los otros tres grupos fueron tratados con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , seguido 2 días después de una inyección de GnRH, tras la cual se inicia el protocolo Ovsynch, bien al 4, 5 o 6 día, según grupo. Los porcentajes de vacas que ovularon después de la primera GnRH del Ovsynch fueron 54, 56, 67 y 85%, respectivamente. El

porcentaje de fecundidad a la IATF fue mayor en el grupo en los que se inició el Ovsynch a los 6 días después de la presincronización con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y GnRH, que en los animales control (50 vs. 27%,  $p < 0.08$ ).

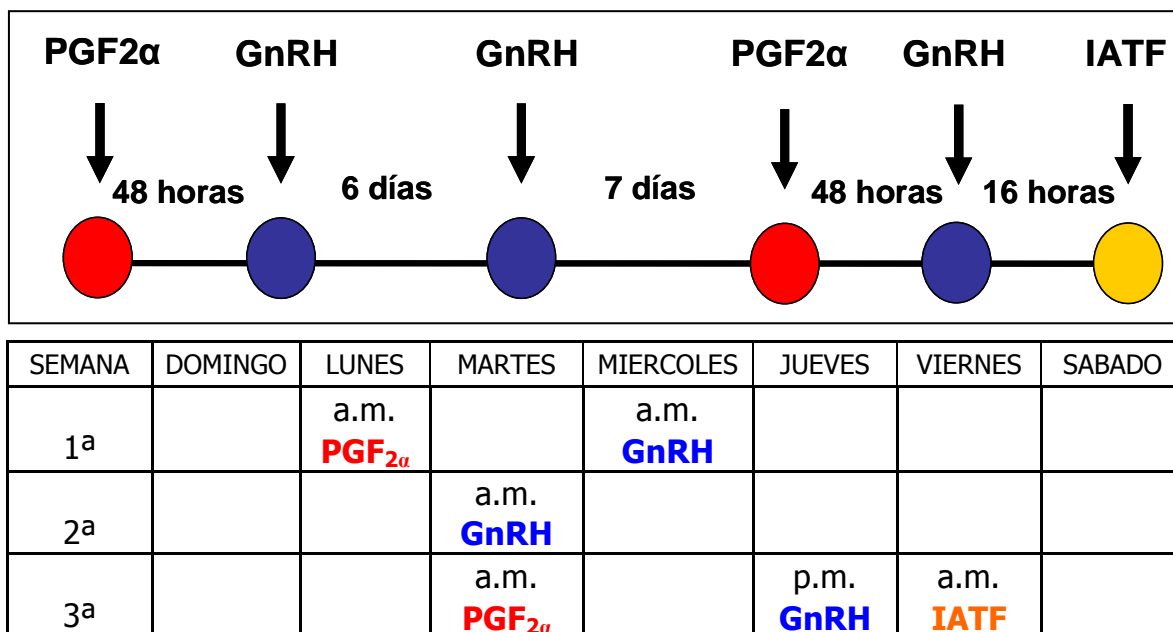


Figura 2.2.5. Esquema y ejemplo de calendario del protocolo denominado G6G. Adaptado de Bello *et al.*, (2006)

Últimamente, el protocolo de presincronización G6G se ha evaluado en un mayor número de animales (Ribeiro *et al.*, 2011), obteniendo porcentajes de fecundidad (P/IATF) similares a los señalados por Bello *et al.* (2006), sin que se encontraran diferencias con el protocolo "Pre-Synch-Ovsynch" (50 vs. 49%, respectivamente; Ribeiro *et al.*, 2011).

El **Doble Ovsynch**, es otra modificación utilizada en la actualidad. Dicho protocolo consiste en una presincronización de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y GnRH (Souza *et al.*, 2008). Básicamente, el protocolo doble Ovsynch implica dos protocolos Ovsynch seguidos uno del otro, con una tercera inyección de GnRH administrada a los 7 días después de la segunda (Figura 2.2.6). Dicho de otra forma dos Ovsynch con un intervalo de 7 días entre ellos.

En un primer estudio, el protocolo Doble Ovsynch arrojó un porcentaje de fecundidad más alto que el protocolo Pre-Synch-Ovsynch en vacas primíparas (65% vs. 45%,  $p < 0.05$ ), pero no en multíparas (38% vs. 40%) (Souza *et al.*, 2008). El porcentaje de fecundidad global para los distintos partos comparando Doble Ovsynch / Pre-Synch - Ovsynch fue de (49,7 vs 41,7%).

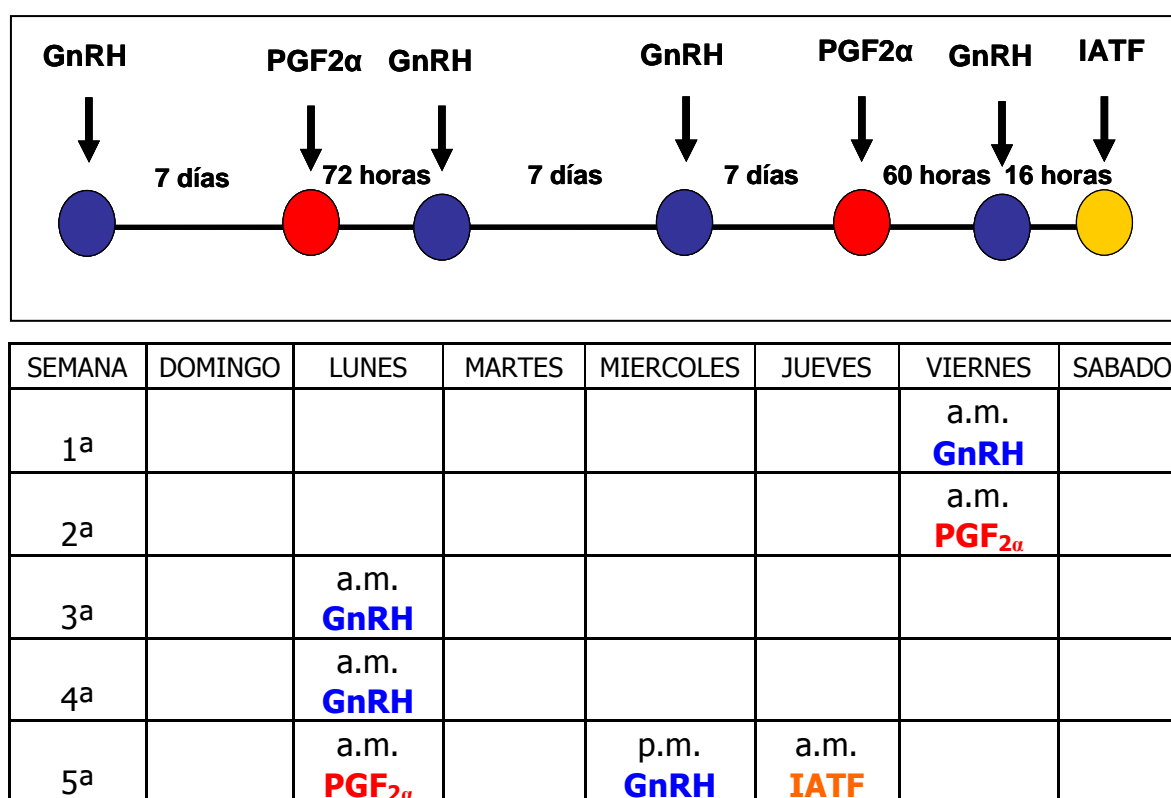


Figura 2.2.6. Esquema y ejemplo de calendario de tratamientos del protocolo denominado Doble Ovsynch. Adaptado de Souza *et al.*, (2008).

Con dicho protocolo se mejora el porcentaje de gestación por dos razones:

- Una mayor probabilidad de tener un folículo dominante que ovule después de la tercera GnRH.

- Una mayor concentración de progesterona circulante antes de la administración de la PGF<sub>2α</sub> del segundo Ovsynch (Wiltbank *et al.*, 2012).

Astiz y Fargas, (2013) no reportaron diferencias en el porcentaje de fecundidad entre Doble Ovsynch (36%) y G6G (35%), después de evaluar 7805 primeras IA realizadas en 27 explotaciones lecheras del este de España. Sin embargo, el protocolo Doble Ovsynch aportó mejores porcentajes de fecundidad en vacas primíparas (44%) que en vacas múltiparas (31%).

### **Otras alternativas complementarias al método Ovsynch**

Colazo *et al.*, (2009a) propusieron reemplazar la segunda GnRH por LH porcina (pLH) o por gonadotropina coriónica equina (eCG) en un protocolo Ovsynch. Aunque la ovulación se produce en aproximadamente el 90% de los animales tratados con un protocolo Ovsynch estándar, esas ovulaciones podrían dar como resultado la formación de un CL menos funcional que el formado después de ovulaciones espontáneas.

Varios autores, además de nuestra experiencia, han señalado una alta proporción de nuevos celos dos semanas después de IATF en vacas que habían sido tratadas con Ovsynch. La administración de 100 µg de GnRH (dosis recomendada), induce una liberación de LH con una duración de 4 a 5 horas, que es mucho más corta que la duración de la LH endógena durante el celo natural (Chenault *et al.*, 1975; Colazo *et al.*, 2008). Basándose en esto, varios investigadores han estudiado diferentes alternativas para reemplazar el segundo tratamiento de GnRH en un protocolo Ovsynch.

Colazo *et al.*, (2009a) investigaron el uso de LH porcina reemplazando la primera y/o segunda inyección de GnRH en vacas lecheras sometidas a un Ovsynch. Se utilizaron un total de 605 vacas provenientes de tres rebaños lecheros diferentes. Las vacas recibieron 100 µg de GnRH o 25 mg de pLH al principio o al final de un Ovsynch estándar de 7 días (en un diseño experimental 2 X 2). Un mayor porcentaje de vacas ovularon después del primer tratamiento con pLH (61 *vs.* 44%), pero esto no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de fecundidad. Pero las vacas que recibieron GnRH al inicio del Ovsynch y pLH en lugar de la segunda inyección de GnRH tuvieron un mayor porcentaje de fecundidad que las vacas tratadas con un Ovsynch estándar utilizando dos inyecciones de GnRH (42 *vs.* 28%). Contrariamente a lo esperado, las vacas tratadas con pLH tuvieron concentraciones de progesterona plasmáticas post IATF similares a las de las vacas tratadas con GnRH, lo que indica la existencia de un mecanismo distinto a la función lútea después de la ovulación y es el responsable de la mayor fecundidad en vacas que recibieron pLH.

Otra alternativa es el uso de gonadotropina coriónica equina (eCG) para mejorar la madurez del folículo y aumentar las concentraciones periovulatorias de estradiol. La eCG es una glicoproteína de larga vida media, que en la vaca tiene un efecto similar a la FSH y LH y podría ser utilizada para estimular el crecimiento de los folículos en los protocolos de sincronización, comprobándose incrementos en el porcentaje de fecundidad en vacas de carne con cría y alta incidencia de anestro (Bó *et al.*, 2013).

En un estudio con vacas lecheras en anestro, cuando se adicionaban 400 UI de eCG en el momento de la inyección de PGF<sub>2α</sub>, en un protocolo tipo Ovsynch, aumentó el porcentaje de animales gestantes (Bryan *et al.*, 2010).

Small *et al.*, (2009) examinaron los efectos de eCG en el momento de la inyección de PGF<sub>2α</sub> sobre el tamaño del folículo preovulatorio y la fertilidad en

vacas de carne con cría tratadas con un protocolo Co-Synch. El tratamiento con 400 UI de eCG aumentó la fertilidad de vacas primíparas que no fueron presincronizadas, confirmando que el tratamiento con eCG puede ser beneficioso en vacas que están en posparto temprano o sometidas a un alto estrés nutricional.

### **Protocolos que combinan progesterona (PRID<sup>®</sup>/CIDR<sup>®</sup>), GnRH y PGF<sub>2α</sub>**

La progesterona en combinación con PGF<sub>2α</sub> para la sincronización del estro del ganado ya fue utilizado por Roche (1976), en forma de bobinas-espinales a base de un elastómero impregnadas con progesterona, envuelto alrededor de un núcleo de acero inoxidable. Este producto se denominó como PRID<sup>®</sup> (dispositivo intravaginal liberador de progesterona). El PRID<sup>®</sup> se insertaba por vía vaginal durante 6 o 7 días combinado con una inyección de PGF<sub>2α</sub> en el día 6. Este protocolo mejora el porcentaje de fecundidad (P/IATF) en comparación con el uso de una sola dosis de PGF<sub>2α</sub> (Smith *et al.*, 1984).

Más tarde, estos dispositivos de progesterona fueron combinados con otros protocolos de sincronización que emplean GnRH (principalmente Co-Synch) (Figura 2.2.7).

Los dos productos comerciales disponibles en España son: PRID<sup>®</sup> (CEVA SALUD ANIMAL) y CIDR<sup>®</sup> (ZOETIS).

El primero, **PRID<sup>®</sup>**, se trata de un progestágeno en espiral intravaginal, con una composición por dispositivo (a base de un elastómero de silicona) de 1,55 mg de progesterona. La progesterona es liberada durante los días de permanencia de la espiral en la vagina, inhibiendo la descarga hormonal cíclica de la hipófisis (FSH y LH), y de esta forma impide la aparición del celo y de la ovulación.

Recientemente el dispositivo PRID<sup>®</sup> en forma de espiral ha sido sustituido por otro en forma triangular que ha sido designado como PRID<sup>®</sup> DELTA.

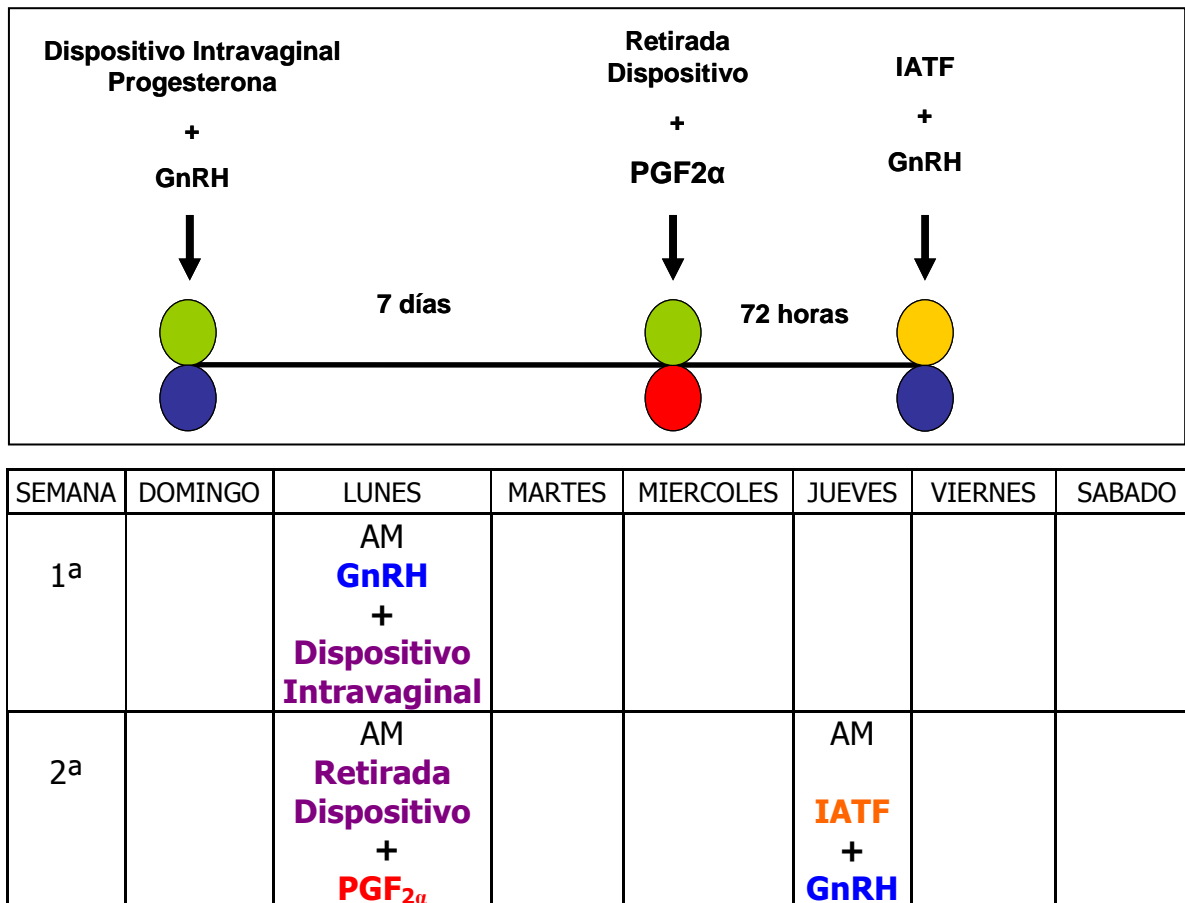


Figura 2.2.7 Esquema y ejemplo de calendario del protocolo CIDR<sup>®</sup>/Co-Synch 56 opción 1 (Domínguez et al., 2008).

El CIDR<sup>®</sup> son las siglas inglesas de "Controlled internal Drug Release". Se trata de un moderno dispositivo intravaginal, desarrollado por investigadores australianos, y comercializado en Europa por Zoetis (antes Pfizer Salud Animal). Contiene 1,38 g. de progesterona. Fue aprobado por la FDA para la sincronización estral de ganado de carne y novillas lecheras. Más tarde, fue aprobado para el mismo propósito en ganado lechero en lactación.

Tanto PRID<sup>®</sup> como CIDR<sup>®</sup> están indicados para el control del ciclo estral en vacas y novillas incluyendo:

- Sincronización del estro en hembras cíclicas. Para ser utilizado en combinación con una prostaglandina.
- Inducción y sincronización del estro en hembras no cíclicas. Para ser utilizado en combinación con una prostaglandina y con gonadotropina coriónica equina (eCG, antes llamada PMSG).

Un posible efecto secundario de los dispositivos intravaginales es que pueden inducir una reacción local (es decir inflamación de la pared vaginal) resultando en una descarga vulvar de secreción mucopurulenta. Según nuestra experiencia y la información proporcionada por los propios laboratorios fabricantes, la reacción local disminuye rápidamente sin tratamiento, y 56 horas más tarde, el día de la IA, únicamente está presente sólo en el 3,6% de los animales. Esta vaginitis no afecta a la IA y no influye en el porcentaje de fecundidad.

Lucy *et al.*, (2001) demostraron que cuando en el mismo tratamiento concurren la inserción de CIDR<sup>®</sup> o PRID<sup>®</sup> y PGF<sub>2α</sub> se produce una mejora de la sincronización frente a la utilización de solo PGF<sub>2α</sub> (grupo control). Estos autores, hicieron un estudio de campo con gran número de animales y obtuvieron unos resultados donde el porcentaje de celo durante los primeros 3 días después del protocolo CIDR<sup>®</sup>- PGF<sub>2α</sub> fue de un 59% en vacas de carne después del parto, frente a un 12% del grupo control; 65% en novillas de carne frente a un 13% del grupo control; 84% en novillas lecheras frente a un 57% del grupo control.

Además ambos productos tienen otras aplicaciones, como el tratamiento de vacas anovulatorias, induciendo ciclicidad en el 50% de estas vacas (Santos,



2013), el tratamiento de vacas con quistes ováricos y en la mejora de los resultados del método Ovsynch (GPG). Las vacas anovulatorias mantienen una actividad ovárica básica, que sin embargo impide que se puedan producir picos de LH preovulatorios. PRID<sup>®</sup> o CIDR<sup>®</sup>, gracias a la progesterona son capaces de revertir esta situación. Una de las críticas más frecuentes al método GPG es la baja fertilidad obtenida, muy por debajo de la del celo natural. La combinación de CIDR<sup>®</sup> o PRID<sup>®</sup>, colocado entre la primera GnRH y la PGF<sub>2α</sub>, mejora ostensiblemente los resultados de fertilidad obtenidos en el celo inducido (52% *vs* 29%).

De igual forma CIDR<sup>®</sup> o PRID<sup>®</sup> es un complemento ideal en los métodos Co-synch, tanto de novillas (6 días entre la primera GnRH y la PGF<sub>2α</sub>) como en vacas (7 días entre la primera GnRH y la PGF<sub>2α</sub>), en los que la inseminación se hace coincidir con la segunda aplicación de GnRH.

Lo mismo podemos decir de los métodos Pre-synch (en los que se efectúa una previa sincronización con dos inyecciones de PGF<sub>2α</sub> espaciadas 14 días, antes del GPG + CIDR<sup>®</sup> ó PRID<sup>®</sup>). Es muy recomendable aprovechar los celos previos inducidos por las prostaglandinas inseminando estas vacas a celo visto (método Cherry-Picking), lo que hace más eficaz el protocolo en términos de fertilidad, al llegar las vacas al sistema GPG + CIDR<sup>®</sup> o PRID<sup>®</sup>, en pleno diestro.

El-Zarkouny *et al.*, (2004) utilizaron 91 vacas en lactación en cada grupo que fueron tratadas con el protocolo Ovsynch con o sin la adición de un CIDR<sup>®</sup>. Solamente el 44% de las vacas estaban ciclando al inicio del estudio. Los porcentajes de fecundidad utilizando IATF, a los 29 días (59% *vs* 36%) y a los 57 días (45% *vs* 20%) fueron mayores en las vacas tratadas con Ovsynch + CIDR<sup>®</sup> que en aquellas tratadas con el Ovsynch solo. La fecundidad fue particularmente mejorada en aquellos animales que estaban en anestro al inicio del tratamiento. Vacas en anestro tratadas con Ovsynch + CIDR<sup>®</sup> tuvieron porcentajes de

fecundidad del 64% comparados con el 27% en vacas en anestro tratadas solamente con Ovsynch.

Por contra, Moreira *et al.*, (2004) señalaron que el uso de un CIDR<sup>®</sup> en un protocolo Ovsynch no mejoró la fecundidad en vacas en anestro (19 vs. 18% en Ovsynch y Ovsynch + CIDR<sup>®</sup>, respectivamente).

Por último, la aplicación de CIDR<sup>®</sup> o PRID<sup>®</sup> a partir del día 4 después de la IA mejora en 5 puntos la fecundidad al controlar la mortalidad embrionaria precoz. El dispositivo intravaginal se retira a los 10 días de su aplicación. El efecto de la progesterona suplementada mejora notablemente la supervivencia embrionaria, especialmente en las vacas de primera y segunda lactación.

### **2.2.3.- Particularidades del manejo reproductivo de las novillas de reposición del ganado vacuno lechero.**

Como ya ha sido señalado anteriormente, las novillas de reposición representan el futuro de una explotación de ganado vacuno de leche. Para asegurar este porvenir, garantizar el avance genético y mantener una rentabilidad económica asegurando una mayor producción de leche, los ganaderos han adoptado, desde hace años, la IA de sus novillas con semen de toros probados de las distintas casas comerciales o centros de inseminación. La principal ventaja del uso de la IA para la cría de novillas es el progreso genético, lo que está directamente relacionado con una mejora productiva. Overton y Sischo, (2005) y Graves y McLean, (2008) informaron que la producción de leche de las hijas de novillas inseminadas con semen de sementales probados ven incrementadas sus producciones lácteas entre 350-550 kg en comparación de las hijas obtenidas por monta natural. Head, (1992) afirma que estas ganancias se maximizan de por vida si las novillas paren entre 23 y 25 meses de edad.

En la actualidad los programas de cría de novillas incluyen como objetivo que el primer parto transcurra alrededor de los 24 meses de edad a través de la IA. El retraso de la edad al primer parto (a partir de los 24 meses) se ha vinculado con un bajo rendimiento lácteo (Losinger y Heinrichs, 1996; Bach et al., 2008).

Una de las posibilidades del manejo reproductivo es utilizar la IA a celo natural (celo visto) (Stevenson *et al.*, 2008a), para lo que resulta crucial la detección del celo (Ferguson y Galligan, 1993).

La eficiencia de la detección de celo es mayor para las novillas que para las vacas, dado que las novillas expresan estro con más frecuencia y con una mayor duración (Nebel *et al.*, 1997), Sin embargo, la realidad es que en la mayoría de las ganaderías el tiempo dedicado a la detección de celo en novillas es limitado, lo que provoca retrasos en las primeras IA y por tanto aumenta la edad al primer parto, y esto lleva asociado costes económicos adicionales (Caraviello *et al.*, 2006).

Por ello, se hace necesario en la gran mayoría de explotaciones, la implantación de programas de sincronización y/o inducción del celo y ovulación en el manejo reproductivo de las novillas, especialmente en aquellas que por el número restringido de trabajadores o por unos alojamientos apartados, la observación continua de las novillas es limitada.

### **Protocolos de inducción/sincronización de la ovulación**

Los protocolos de sincronización de la ovulación que incluyen IATF favorecen el uso de la IA en las novillas, evitando la necesidad de la detección del estro (Peeler *et al.*, 2004). Con un programa de gestión reproductiva de IATF para las novillas el tiempo desde la pubertad hasta la concepción se reduce, lo que

representa una disminución en el coste de la alimentación de las novillas nulíparas y un aumento en las ganancias de por vida de las novillas al conseguir antes rendimientos productivos (Moreira, 2009).

Con el paso del tiempo se han ido incorporando diversos protocolos de inducción/sincronización del celo y la ovulación en novillas, algunos con más éxito que otros. Entre estos, señalaremos los principales.

El estro podría ser sincronizado en novillas a través de la administración de una doble inyección de **PGF<sub>2α</sub>**, con un intervalo entre 11 - 14 días de diferencia. Casi el 100% de las novillas se van a encontrar en la etapa correcta del ciclo, presentando un CL, que responde a la PGF<sub>2α</sub> y por lo tanto, la mayoría de las novillas desarrollan el celo dentro de los 7 días siguientes a la última inyección (Jöchle *et al.*, 1982). Sin embargo, este programa requiere la presencia de un CL en el ovario y no sería eficaz en novillas prepúberes con ovarios poco desarrollados (infantiles) que no están ciclando (Short *et al.*, 1990; Patterson *et al.*, 1992). Este protocolo de doble prostaglandina requiere la detección visual del celo.

A pesar de que gran parte de las novillas púberes muestran celo a los 7 días después de la doble inyección de PGF<sub>2α</sub>, en los últimos años se han probado y valorado la aplicación de otras hormonas para aumentar la actividad estral después de la administración de PGF<sub>2α</sub> con el fin de aumentar la eficacia de la detección del estro.

Así en un estudio realizado en Australia, utilizando el **benzoato de estradiol** para aumentar la actividad y la sincronización estral tras dos inyecciones de PGF<sub>2α</sub>, se comprobó un aumento en el porcentaje de novillas detectadas en celo de un 29%, 11% y 8% a las 80, 96 y 120 horas, respectivamente. Sin embargo, disminuyó el porcentaje de fecundidad (novillas gestantes/novillas inseminadas) en un 17% (Cavalieri *et al.*, 2005). Como

anteriormente ha sido indicado, desde el año 2004 la administración del estradiol está prohibida en España. Antes de esta fecha, si pudo ser incorporado en algunos protocolos, como el empleado en nuestro estudio, concretamente en su presentación asociado a un progestágeno que se denominaba Crestar® (Intervet). Cuyo protocolo para vacas ha sido indicado en el capítulo anterior, y que en el caso de las novillas no es necesario la administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ni de eCG (antes PMSG). Dicho protocolo para novillas se recoge en la Figura 2.2.8.

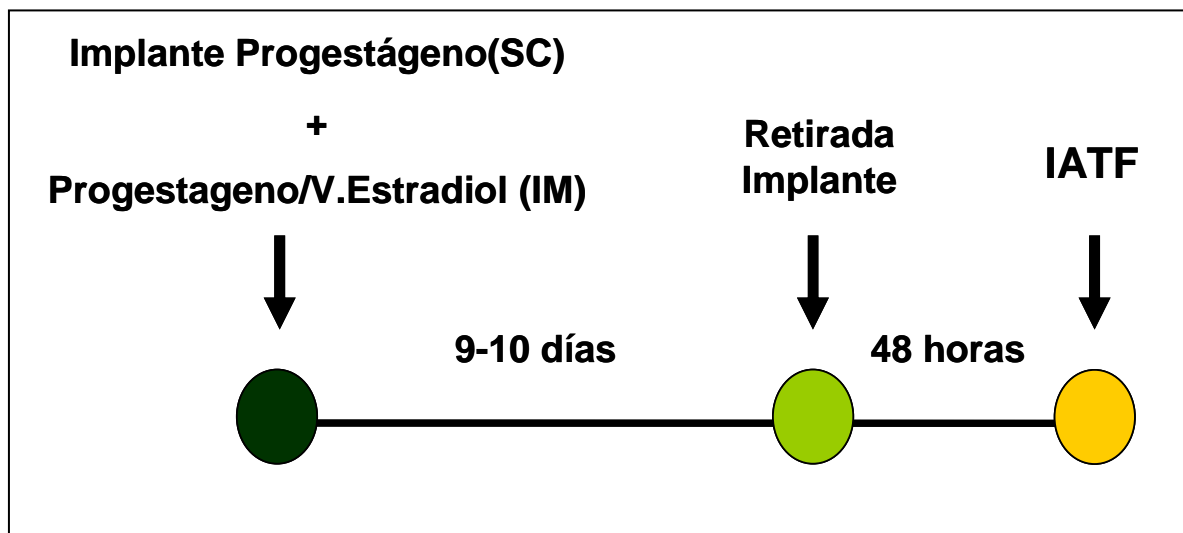


Figura 2.2.8. Esquema del protocolo CRESTAR® para novillas.

Cuando el protocolo **Ovsynch** fue desarrollado para su utilización en el ganado vacuno de leche, se evaluó tanto en vacas como en novillas (Pursley *et al.*, 1995). Los autores encontraron que sólo el 54% (13/24) de las novillas respondió a la primera inyección de GnRH, mientras que en el 90% (18/20) de las vacas se produjo la ovulación de un folículo dominante. Esta menor respuesta a la primera inyección de GnRH, se tradujo en que sólo el 75% de las novillas se sincronizaron, muy por debajo de lo observado en vacas lecheras en lactación.

El protocolo Ovsynch se comparó con un programa con detección de celo, que consistió en una inyección de un agonista GnRH seguido por una inyección de

PGF<sub>2α</sub> 7 días más tarde, tras lo cual se procedía a la IA a celo detectado (Schmitt *et al.*, 1996). El protocolo Ovsynch obtuvo mayor porcentaje de fecundidad (P/IATF) si la 2ª inyección del agonista GnRH se administraba a las 48 horas después de la inyección de PGF<sub>2α</sub> (día 9) que en lugar de a las 24 horas (día 8) (45,5% vs. 25,8%, respectivamente). Sin embargo, los porcentajes de fecundidad siempre fueron menores en los protocolos de IATF.

Estos estudios conducían a la conclusión de que las novillas de leche responden mal al protocolo Ovsynch, en consecuencia, la aplicación de este programa no ha sido recomendada para vacas nulíparas.

No obstante, se han intentado modificaciones que incrementaran la eficacia del protocolo Ovsynch en novillas, en este sentido un ensayo, con un protocolo de GnRH en día 0, PGF<sub>2α</sub> en el día 6 y GnRH en el día 8 junto con IATF, demostró una pequeña mejora en los porcentajes de fecundidad, alcanzándose cifras aceptables cuando las novillas eran inseminadas tras la detección del celo (Rivera *et al.*, 2004). Este mismo protocolo es el que venimos empleando en novillas en nuestra cooperativa desde hace años, y es el que hemos utilizado en nuestro estudio (Figura 2.2.9).

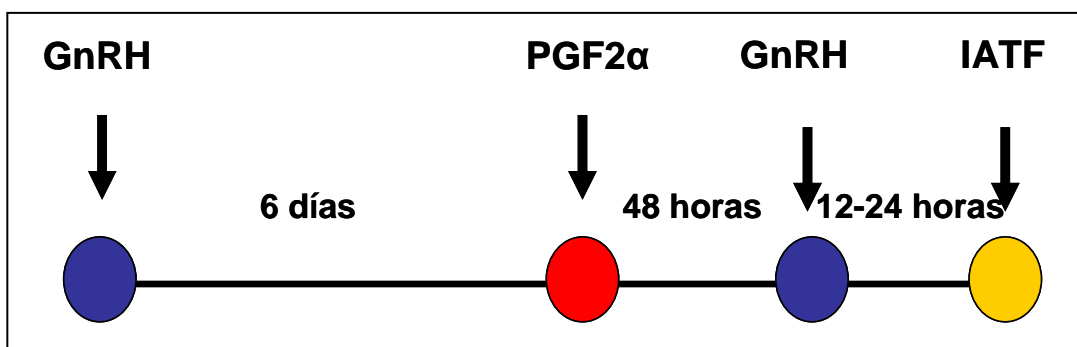


Figura 2.2.9. Esquema del protocolo Ovsynch para novillas.

Cuando en la IATF se hace coincidir con la segunda inyección de GnRH al protocolo se le denomina **Co-Synch** tal y como ya ha sido indicado anteriormente. No variando las pautas de la primera inyección de GnRH ni la de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  que en el caso de las novillas es mejor al sexto día.

Por último, otra alternativa para mejorar la sincronización del celo en novillas, es el tratamiento con un **progestágeno exógeno (PRID<sup>®</sup>/CIDR<sup>®</sup>)** insertado en vagina 6-7 días antes de la inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Macmillan y Peterson, 1993). De esta forma se asegura la regresión del CL en respuesta a la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que el progestágeno desarrollará el CL. Lucy *et al.*, en 2001, valoran la eficacia de los dispositivos intravaginales de progestágenos (CIDR<sup>®</sup>) en novillas, tanto de carne como de leche, llegando a la conclusión que estos dispositivos en combinación con la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mejoran las tasas de sincronización del estro. Siendo precisamente este protocolo el que hemos utilizado en nuestro estudio, con independencia de la marca comercial del dispositivo vaginal que incorpora el progestágeno (Figura 2.2.10).

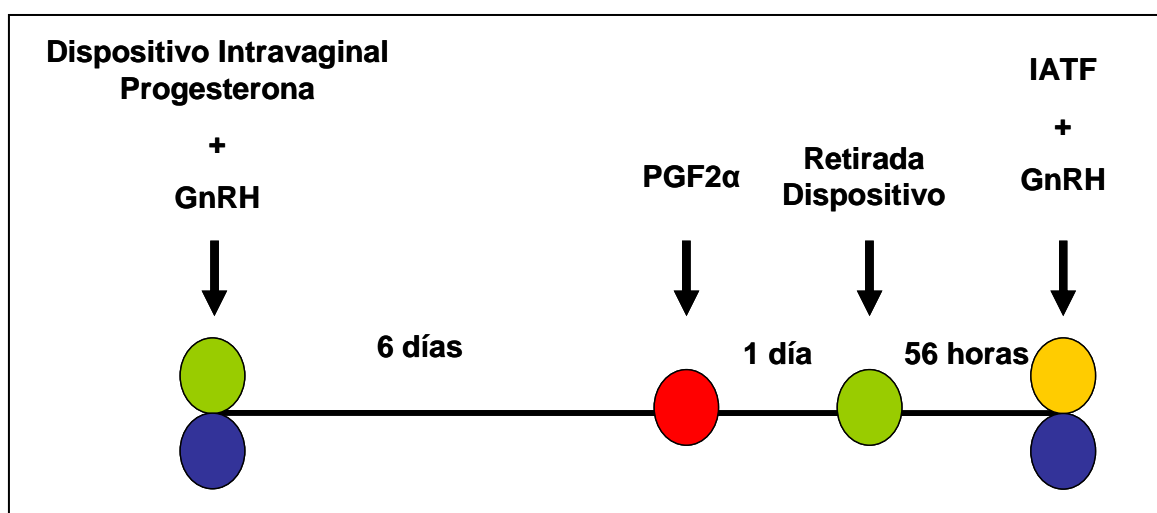


Figura 2.2.10. Esquema del protocolo Co-Synch/Dispositivo Intravaginal Progesterona 56 horas. Opción 2 (Domínguez et al., 2008)

Posteriormente se han propuesto **distintas modificaciones a los protocolos originales** que han sido señalados. Así, Bridges *et al.*, (2008) plantearon un protocolo Co-Synch de 5 días con IATF a las 72 horas de la primera inyección PGF<sub>2α</sub>. De esta forma según estos autores, se aumentaría la fertilidad de las novillas. El inconveniente de este protocolo es que son necesarias dos inyecciones de PGF<sub>2α</sub> separadas 6 a 8 horas para producir la regresión completa del CL que fue inducido por la GnRH inicial, en comparación con el protocolo estándar de 7 días (Figura 2.2.11).

Rabaglino *et al.*, (2010) evaluaron el Co-Synch de 5 días más un CIDR<sup>®</sup> con uno o dos tratamientos de PGF<sub>2α</sub> en novillas lecheras, obteniendo unos porcentajes de fecundidad del 53% y 59% a la IATF, respectivamente. Estos autores concluyeron que un solo tratamiento de PGF<sub>2α</sub> es suficiente para inducir luteolisis en novillas sometidas a un Co-Synch de 5 días con la adición de un dispositivo intravaginal de progesterona.

Colazo y Ambrose (2011) compararon un protocolo Co-Synch de 5 días frente a uno de 7 días en novillas lecheras que recibieron un PRID<sup>®</sup> y una sola dosis de PGF<sub>2α</sub> a la retirada del dispositivo. El porcentaje de fecundidad a la IATF no difirió entre ambos protocolos (59% y 58% para el de 5 y 7 días, respectivamente). Por lo tanto, dicho estudio no sugiere ningún beneficio de un protocolo sobre el otro en novillas lecheras. Llama la atención que la respuesta ovulatoria a la primera GnRH fue sólo del 25 % en las novillas sometidas al protocolo PRID<sup>®</sup>/Co-Synch de 5 días. Sin embargo, una mayor proporción de novillas que no ovularon a la GnRH inicial quedaron gestantes en comparación con aquéllas que ovularon (65% vs. 45%, respectivamente).

Esta observación planteó la hipótesis si se requiere o no la administración de GnRH en el comienzo de un Co-Synch de 5 días. Con este propósito, Colazo y Ambrose (2011) diseñaron un nuevo experimento, en el que las novillas recibieron



una única inyección de PGF<sub>2α</sub> en el momento de la retirada del PRID<sup>®</sup>. El porcentaje de fecundidad no fue diferente entre las novillas que recibieron o no la primera GnRH del Co-Synch (68% frente 71%). Sobre la base de este hallazgo, llegaron a la conclusión a la hora de aplicar un protocolo PRID<sup>®</sup>/Co-Synch de 5 días, de que ni la inyección inicial de GnRH ni que una segunda administración de PGF<sub>2α</sub> serían necesarias, para lograr porcentajes de fecundidad aceptables en novillas

En otro estudio Colazo y Ambrose (2013), investigaron si el Co-Synch modificado de 5 días (es decir sin la GnRH inicial) es adecuado para el uso de semen sexado en novillas lecheras. En un diseño experimental dos por dos, novillas cíclicas fueron divididas para recibir un tratamiento de dos inyecciones de PGF<sub>2α</sub>, separadas 14 días, con la IA aproximadamente 12 horas después de la detección de celo, o un protocolo Co-Synch modificado de 5 días con IATF a las 72 horas después de la retirada del PRID<sup>®</sup> y la administración de PGF<sub>2α</sub>. Las novillas fueron inseminadas con semen sexado o semen convencional de uno de los cuatro toros utilizados en el estudio. El porcentaje de fecundidad global fue mayor en novillas inseminadas después de la detección del estro que en aquellas sometidas a la IATF (70 vs. 63%, respectivamente). Más importante aún, las novillas que fueron IATF con semen sexado tuvieron un porcentaje de fecundidad del 61%, que no fue estadísticamente diferente al obtenido en las novillas inseminadas con semen convencional (64%).

Prácticamente la totalidad de los protocolos de inducción/sincronización de celo y ovulación a IATF utilizados en vacas multíparas han sido aplicados también en vacas nulíparas (novillas). El "problema" observado con los protocolos de sincronización en las novillas de leche, viene motivado por que éstas presentan un patrón de desarrollo folicular diferente al de vacas lecheras en lactación (Sartori *et al.*, 2004). Las novillas tienen un crecimiento folicular más rápido (Pursley *et al.*, 1997) y una mayor frecuencia de ondas foliculares (Savio *et al.*, 1988). Por lo

tanto, si un protocolo de sincronización de la ovulación con GnRH se inicia en una fase aleatoria del ciclo estral, el fracaso para sincronizar la ovulación para la IATF es mayor.

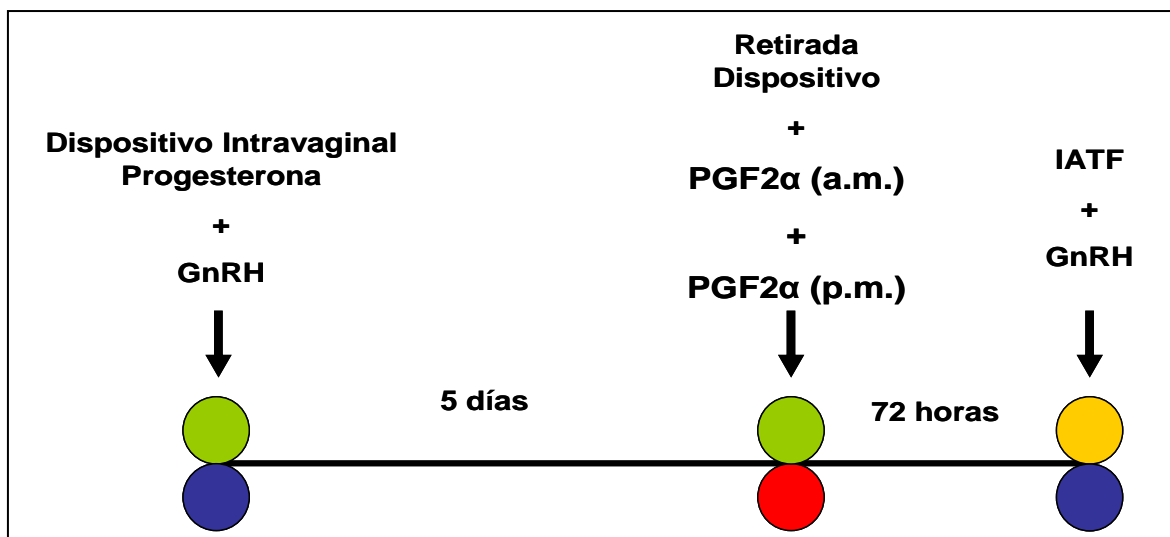


Figura 2.2.11. Esquema del protocolo Co-Synch modificado de 5 días, con la adición de un dispositivo de progesterona (Bridges et al., 2008).

Cuando se administra la primera inyección de GnRH en el comienzo de una onda folicular, es decir en el día 2 o 10 del ciclo, un folículo dominante no está presente, por lo que la ovulación a la primera inyección de GnRH tendrá una baja frecuencia (Moreira *et al.*; 2000). Si una nueva onda folicular emerge, los receptores de LH no se expresan en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento durante el primer día de la onda folicular (Xu *et al.*, 1995). Esta onda es anterior al momento de la **desviación** en las tasas de crecimiento folicular entre folículos dominantes y subordinados eventuales que se producen en promedio a los 2,8 días después de la emergencia de la onda folicular, concretamente cuando el diámetro del folículo dominante es 8,5 mm de diámetro y de 7,2 mm para el folículo subordinado más grande (Ginther *et al.*, 1996).

En novillas con tres ondas foliculares, aproximadamente el 57% está en una etapa de desarrollo folicular que no es sensible a la administración de la primera inyección de GnRH para causar una ovulación e iniciar una nueva onda folicular. Como resultado de esta falta de ovulación para la primera inyección de GnRH (por ejemplo, administrada en el día 16 de ciclo con una novilla que tiene un ciclo folicular de 3 ondas), el CL procedente de la ovulación espontánea anterior, entra en regresión ante de la inyección de la PGF<sub>2α</sub>. Por lo tanto, estas novillas expresarían estro prematuramente, alrededor del momento de la inyección de la PGF<sub>2α</sub>. (Rivera *et al.*, 2004, 2005).

En los protocolos de IATF, se ha demostrado que la etapa del ciclo estral en la que se inicia la sincronización influye sobre los resultados reproductivos. Si se inicia el protocolo durante un entorno de alta concentración de progesterona (días 5 a 10 del ciclo estral), las novillas mejoran la sincronización de estro y sus porcentajes de fecundidad, en comparación con otras novillas que inician el protocolo durante otras etapas del ciclo (Moreira *et al.*, 2000).

## **Resincronización de novillas no gestantes después de la primera IA**

Cuando se utilizan protocolos inadecuados, tales como el Ovsynch estándar, una mayoría de las novillas con IATF no quedan gestantes. Para evitar la necesidad de la detección de celo después de la primera IATF, se puede volver a sincronizar la ovulación después del primer protocolo.

En este sentido, han sido evaluadas diferentes estrategias de sincronización. Van Cleeff *et al.*, (1996) emplearon para la detección del celo de las novillas un dispositivo intravaginal CIDR<sup>®</sup> durante 9 días, con una inyección de

la PGF<sub>2α</sub> en el día 7 del protocolo. De todas las novillas tratadas, el 85% de ellas mostraron celo, las cuales fueron inseminadas entre las 48 y 72 horas después de la eliminación del dispositivo. Las novillas fueron asignadas a un grupo sin ningún tratamiento adicional o a un grupo con resincronización con una nueva aplicación del dispositivo CIDR<sup>®</sup> entre los días 17 a 22, tras la IA. Estos autores, mostraron que la inclusión de la CIDR<sup>®</sup> desde el día 17 al 22 después de la IA fue eficaz para resincronizar el estro de todas las novillas que no habían quedado gestantes en la primera IA.

En el estudio realizado por Rivera *et al.*, (2005), además de evaluar la inclusión del dispositivo CIDR<sup>®</sup> en el protocolo IATF para el primer servicio, también se valoró el efecto del dispositivo para volver a sincronizar el estro de las novillas que no quedaron gestantes a la primera IA. Las novillas fueron clasificadas en dos grupos, grupo A sin ningún tratamiento adicional o grupo B con nueva inserción CIDR<sup>®</sup> durante los días 14 a 20 después de la IATF. El porcentaje de celos en la resincronización resultó mayor en el grupo de las novillas con el dispositivo vaginal retirado a las 72 horas (78%) que el observado en el grupo control de un 50%. Las novillas fueron inseminadas en el segundo servicio a celo visto. El uso del dispositivo CIDR<sup>®</sup> para la resincronización proporcionó unos porcentajes de fecundidad (P/IA) al segundo servicio de un 47% (entre los 40 y 60 días), en comparación con los porcentajes del grupo control (grupo A) que sólo alcanzó el 26%.

#### **2.2.4.- Diagnóstico de gestación**

Para un buen manejo reproductivo del vacuno lechero es imprescindible disponer de un método de detección de las vacas gestantes y no gestantes que sea precoz y certero.

Si en una vaca no se observa **celo** alrededor de las 3 semanas después de la cubrición o IA, se considera preñada. Sin embargo, no todas las vacas con tal condición estarán gestantes, aún cuando el nivel de detección de celos sea muy bueno. Por otra parte, hasta un 7% de vacas gestantes mostrarán algunos signos de celo durante la gestación. Si se inseminan dichas hembras puede provocarse la muerte embrionaria (Broers, 1999).

El diagnóstico de gestación (DG) precoz (de 1 a 3 meses) por **palpación rectal** se basa en la asimetría de los cuernos uterinos y en un menor tono y una mayor fluctuación del cuerno gestante. Además, el deslizamiento de membrana y la palpación de la vesícula embrionaria son indicativos de gestación. Por otra parte se puede identificar en el ovario un CL ipsilateral al cuerno gestante.

En las gestaciones avanzadas (> 3 meses), la palpación rectal revela un cérvix situado en posición craneal respecto al borde pelviano, siendo difícil retraer el útero. Este está flácido y se pueden palpar los placentomas y el feto. El tamaño de la arteria uterina media aumenta y se puede palpar el frémito en su superficie.

La ventaja de la palpación rectal es que proporciona un resultado inmediato, y si ésta se realiza de forma precoz, entre 30-40 días, la ausencia de gestación permite adoptar medidas directas en las vacas vacías.

La determinación de **progesterona** en plasma o leche es un buen indicador de gestación precoz. Sus niveles aumentan hasta valores significativos entre el día 18 y 24 de la fecundación, debido al desarrollo de un CL funcional. Sin embargo, estas determinaciones si bien arrojan unas cifras de sensibilidad elevadas (93,1%), su especificidad es bastante baja (39,3%), dando un número elevado de falsos positivos, es decir vacas gestantes que en realidad no lo están (Pieterse *et al.*, 1989).

Estos errores de interpretación, limitan su uso, los que suelen deberse a procesos de piómetra, CL persistente, ciclos cortos, quistes luteínicos, además de un posible manejo incorrecto de las muestras y del test (Broers, 1999).

La **ecografía** a tiempo real (modo B) es un método fiable y relativamente simple para el diagnóstico de gestación del ganado vacuno. Los ultrasonidos permiten diagnosticar gestación a partir del día 26 desde la IA. La localización y la exploración del útero, mediante una sonda rectal, es fácil y requiere poco tiempo. Pieterse *et al.*, (1989) valoraron la sensibilidad y especificidad del DG obtenido por ecografía, entre los 26 y 33 días tras la IA, en un 97,7% y en un 87,8%, respectivamente.

La ecografía mejora a la palpación rectal, ya que permite de forma inmediata un DG más precoz, siendo también un método más exacto para el diagnóstico de no gestación, lo que permite adelantar las medidas o tratamientos en las vacas vacías (Pierson y Ginther, 1984). La desventaja de la ecografía, sigue siendo el coste del equipo, si bien en estos últimos años es cierto que resultan más económicos.

### **2.3.- FACTORES QUE AFECTAN A LA FERTILIDAD DE LAS NOVILLAS**

Además de los elementos intrínsecos relacionados con la propia fertilidad del semental y de la hembra, otros factores han sido relacionados con la fertilidad del ganado vacuno. Muchos de estos han sido objeto de estudio, especialmente aquellos que pueden incidir negativamente. La gran mayoría afectan a vacas multíparas (distintas enfermedades, periodo de lactación, factores metabólicos, condición corporal, etc.) siendo pocos los que afectan de manera similar a vacas y novillas. Entre estos, destacan ciertos factores medioambientales y todos los

relacionados con el manejo y técnica de la inseminación artificial (IA), los que igualmente pueden tener un importante impacto negativo sobre la reproducción, por lo que deben ser controlados, y que a continuación pasamos a revisar.

### **2.3.1.- El estrés por calor**

El estrés por calor puede potencialmente alterar la función reproductiva no sólo por acción de un efecto directo del exceso de temperatura, sino también como consecuencia indirecta de los mecanismos fisiológicos que se ponen en marcha para la regulación de la temperatura corporal (Hansen, 2007). La tensión térmica influye negativamente en la fertilidad bovina en varios aspectos, afectando a la gran mayoría de los componentes del sistema reproductivo, incluyendo: el ovocito, la granulosa y, en particular, células de la teca dentro del folículo preovulatorio, el desarrollo del embrión durante las primeras etapas, el CL, el endometrio uterino, y la hipófisis anterior (Wolfenson *et al.*, 2000).

Los efectos del estrés por calor son más pronunciados en las vacas lecheras en lactación, ya que la "producción de calor" es mucho más alta como consecuencia del plano de alimentación y de una mayor actividad metabólica y por tanto hay un aumento de la susceptibilidad a la hipertermia (Hansen, 2007). Las vacas lactantes manifiestan mayores aumentos en la temperatura corporal que las novillas expuestas a ambiente similar (Sartori *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que el estrés por calor es un factor que también puede influir negativamente en los porcentajes de fecundidad en el primer servicio de IA. Un estudio realizado por Wolfenson *et al.*, (1993) examinaron los efectos del estrés por calor agudo y la inyección de oxitocina en las concentraciones plasmáticas de PGF<sub>2α</sub> en novillas lecheras cíclicas y gestantes. Llegaron a la conclusión de que bajo condiciones de estrés térmico, el embrión no puede ser plenamente capaz de

inducir la inhibición de la síntesis endógena normal de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el endometrio de novillas preñadas, lo que podría conducir a la pérdida embrionaria.

En otro estudio realizado en Australia tropical (Orr *et al.*, 1993), se comprobó una reducción de los porcentajes de fecundidad del 80% al 55%, cuando la temperatura media máxima diaria aumentó de 26°C a 27,5°C. Así, cuando las temperaturas medias máximas fueron superiores a 27,6°C, los porcentajes de fecundidad para novillas, fueron siempre por debajo del 60% a 3 inseminaciones. Donovan *et al.*, (2003) analizaron distintos factores asociados con la concepción a la primera IA en novillas Holstein en Florida. La estación del año, fue evaluada como un factor ambiental, calculando que las novillas inseminadas durante la temporada de verano tenían un 76% menos de probabilidad de quedar gestantes a la primera IA, que las inseminadas durante el invierno.

### **2.3.2.- Manejo y técnica de la inseminación artificial**

Son muchos los factores asociados al éxito o fracaso de la IA, señalando entre los más importantes la habilidad y experiencia técnica, el manejo del semen, y el depósito correcto de semen en el útero durante la IA (Barth, 1993).

Una de las partes más críticas de la técnica de IA está en depositar el semen en el cuerpo uterino, por delante del cuello uterino (Nebel, 2007). En un estudio realizado por Peters *et al.*, (1984) en el que utilizaron la radiografía para localizar la punta del catéter de inseminar en el tracto reproductivo de la especie bovina, comprobaron que sólo el 40% de los catéteres de inseminación eran colocados en el cuerpo uterino. Un 82% de los técnicos eran incapaces de colocar la punta del catéter en el cuerpo uterino en el 60% de los casos, comprobando una amplia variación individual entre los técnicos inseminadores.



Se ha informado de que un error común de algunos técnicos es depositar el semen en el cuello del útero mientras se retira el catéter durante la IA (Zavy y Geisert, 1994). La retención de esperma en el tracto reproductivo femenino no difiere si los espermatozoides se depositan en el cuerpo o en los cuernos uterinos. Pero si el esperma se deposita en el cuello uterino hay una pérdida de esperma retrógrada que es casi dos veces superior a la pérdida observada tras el depósito del semen cuando se realiza en el cuerno uterino (Gallagher y Senger, 1989).

Obviamente, no sólo la localización del depósito del semen podría afectar a la utilización con éxito de la IA, sino también todo el proceso relacionado con la técnica de la inseminación. En un estudio realizado por DeJarnette y Marshall (2005), las interacciones del método de descongelación de las pajuelas en relación con el tipo de diluyente (basadas en leche o yema de huevo) sobre la motilidad espermática posterior fueron valoradas. Así la descongelación al aire limpiando la pajuela con una toalla de papel después de la retirada del contenedor de nitrógeno líquido de almacenamiento y colocando directamente en el catéter de inseminación, se asoció a una menor motilidad y fertilidad de los espermatozoides, frente a la descongelación introduciendo la pajuela en un baño maría a 35°C.

En otro estudio (Dalton *et al.*, 2004), los factores asociados con la técnica de la inseminación y los posteriores porcentajes de fecundidad (P/ IA) fueron comparadas en vacas lecheras entre dos grupos de inseminadores: profesionales-técnicos y ganaderos. Para los ocho rebaños comerciales que participaron en el estudio, se obtuvo un porcentaje medio de fecundidad (P/IA) de un 45% frente a un 27% para los rebaños inseminados por profesionales-técnicos y ganaderos, respectivamente. Reafirmandose que los técnicos podrían maximizar los porcentajes de fecundidad (P/IA) si se llevan a cabo los distintos procedimientos relacionados con la técnica de la inseminación con cuidado, tales como realizar un correcto proceso de descongelación del semen, utilizar procedimientos de higiene adecuadas, mantener la protección térmica de la pajuela durante el montaje en el

catéter de inseminación, realizar un correcto manejo, transporte y sujeción de la vaca y asegurar el depósito del semen en el útero dentro de un margen de tiempo de aproximadamente 15 minutos desde la descongelación. Según lo sugerido por Nebel (2007), el semen de más alta calidad colocado en la vaca más fértil en el momento justo puede no resultar en una gestación si la técnica de inseminación no se realiza correctamente. Esta última afirmación resume la importancia del desempeño técnico durante el proceso de IA

### **2.3.3.- Calidad del semen y fertilidad de los sementales**

Obviamente, la calidad del semen utilizado para la IA está claramente asociada con el éxito de la misma. Las diferencias en la viabilidad después de la descongelación del esperma, la progresión de los espermatozoides en el tracto genital interno femenino, la capacitación espermática, la reacción del acrosoma y la capacidad de fertilización son factores que influyen en los resultados de gestación (Januskauskas *et al.*, 1999; Hunter, 2003).

Las deficiencias seminales que conducen a unos menores porcentajes de fecundidad (P/IA) pueden ser calificadas como compensables o incompensables. El esperma de machos con deficiencias compensables requiere de un mayor número de espermatozoides para aumentar las tasas de gestación, ya que estos defectos afectan al transporte y a la función de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino, incluyendo la iniciación del proceso de fecundación. Cuando las diferencias en la fertilidad en los machos son independientes de la dosis del esperma entonces las deficiencias seminales se califican como incompensables. Estas deficiencias son importantes para el suceso y mantenimiento de la fecundación y la posterior embriogénesis (Saacke *et al.*, 2000; Saacke, 2008a, b).

En el caso de deficiencias compensables, existen diferencias entre los toros en relación al momento de la inseminación (Dalton *et al.*, 2001). Así, los toros con semen con deficiencias compensables altas, además de ser más vulnerables a las tasas de dilución y la competencia del inseminador, requieren que la IA sea lo más próxima posible al momento de la ovulación, para optimizar la eficacia del acceso del espermatozoides al óvulo (Saacke, 2008b). Mientras que los sementales que tienen deficiencias compensables bajas permiten que la IA se realice en un lapso de tiempo más amplio con respecto al momento de la ovulación.

En un estudio realizado por Kasimanickam *et al.*, en 2008 se evaluó el posible efecto del semen de 3 sementales distintos, en el resultado de gestación en vacas de carne sincronizadas con los protocolos Ovsynch + CIDR<sup>®</sup> y Co-Synch + CIDR<sup>®</sup> para IATF. No se encontraron diferencias entre los porcentajes de fecundidad (P/IATF) entre los protocolos, Ovsynch + CIDR<sup>®</sup> (54,4%) y Co-Synch + CIDR<sup>®</sup> (52,2%). Sin embargo, sí se detectaron diferencias entre los porcentajes de fecundidad (P/IATF) según semental, siendo de 53,2%, 48,1% y 58,7% para los sementales de 1, 2 y 3 respectivamente. El semental 2 ofreció un porcentaje de fecundidad significativamente más bajo en comparación con el semental 3.

Estos autores concluyeron que hay diferencias en la fertilidad de los sementales, independientemente del protocolo utilizado para la IATF, posiblemente debido a las diferencias del proceso de la capacitación espermática de los diferentes sementales.

### **2.3.4.- Factores del ciclo estral que afectan a la fecundación y a la supervivencia del embrión.**

El nivel de crecimiento folicular, la duración del proestro y el grado de funcionamiento del CL son características fisiológicas que han sido relacionadas

con la fertilidad de la hembra en el ganado vacuno. Estos aspectos de la fisiología de la reproducción, aunque difíciles de controlar, son susceptibles de ser modificados mediante tratamientos hormonales, lo que ha permitido comprobar mejor sus efectos sobre la fecundación y la supervivencia embrionaria. A partir de estos conocimientos se han desarrollado distintas estrategias con el fin de mejorar la fertilidad y la eficacia de la IA, conocimientos que se están actualizando continuamente, lo que provoca una constancia en el desarrollo de nuevas estrategias.

### **Duración del proestro y la maduración del folículo**

Se encontró que la ovulación inducida con GnRH de folículos menores de 11 mm de diámetro producen un descenso en los porcentajes de fecundidad (P/IA) y un aumento de la mortalidad embrionaria tardía en vacas de carne (Perry *et al.*, 2005). Además, se ha informado de que para un diámetro determinado, la fertilidad del folículo ovulatorio está estrechamente relacionado con la duración del proestro y de la capacidad del folículo ovulatorio para producir concentraciones elevadas de estradiol anteriores a la IATF y que la reducción de la duración del proestro induce a ciclos cortos de CL con reducción en los porcentajes de fecundidad (Mussard *et al.*, 2003; 2007).

Mussard *et al.*, (2003, 2007) atendiendo a la hipótesis de la relación directa entre la función del CL y fertilidad, comprobaron menores porcentajes de fecundidad (P/IA) en vacas de carne que fueron inducidas a ovular cuando los folículos aún no habían alcanzado la plena madurez, en comparación con las vacas que exhibieron estro y ovularon espontáneamente. Estos autores, tras la sincronización de la onda folicular mediante la aspiración del folículo y la administración de una inyección de PGF<sub>2α</sub> entre 1,5 y 2 días después para inducir luteolisis, controlaron el crecimiento folicular por ultrasonido, y cuando el folículo

dominante alcanzó los 10 mm de diámetro, las vacas recibieron 100 µg de GnRH para inducir la ovulación o ningún tratamiento de manera que las vacas pudieran ovular espontáneamente. La inseminación artificial se realizó 12 horas después del inicio del celo en las vacas con ovulación espontánea y 12 horas después de la inyección de GnRH en el tratamiento con GnRH. El diámetro de los folículos con ovulación espontánea fue de alrededor de 12 mm y las concentraciones plasmáticas de progesterona durante la fase luteal media posteriores también fueron mayores. Estos autores llegaron a la conclusión de que la inducción prematura del pico de LH reduce el diámetro del folículo ovulatorio, la función lútea, y el porcentaje de fecundidad (P/IA).

En un segundo estudio Mussard *et al.*, (2003) compararon en vacas de carne la fecundidad en función de una inducción ovulatoria con GnRH de folículos grandes y maduros, frente a folículos pequeños e inmaduros. Estas vacas también fueron sincronizadas por aspiración folicular pero, en este caso, con una sola dosis de PGF<sub>2α</sub> que se administró cuando el folículo dominante emergente alcanzó un diámetro de 8 mm. La ovulación se indujo con 100 µg de GnRH cuando el diámetro del folículo dominante alcanzó los 10 mm en el grupo de vacas con folículo pequeño o 13 mm en otro grupo de vacas con folículo grande. La IA se realizó 12 h después de las inyecciones de GnRH. Las vacas que fueron inducidas a ovular un folículo más pequeño tenían menores concentraciones de progesterona y un descenso de hasta un 4,4% en el porcentaje de fecundidad en comparación con las vacas que ovularon con un folículo de 13 mm de diámetro, las que presentaron un porcentaje de fecundidad del 57,4%.

Para determinar si la disminución del porcentaje de fecundidad observado cuando las vacas son inducidas a ovular un folículo más pequeño, era debido a defectos en la fertilización, a defectos en el desarrollo embrionario, a una mortalidad embrionaria temprana, o una combinación de todos estos factores, se realizó un tercer experimento.

Este tercer ensayo consistió en que novillas de carne recibieron un tratamiento de sincronización/ovulación similar al del estudio anterior, pero en lugar de ser inseminadas después de la ovulación inducida por GnRH, a las novillas se les implantó un embrión en el día 7 después del pico de LH. Las novillas inducidas a ovular un folículo grande (13 mm de diámetro) tenían 66,7% de gestación a los 30 días frente a sólo un 8,3% de las novillas que ovularon un folículo más pequeño (10 mm), que también presentaron unas concentraciones de progesterona más bajas. Estas diferencias ponen de relieve el hecho de que la ovulación de un folículo pequeño podría afectar a la capacidad para mantener la gestación, en lugar de causar un fallo en la fecundación.

Con estos resultados, los autores concluyeron que la ovulación de los folículos inmaduros no sólo afecta a la competencia de los ovocitos, sino que también influyen sobre el ambiente uterino necesario para mantener la gestación.

Los autores también señalaron la diferencia significativa entre los porcentajes de fecundidad (P/IA) en vacas que fueron inducidas a ovular un folículo con diámetro de 10 mm en estos experimentos, ya que en el primer experimento el porcentaje de fecundidad (P/AI) era del 75,9%, pero sólo fue el 4,4% en el segundo experimento. Ellos atribuyeron este hecho a la diferencia en los tiempos transcurridos desde que aplicó la inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que en el primer experimento ésta coincidió con la regresión luteal mientras que en el segundo experimento, la regresión luteal no fue inducida hasta que el folículo dominante alcanzó 8 mm de diámetro. Por lo tanto, el período más largo de proestro alcanzado en el primer experimento podría inducir una mayor estimulación gonadotrópica y un mayor desarrollo del folículo dominante, en comparación con un folículo dominante del mismo diámetro desarrollado con un período más corto de proestro. Todo esto condujo a la hipótesis de que la duración del proestro es tan importante como el diámetro del folículo en la

determinación de la competencia del folículo, calculada por el porcentaje de fecundidad (P/IA).

La hipótesis fue confirmada en un reciente estudio realizado por Bridges *et al.*, (2010), que comparó la fecundidad y las concentraciones de estradiol durante el proestro con características del ciclo estral subsiguiente en vacas de carne, con intervalos largos y cortos de proestro. Después de la sincronización de la onda folicular a través de la aspiración folicular, el folículo dominante fue inducido a ovular con una inyección de GnRH a los 2,25 días (grupo de proestro largo) o a los 1,25 días (grupo de proestro corto). El diámetro del folículo ovulatorio fue similar en los dos tratamientos (alrededor de 13 mm en un grupo y 12 mm en el otro). El proestro se define como el período entre la inyección de PGF<sub>2α</sub> y el pico de LH inducido por la GnRH. Estos autores encontraron que las vacas con un proestro más largo tenían un mayor porcentaje de fecundidad (P/IATF), (50% frente a sólo el 2,6% para las vacas con proestro corto), una mayor concentración de progesterona, una menor duración de fase lútea en la fase lútea posterior y una mayor concentración de estradiol durante el periodo de proestro (de -1,9 día a día 0 de la administración de GnRH). Con estos resultados pusieron de relieve que las características foliculares, más allá del diámetro folicular, son críticos en la determinación de la madurez del folículo, la probabilidad de una fase lútea de duración normal y el porcentaje de fecundidad.

Atendiendo a todos estos resultados descritos, los programas de sincronización a IATF deberían ser modificados de tal manera que garanticen el desarrollo fisiológico de folículos maduros en el ovario. Una modificación consiste en acortar el intervalo entre la primera inyección de GnRH y la inyección de PGF<sub>2α</sub> y otra opción consistiría en alargar el intervalo entre la inyección de PGF<sub>2α</sub> y la segunda inyección de GnRH (Bridges *et al.*, 2008).

## **Mantenimiento y grado de funcionamiento del cuerpo lúteo**

El mantenimiento del CL como una fuente de secreción de progesterona es esencial para la gestación. Alrededor de 12 días después de la fecundación, las células mononucleares de la *trophectoderm conceptus* secretan interferón  $\tau$  (Thatcher *et al.*, 2001), alcanzando un pico de concentración en el lumen uterino entre los 15 y 17 días de gestación. Esta proteína inhibe la expresión de receptores de oxitocina en el epitelio luminal y, en consecuencia, inhibe la liberación episódica de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a partir del endometrio (Farin *et al.*, 1990; Demmers *et al.*, 2001). Algunas de las pérdidas embrionarias en el ganado vacuno podrían ocurrir debido a que el  $\tau$  interferón secretado por el concepto no es capaz de inhibir la cascada luteolítica provocada por la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Thatcher *et al.*, 2001). Por lo tanto, una estrategia para aumentar la supervivencia de los embriones podía ser inhibir la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  con el fin de inhibir el proceso luteolítico, especialmente útil para embriones que están ligeramente retrasados en su desarrollo (Guzeloglu *et al.*, 2007).

El flunixin meglumine (FM) es un potente agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE), que inhibe la ciclooxigenasa, evitando así la conversión de ácido araquidónico a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Odensvik, 1995). El tratamiento con FM administrado a las vacas mediante inyecciones intramusculares dos veces al día durante los primeros 6 días después del parto inhibe la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , como se refleja por una disminución en la concentración de 13, 14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  (PGFM) en la sangre periférica (Guilbault *et al.*, 1987). En un estudio realizado por Guzeloglu *et al.*, (2007) en el que a novillas Holstein se les administró dos dosis de 1,1 mg / kg de FM con 12 horas de diferencia entre los 15,5 y 16 días de gestación (después de una IATF) y se compararon con los controles (novillas sin tratamiento de FM). Las novillas que recibieron FM obtuvieron un porcentaje de fecundidad (P/IATF) de un 76,9% a los 29 días y del 69,2% a los 65 días,



mientras que los porcentajes de fecundidad (P/IATF) en los controles fue de un 50% y un 46,2%, respectivamente. La aplicación de FM aumentó la supervivencia embrionaria en este estudio.

## **2.4.- SEMEN SEXADO**

La predeterminación del sexo de las crías del ganado ha sido planteada desde hace años como una demanda para conseguir una producción más eficiente. En la actualidad los cambios que han sufrido los sistemas de producción animal hacen que esta preselección del sexo de la descendencia sea cada vez más necesario en busca de incrementar la rentabilidad (Johnson, 2000). Incluso en nuestro País, en el ganado vacuno resultaría imprescindible para poder soportar las fluctuaciones del mercado, que hacen insostenible el balance económico de la producción.

Hoy en día, el semen sexado para el ganado vacuno es un producto comercialmente disponible y suficientemente fiable, para ser utilizado con garantías y rentabilidad no sólo en fertilización "*in vitro*" y transplante de embriones, sino en la inseminación artificial (IA) de las hembras, especialmente en las que presentan los mayores porcentajes de fecundidad, como pueden ser las novillas y vacas primíparas.

Los avances y mejoras realizadas en la tecnología de separación, obtención y conservación del semen sexado produjeron su puesta en el mercado a principios del siglo XXI. La aplicación comercial de semen sexado en Estados Unidos comenzó en 2003 con la concesión de una licencia de clasificación para Sexing Technologies Inc. (Navasota, TX), siendo Select Sires Inc. (Plain City, OH) la primera organización importante de IA en Estados Unidos en ofrecer la tecnología comercialmente.

Poco a poco el resto de las empresas o centros de inseminación, utilizando la misma tecnología, han ido incorporando el semen sexado de sus sementales en el mercado nacional e internacional. En los últimos años la mayoría de las empresas de semen bovino comercializan semen sexado tanto en vacuno de leche como en vacuno de carne.

### **2.4.1.- Características del semen sexado**

Según la RAE (Real Academia de la lengua Española), el semen es el "conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de los animales y de la especie humana".

La calidad del semen vendrá dada en gran medida por la calidad de los espermatozoides, que son las células germinales masculinas, muy especializadas y cuya función principal es fecundar al óvulo (Hurtado, 2014). Para valorar esta calidad se miden ciertos parámetros como son la concentración, la motilidad, la viabilidad, el estado del acrosoma, la funcionalidad y la morfología de los espermatozoides (Hidalgo *et al.*, 2005).

Según Hidalgo *et al.* (2005), una mayor concentración de espermatozoides supone una mayor probabilidad de fecundación. Además, otras características que debe de tener el semen fecundante son: morfología normal, integridad de las membranas y metabolismo energético de los espermatozoides; motilidad progresiva, dependiente del estado de la cola; capacidad de penetración, basada fundamentalmente en el buen estado de la cabeza; y características enzimáticas, acumuladas fundamentalmente en el acrosoma. Por último, es importante que transfiera adecuadamente el material genético.

En las últimas décadas, se hizo necesaria la búsqueda de alternativas a la inseminación con semen convencional, para aumentar la proporción de hembras

nacidas en vacuno de leche. Esto se consiguió a finales de la década de los 80, gracias a la capacidad de diferenciación de los espermatozoides con cromosomas X e Y, y a la aplicación de este descubrimiento en la preparación de dosis sexadas (Wheeler *et al.*, 2006).

El semen sexado es, por tanto, un producto relativamente moderno con el que se obtiene mayor proporción de terneros de un sexo que del otro, a diferencia de lo que ocurre en la inseminación convencional, con la que las probabilidades de obtener individuos de cada sexo son del 50% (Garner & Seidel, 2008; Cabrera, 2013).

#### **2.4.2.- Utilización del semen sexado**

En el caso del vacuno lechero, su eficacia radica en que las terneras tienen mucho mayor valor productivo que los terneros (Cabrera, 2013).

La utilización de semen sexado aumenta el porcentaje de hembras nacidas y, por tanto, podría hacer frente a un porcentaje de reposición mayor, disminuyendo los gastos en el caso de la compra de animales externos a la explotación y los riesgos sanitarios que ésta supone. Por eso, el uso de semen sexado proporciona mayores beneficios económicos cuando se aplica en rebaños en expansión, ya que la necesidad de hembras de reposición en estos rebaños es mayor (Hosseini-Zadeh *et al.*, 2010).

En algunos casos, el mayor número de hembras no solo se utiliza para reposición en la propia explotación, si no que también se pueden vender esas hembras aumentando el rendimiento económico (Pérez-Marín, 2009).

Además, actualmente, se conoce la genética de los animales, tanto de hembras como de machos, por lo que sirve también para seleccionar los de mayor valor genético y obtener de ellos hembras que serán el futuro de la explotación. Para que el aprovechamiento de los mejores animales de la explotación sea máximo y para aumentar las probabilidades de concepción en las novillas a inseminar con este tipo de semen, es importante tener buenos registros y bases de datos sobre la genética y las patologías reproductivas de los animales, utilizando solo a los que presenten unas características óptimas (Pérez-Marín, 2009).

Además, las terneras nacidas a partir del semen sexado, al ser hembras, son de menor tamaño, por lo que el parto es más fácil y el daño a la madre menor, mejorando así la fertilidad posterior y los partos futuros (Hohenboken, 1999). Además, los toros que se utilizan para producir este tipo de semen también están probados para la facilidad de parto (Pérez-Marín, 2009).

El semen sexado puede tener también otros usos como la fertilización in vitro y el trasplante de embriones, aumentando así el número de crías que se pueden obtener a partir de una hembra de gran valor genético o económico (Johnson, 2000).

### **2.4.3.- Procedimiento de obtención del semen sexado: clasificación de los espermatozoides X e Y.**

En el semen sexado, las fracciones de espermatozoides con cromosomas X e Y se obtienen a través de la selección y clasificación de una mezcla de semen natural. En una eyaculación, el semen contiene aproximadamente un 50% de espermatozoides X o Y. Como punto de partida ha sido necesario conocer las características de cada espermatozoide, con cromosoma X o con cromosoma Y.

Entre las diferentes características entre los espermatozoides con cromosoma X e Y se han descrito: el tamaño, la densidad y el peso, la velocidad de natación, las cargas eléctricas superficiales, las proteínas macromoleculares de superficie, los efectos a cambios de pH, y los efectos a cambios de la presión atmosférica (Summer y Robinson, 1976; Ericsson y Glass, 1982). Sin embargo, las diferencias observadas en estas características entre los cromosomas X e Y eran tan pequeñas que hacían imposible utilizarlas como base para fines de selección y separación. La diferencia más importante que permitió el desarrollo del procedimiento de clasificación es la diferencia en el contenido de ADN entre los cromosomas X e Y. Esta característica fue sugerida por primera vez por Morruzi (1979) quien informó que en la especie bovina, los espermatozoides con cromosoma X presentan un 4,2% más de ADN.

A partir de entonces, han sido realizados diferentes intentos para separar los espermatozoides basándose en su contenido de ADN. El mejor procedimiento fue desarrollado por Garner *et al.* (1983) que demostró que el método de citometría de flujo era capaz de determinar con precisión las diferencias de contenido de ADN entre los espermatozoides X e Y. Sin embargo, los espermatozoides no sobrevivían al proceso de tinción necesario para el análisis. Utilizando la metodología de citometría de flujo, se detectó que la diferencia real en el contenido de ADN entre los espermatozoides X e Y del vacuno es de un 3,7%.

El método válido para separar espermatozoides vivos fue desarrollado por Johnson (1987a, b). La tinción vital utilizada fue el Hoechst 33342, que tiñe el ADN de los espermatozoides intactos sin matarlos. El método consiste en la clasificación por citometría de flujo modificada de células activadas por fluorescencia (Figura 2-10), conocido en inglés como el "Beltsville Sperm Tecnología Sexing" patentado por la USDA (US Patent # 692958, 04.26.1991), con el Dr. Lawrence Johnson como el inventor.

El nacimiento de más 50 conejos con el sexo prefijado fue la primera referencia bibliográfica en la que se comprobaba la utilización eficaz del semen sexado obtenido por esta tecnología (Johnson *et al.*, 1989). Poco después Johnson y Seidel en 1989 (citado por Johnson, 2000) señalan que más de 1.500 crías animales y humanas habían nacido usando esta metodología, hasta constatar su perfecta validación en base a los nacidos vivos, re-análisis de laboratorio del semen sexado, y mediante biopsia del embrión para determinar el sexo (Johnson, 2000).

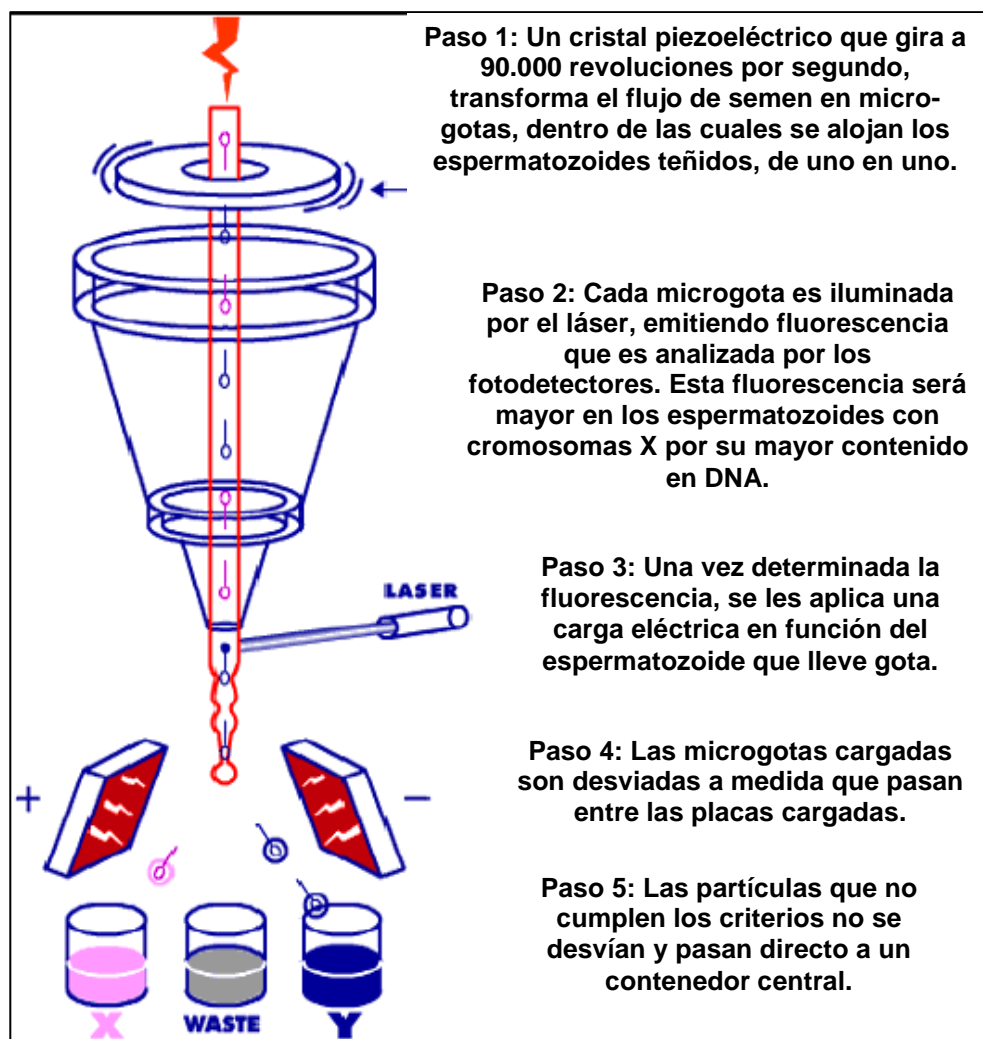
#### **2.4.4.- Obtención del semen sexado "Tecnología Sexing Beltsville Sperm"**

Como ha sido señalado, la diferencia en el contenido de ADN en los espermatozoides X e Y, permite obtener el semen sexado por la técnica de citometría de flujo modificada (Figura 2.4.1), que es "un método automatizado, multiparamétrico y cuantitativo que analiza las señales dispersadas y fluorescentes producidas por una célula al pasar por un haz de luz" (Laguado, 2007).

La técnica de citometría de flujo para la clasificación y separación de espermatozoides consiste en los siguientes pasos (Garner y Seidel, 2008):

- El espermatozoide diluido se incubó con el colorante Hoechst 33342, que tiñe el contenido de ADN de los espermatozoides X e Y.
- Después de la tinción, los espermatozoides se hacen pasar en una corriente por delante de un rayo láser con una longitud de onda específica.
- El Hoechst 33342 emite fluorescencia mediante la excitación con la luz UV. Debido a la concentración de ADN más alta de los espermatozoides X, estos emiten un poco más de luz que los espermatozoides Y.

- La fluorescencia emitida por el flujo de los espermatozoides se mide en un tubo fotomultiplicador, que se registra por un ordenador en un solo archivo.
- Un vibrador de cristal divide la corriente en gotas individuales, con el fin de que cada una contenga un solo espermatozoide.



**Figura 2.4.1.** Esquema de la obtención de semen sexado. Tras la tinción del ADN de los espermatozoides se hacen pasar por el citómetro de flujo incorporados a microgotas. Los espermatozoides son clasificados en función de la cantidad de ADN del cromosoma (X e Y) mediante cantidad de fluorescencia emitida y recogidos por separados en función de la carga eléctrica proporcionada (negativa o positiva). Los espermatozoides que no emiten fluorescencia o no cumplen los requisitos de identificación son desechados. (Johnson, 2000).

- Las microgotas están cargadas positivamente o negativamente de acuerdo con el contenido de ADN.
- Las gotas caen más allá de los campos eléctricos positivos y negativos, los separa en dos corrientes de colección.
- Las microgotas sin carga se descartan en una tercera corriente, que contiene espermatozoides que no pueden ser sexados con precisión (más de la mitad), que no contienen un espermatozoide, que contienen dos espermatozoides (raramente), o que contienen espermatozoides muertos.

Con las fracciones obtenidas de espermatozoides X e Y, se hacen pajuelas para Inseminación Artificial (IA) que contienen 0,25 ml de semen y 2 millones de espermatozoides (Pérez Marín, 2009).

Los porcentajes de pureza para los espermatozoides X o Y que se alcanzan con esta clasificación de flujo pueden acercarse fácilmente al 95% (Johnson 1992), (Rath *et al.*, 1999, citado por Johnson, 2000), si bien varía para cada especie animal en función de la diferencia de ADN que tienen los espermatozoides X e Y. Cuanto mayor es el porcentaje de ADN que contienen el cromosoma X frente al Y, mayor porcentaje de separación, si bien otros factores, también pueden intervenir en el grado de pureza alcanzado, tales como espermatozoides muertos, morfología anormal y forma de la cabeza, etc., (Johnson, 2000).

Con los primeros clasificadores o sistemas de "velocidad estándar", las muestras eran ordenadas con una velocidad de unos 400.000 espermatozoides por hora (Johnson *et al.*, 1989). De tal manera, que para una dosis de inseminación estándar que contenga 20 millones de espermatozoides, se precisaban 25 horas para ordenar una dosis de inseminación de 10 millones de espermatozoides de cada cromosoma (X o Y), lo que hacía extremadamente difícil



la aplicación comercial de semen sexado. Afortunadamente, la tecnología para clasificar esperma se desarrolló aún más (Johnson y Welch, 1999), hasta alcanzar unas velocidades de clasificación de 6.000 o más espermatozoides/segundo, con más de un 90% de precisión. De esta forma, actualmente la operación rutinaria del citómetro de flujo clasificador del esperma sexado, permite ordenar unos 6 millones de espermatozoides de cada sexo por hora (Jonson, 2000).

No obstante, el procedimiento de obtención de semen sexado sigue siendo poco práctico y muy lento para alcanzar las cifras de las dosis convencionales, en torno a 20 millones de espermatozoides por dosis (Seidel y Garner, 2,002). Sin embargo, para utilizar el semen sexado de manera eficiente se ha llegado a establecer como la dosis más baja que proporciona una fertilidad satisfactoria fuera de al menos 2 millones de espermatozoides congelados (Den Daas *et al.*, 1998; Seidel *et al.*, 1999). Actualmente, esta cantidad es el promedio de espermatozoides que incorporan las pajuelas de semen sexado.

En el ganado vacuno, la posibilidad de congelar el semen sexado supuso el paso definitivo para el uso generalizado de esta tecnología y su comercialización. Schenk *et al.* (1999) reportaron, tras la congelación de los espermatozoides sexados, que estos presentaban una movilidad media después de la descongelación de un 30-35%. Estos resultados fueron similares a los resultados obtenidos por Johnson *et al.*, en 1996 (citado por Johnson, 2000), los que señalan una motilidad post-descongelación promedio de un 35% y porcentaje de acrosomas intactos de 40%. Más tarde, Seidel *et al.* (1999) informaron el nacimiento de terneros utilizando esperma de toro sexado congelado-descongelado, utilizando una dosis de 1,5 millones de espermatozoides depositados en los cuernos uterinos de las madres. El sexo de la descendencia fue esencialmente como se predijo y se acercaron a 90% macho o hembra, dependiendo del sexo predominante del semen que se utilizó.

### **2.4.5.- Inconvenientes del semen sexado**

Desde el punto de vista de la técnica de obtención, el principal inconveniente es que solo el 30% de los espermatozoides son aprovechados. A pesar de las mejoras alcanzadas en la tecnología, la obtención sigue siendo un proceso lento por lo que el número de pajuelas obtenidas en un día es limitado. Este hecho ha determinado la disminución en la concentración de espermatozoides por dosis, de 12-15 millones de espermatozoides/pajuela de semen convencional a 2-2,5 millones de espermatozoides /pajuela en el semen sexado, para que el producto sea rentable (Pérez-Marín, 2009).

Además, debido a la dilución del esperma para elaborar este tipo de semen, a su congelación como método de conservación y a la menor capacitación de los espermatozoides por los daños sufridos durante el proceso de separación, Wheeler et al. (2006) indican como una de las principales desventajas del semen sexado frente al convencional es la de proporcionar unos menores porcentajes de fecundidad y fertilidad.

Centrándose más en la parte económica, Pérez- Marín (2009) observa que las dosis seminales sexadas son más caras que las convencionales y por lo que su uso debe ser restringido, casi exclusivamente a novillas. Además, destaca que la variedad de sementales a partir de los cuales se obtiene este tipo de semen es menor, aumentando las posibilidades de que exista consanguinidad en las explotaciones. Por último, recalca que se debe llevar a cabo un exhaustivo control animal y que el celo debe ser, preferentemente, natural, lo que se opone al uso de programas de inseminación artificial a tiempo fijo.

El beneficio que proporciona el uso de semen sexado depende, en gran medida, de la tasa de fertilidad del rebaño, y esto se basa fundamentalmente en el manejo y control de los animales por parte de los ganaderos (Seidel Jr, 2003).

## **2.4.6.- La fertilidad del semen sexado frente al semen convencional**

Los resultados de los estudios que utilizan semen sexado demuestran que esta tecnología proporciona una descendencia del 90% con el sexo deseado, pero con menores porcentajes de fecundidad. La concentración más baja de espermatozoides por dosis y la reducción de la viabilidad del esperma han sido señaladas como causas de estos menores porcentajes de fecundidad (P/IA) en comparación con las obtenidas con semen convencional (Seidel *et al.*, 1999). Por otra parte, la viabilidad del semen sexado se ve reducida por las tensiones físicas y químicas que se producen durante el proceso de clasificación. Estas tensiones incluyen alta dilución de los gametos, la tinción con el colorante de unión a ADN Hoechst 33342, las fuerzas mecánicas durante la clasificación, la luz del rayo láser UV, y la proyección en el tubo de recogida bajo alta presión y centrifugación (Garner, 2006).

Los porcentajes de fecundidad (P/IA) esperables con semen sexado oscilarían entre un 70 y un 80% de las obtenidas con el mismo semen convencional, siempre y cuando se realice una excelente gestión del ganado, es decir, las novillas con excelente condición corporal, con edad adecuada, inseminadas a celo detectado por inseminadores altamente cualificados, hasta valores entre 50-60% de las tasas obtenidas con semen convencional cuando las condiciones no son tan favorables (Seidel *et al.*, 1999).

En un estudio reciente realizado por DeJarnette *et al.*, (2009) se valoró en un 80% el porcentaje de fecundidad de una granja de 211 vacas que fueron inseminadas con semen sexado, con respecto a la obtenida con semen convencional. Sin embargo, los autores advierten que los resultados podrían presentar cierto sesgo, debido a la utilización preferente de semen sexado en los primeros servicios en novillas que mostraron signos inequívocos de estro. Así, otro

factor que influye en el porcentaje de fecundidad es el método por el que se lleve a cabo el control de los celos, siendo un 15% superior en las granjas en las que el celo es natural que en las que se hace inseminación artificial a tiempo fijo (Pérez-Marín, 2009).

No obstante, estudios posteriores han demostrado que, debido a las mejoras en la obtención y congelación de este tipo de semen, las diferencias se han reducido, aunque sigue siendo inferior la tasa de concepción cuando se utiliza semen sexado (Hall *et al.*, 2010; Cooke *et al.*, 2014). En este sentido, la reciente aparición en el mercado del denominado semen "**sexed ultra**" (Sexing Technologies), ofrece cuando menos un 94% de efectividad en comparación con el semen convencional (Moreno, 2015).

En otros parámetros a tener en cuenta en toda gestación, como son la duración de la misma, el peso de la cría al nacimiento, la facilidad del parto, el vigor de la ternera o el peso al destete, no se apreciaron diferencias respecto al uso de semen convencional (Tubman *et al.*, 2004).

Según Seidel Jr (2003), tampoco existen diferencias en la tasa de abortos, en la mortalidad neonatal ni en las anomalías que sufren los animales al nacimiento.

#### **2.4.7.- Validación del semen sexado en novillas de leche**

Uno de los primeros estudios con semen sexado antes de su aplicación comercial fue realizado por Seidel *et al.*, (1999). En este estudio, se realizaron un total de 11 ensayos en diferentes localidades, 7 de ellos con novillas de carne y 4 con novillas Holstein. Se compararon los porcentajes de fecundidad (P/IA) obtenidos con semen sexado depositado en el cuerpo o cuernos uterinos a dosis

de 1,5 o 3 millones de espermatozoides frente a las obtenidas con semen convencional a dosis regulares de 20 millones de espermatozoides depositados en el cuerpo del útero.

En los 4 ensayos realizados en novillas Holstein, la sincronización del estro de las novillas se realizó con una inyección única o doble de PGF<sub>2α</sub> (con 14 días de diferencia), seguida de IA a celo detectado. La fecundidad media (P/IA) a los 60 días, para la dosis de 1,5 millones de semen sexado fue de 46,1% y 41,0% en función del depósito en cuerpo o cuerno uterino, respectivamente. Cuando se utilizaron las dosis de 3 millones, los porcentajes de fecundidad fueron de 46,5% y 33,0% para el cuerpo y el cuerno uterino, respectivamente. La fecundidad total (P/IA) obtenida en los ensayos con semen sexado en torno a los 60 días para todas las novillas fue 42,7% (157/368), frente al porcentaje de fecundidad obtenido con semen convencional del 69,5% (82/118) en torno a los 60 días.

En estos primeros ensayos de campo, en los que se utilizaron más de 1.000 novillas, quedó demostrada la eficacia de esta tecnología en un entorno práctico y se comprobó el potencial real del semen sexado en el ganado vacuno, lo que fue fundamental para la comercialización del semen sexado para la IA en esta especie.

Posteriormente, varias pruebas de campo realizadas con vacas nulíparas entre 1999 y 2004 fueron revisados por Weigel (2004). Los porcentajes de fecundidad (P/IA) en estos ensayos de campo osciló entre un 35 - 40% con semen sexado, comparado con el 55 - 60% con semen convencional, con un porcentaje de descendencia hembra en torno al 90% lo que confirmaba la validación de la IA con semen sexado.

Por otra parte conviene recordar la especial importancia que tiene a la hora de realizar una cuidadosa selección de los sementales para la IA, basar ésta en un

análisis preciso de su fertilidad en condiciones de campo (Bodmer *et al.*, 2005; Cerchiaro *et al.*, 2007). Así, se han observado importantes variaciones entre los porcentajes de fecundidad en función de los sementales utilizados para las dosis de semen sexado (Seidel y Schenk, 2008). La monitorización de resultados de fertilidad del semen sexado y el uso de sementales con la más alta fertilidad optimiza la fertilidad global del semen sexado (Frijters *et al.*, 2009).

#### **2.4.8.- Utilización del semen sexado en las granjas lecheras**

Como ha sido señalado los estudios realizados demuestran que los porcentajes de fecundidad (P/IA) obtenidas con semen sexado en novillas de leche son inferiores a las obtenidas con semen convencional. A pesar de la menor fertilidad, el uso de semen sexado en las explotaciones de vacuno de leche se justifica por una mejor capacidad económica de obtener novillas de reposición, mitigar algunos de los efectos de las altas tasas de desecho involuntario y baja eficiencia reproductiva. Por otra parte, la IA con semen sexado con espermatozoides con cromosomas X en novillas nulíparas disminuiría la incidencia de la dificultad de parto, porque las terneras son más pequeñas que los machos (Weigel, 2004).

Los costes de inversión en la IA con semen sexado para los productores de leche de vaca dependerán de muchos factores, tales como los porcentajes de reducción en la fecundidad, los precios del semen sexado disponible comercialmente, la proporción de hembras nacidas, el valor económico diferencial entre hembras y machos, etc. Muchos de estos factores pueden cambiar considerablemente de un rebaño a otro y de un año a otro (Thorban, 2008). Estudios realizados en la Universidad de Wisconsin-Madison estiman en casi 30 dólares de ingresos extras por novilla cuando se usa semen sexado en los dos

primeros servicios con respecto al semen convencional, siendo el retorno mayor cuanto más alto sea el valor de la novilla y la cría hembra nacida.

Para garantizar una fecundidad aceptable, Select Sires recomienda restringir el uso de semen sexado al primer y segundo servicio de novillas nulíparas cíclicas con celo detectado. El uso de un programa de IATF en ausencia de estro observado ha sido señalado como muy desalentador (Thorban, 2008; DeJarnette *et al.*, 2009). Sin embargo, son escasos los estudios, por lo que hay una falta de investigación sobre la aplicación de los protocolos de IATF utilizando semen sexado en novillas de leche. La mayor disponibilidad de semen sexado comercial, junto con la utilidad de nuevos protocolos de IATF, podrían determinar programas de manejo reproductivo eficaces en novillas si se alcanzaran porcentajes de fecundidad aceptables, especialmente en rebaños con una ineficiente detección de celos (De Vries *et al.*, 2008).

La utilización del semen sexado y sus resultados, quedan puestos de manifiesto en un macroestudio realizado en los Estados Unidos, donde se analizó el uso del semen sexado en la raza Holstein para IA en novillas (1,3 millones de inseminaciones) y vacas (10,8 millones de inseminaciones) durante los años 2006-2008, siendo las inseminaciones con semen sexado del último año en los primeros servicios de un 80,5% en el caso de las novillas y de un 68,6% en las vacas. En este estudio, el porcentaje de fecundidad promedio (P/IA) para las novillas fue de un 56% para el semen convencional y un 39% para el semen sexado, correspondiendo a las vacas unos porcentajes de fecundidad promedios de un 30% y un 25%, respectivamente. El sexo de las crías obtenidas en las IA con semen sexado fue alrededor del 90% de hembras. Las distocias y mortinatos fueron más frecuentes en novillas que en vacas, siendo las cifras de mortinatos en las novillas algo superiores cuando se empleó semen sexado frente al semen convencional, especialmente en las crías machos (un 15,6% frente a un 10,8%).

Mientras que los partos difíciles en las novillas disminuyeron en un 28% y en un 64% en las vacas cuando se usó semen sexado (Norman *et al.*, 2010).



**CAPÍTULO 3**

**JUSTIFICACIÓN, PLAN DE TRABAJO**

**Y OBJETIVOS**



### **3.- JUSTIFICACIÓN, PLAN DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

---

Los porcentajes de fecundidad obtenidos por IATF utilizando distintos métodos de inducción/sincronización de celo/ovulación en novillas son significativamente inferiores a los porcentajes obtenidos cuando el celo es detectado visualmente en éstas y se práctica la IA con el protocolo convencional a.m. / p.m ó p.m. / a.m. del día siguiente. A pesar de esto, las numerosas ventajas que proporcionan estos métodos justifican su empleo, hasta el punto que hoy en día son ampliamente utilizados en el ganado vacuno lechero.

Muchos son los estudios publicados en los que se valora la eficacia de los distintos protocolos de sincronización, tanto en vacas como en novillas. Algunos arrojan muy buenos resultados, mientras que otros no lo son tanto. Pensamos que estos resultados deben ser valorados convenientemente en función de las características y circunstancias particulares de cada área geográfica, tipo de explotación, recursos, etc. Las publicaciones a este respecto en nuestro País son pocas, y mucho más escasas cuando nos referimos a novillas, creando una necesidad de aportar datos y resultados fidedignos que sustenten las apreciaciones obtenidas por el trabajo realizado y la experiencia acumulada.

En este sentido, desde la incorporación en el control reproductivo de nuestras explotaciones de distintos protocolos de IATF, nos dimos cuenta que aplicando criterios técnicos sencillos, los porcentajes de fecundación obtenidos eran sustancialmente mejorables, a expensas de seleccionar convenientemente las hembras para la IA, y no inseminar a todas las sometidas a tratamiento. Obviamente, tras la aplicación de un protocolo de inducción/sincronización, no todos los animales tratados alcanzan el momento óptimo para la IATF, por lo que difícilmente se produciría la fecundación. Estas apreciaciones subjetivas quisimos transfórmalas en resultados fiables y objetivos a través de un estudio

experimental diseñado en novillas frisonas, utilizando uno de los protocolos de inducción/sincronización de celo/ovulación que ha proporcionado peores resultados y que sin embargo, según nuestra experiencia no nos parecían tan insatisfactorios como los resultados reportados. Nos estamos refiriendo al método Ovsynch. Dicho tratamiento sería aplicado en novillas púberes, divididas en dos grupos, un primer grupo donde se realizaría la IATF en todas ellas, muestren o no celo y un segundo grupo donde la IA sólo se realizaría en aquellas que mostraran celo evidente (constatado). Este estudio, que fue realizado tiempo después de parte del segundo estudio que presentamos en esta Tesis, con vistas a otorgar una presentación más lógica de los contenidos es el que describiremos en primer lugar en esta memoria.

Utilizando estos mismos criterios de selección de las novillas a inseminar, nos planteamos valorar la eficacia reproductiva de los protocolos hormonales más empleados en nuestras explotaciones. A través de 2 ensayos clínicos sucesivos en el tiempo, nos propusimos valorar los porcentajes de sincronización y de fecundidad de tres protocolos de inducción/sincronización de celo/ovulación y comparar sus resultados entre ellos y con los obtenidos en la IA a celo natural en las mismas explotaciones.

Los avances tecnológicos hicieron posible la ansiada posibilidad de seleccionar el género de la descendencia. La incorporación del semen sexado ha supuesto un avance revolucionario en la producción animal y por extensión en el vacuno lechero y de carne. En nuestro caso, dado el elevado porcentaje de reposición que sufren las ganaderías intensivas de leche, el empleo del semen sexado nos está proporcionado una adecuada solución.

Al ser el semen sexado una aportación relativamente reciente al manejo reproductivo, las publicaciones en nuestro País son limitadas, por lo que requiere una profundización en su estudio, mucho más justificado si tenemos en cuenta su

implementación de cara al futuro. Las mejoras que se han producido tanto en la obtención como en la calidad del semen sexado, aseguran unos mejores resultados y conducen, a pesar de su mayor coste económico, a un uso masivo en las granjas. En esta línea nos interesaba valorar la utilización del semen sexado en nuestras explotaciones, particularmente en las novillas de reposición, tanto en la aplicación de la IA a celo natural como en distintos protocolos de IATF. Para este propósito diseñamos en unas condiciones de campo, es decir sin modificar las condiciones de manejo de nuestras granjas, el tercer estudio que presentamos en nuestra tesis doctoral.

En cada uno de los tres estudios planteados, nos propusimos alcanzar unos objetivos concretos y que a continuación pasamos a enumerar, así:

En el primer estudio nos propusimos:

- Valorar la eficacia reproductiva del método de sincronización Ovsynch (GPG) en novillas de leche, estableciendo una selección adecuada de las novillas, no sólo en relación a las características del desarrollo anatomo-fisiológico para poder ser sometidas al tratamiento, sino también en ser aptas para la IATF programada.
- Comparar estos resultados con los obtenidos en novillas tratadas igualmente con el mismo tratamiento, practicando la IATF en todas ellas, presenten o no celo.

En el segundo estudio, y a partir de dos ensayos clínicos consecutivos, prospectivos y longitudinales, nos propusimos:

- Valorar los porcentajes de sincronización y fecundidad obtenidos en tres métodos diferentes de inducción/sincronización de celo/ovulación y comparar sus resultados.

- Comparar los resultados de estos métodos, con respecto a la IA convencional de las novillas a celo natural (celo visto).

Y en el tercer estudio, nos propusimos:

- Valorar la utilización de semen sexado en novillas de leche, calculando los porcentajes de fecundidad y de hembras obtenidas.
- Analizar la influencia de distintos factores en dichos resultados, tales como factor granja, método de sincronización, número de IA y semental utilizado.

A partir del análisis y discusión de los resultados obtenidos en los tres estudios anteriores, nos propusimos como colofón de nuestras aportaciones al control reproductivo de las novillas frisonas, alcanzar un objetivo final:

- “Diseñar una estrategia futura adecuada y eficaz para el control reproductivo de las granjas de vacuno lechero de la provincia de León, enfocado a las novillas de reposición”.

# **CAPÍTULO 4**

## **ESTUDIO CLÍNICO 1**





## **4.- ESTUDIO CLÍNICO 1:**

---

### **“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO OVSYNCH (GPG) EN NOVILLAS FRISONAS/HOLSTEIN, MEDIANTE LA SELECCIÓN DE LAS NOVILLAS A INSEMINAR”**

#### **4.1.- RESUMEN**

Aunque muchos de los protocolos de inducción/sincronización de celo/ovulación han sido diseñados para poder realizar una IATF de todas las hembras muestren o no celo, un hecho bien conocido es que no todas las hembras responden por igual al tratamiento (casos sin respuesta a la inducción, casos que no sincronizan o sincronizan mal, etc.) por lo que es previsible que en un porcentaje de ellas no sea posible que se produzca la fecundación.

La selección practicada de una forma empírica, de las hembras bovinas sometidas a un protocolo de inducción/sincronización de celo/ovulación, con el fin de realizar la IA sólo en las que realmente sean aptas, tanto anatómica como fisiológicamente, es una práctica que nosotros venimos realizando desde que incorporamos estos tratamientos en el manejo reproductivo de nuestras granjas. En el presente estudio a través de un ensayo clínico, nos propusimos valorar, con rigor y cuantitativamente, estas apreciaciones. Pensamos que unas pautas, tanto a la hora de seleccionar las hembras a tratar como a la hora de realizar la IA, permiten optimizar cualquier método de sincronización, si bien para nuestra comprobación decidimos realizarlo utilizando un tratamiento como el Ovsynch, documentado en novillas con unos pobres resultados, con el fin de intentar poner más de manifiesto la mejora de su eficacia reproductiva.

Para este estudio se utilizaron 769 novillas de raza Frisona (Holstein) de distintas explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León. Todas las novillas presentaban unas características fisiológicas y anatómicas adecuadas para ser inseminadas (edad mínima de 14 meses, peso mínimo de 350 Kg., altura mínima a la cruz de 125 cm y una área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup>). Además, todas las novillas se sometieron a una exploración ginecológica, excluyendo aquellas que presentaban cualquier malformación en su aparato reproductor o bien unos ovarios poco desarrollados. De forma alternativa y aleatoria se establecieron los dos grupos del ensayo (Grupo A y Grupo B), los que fueron sometidos al mismo tratamiento de sincronización, el protocolo Ovsynch, administrando la inyección de la PGF<sub>2α</sub> en el día 6.

En las 371 novillas del Grupo A se realizó la IATF entre 12 y 24 horas (en un 90% a las 16 horas) después de la última inyección de GnRH. El Grupo B, constituido inicialmente por 398 novillas, en el momento de la IA fueron exploradas por palpación rectal, de tal forma que las novillas que no presentaron celo (ni actividad folicular) y las que mostraron signos de ovulación adelantada no fueron inseminadas. Por lo que finalmente este grupo quedó constituido por las 299 novillas que sí fueron inseminadas. La IA en todos los casos fue efectuada por el mismo veterinario, utilizando la técnica intracornual profunda ipsilateral al ovario con folículo pre-ovulatorio. El diagnóstico de gestación (DG) se efectuó por exploración rectal entre los 35-40 días tras la IA en todos los casos por palpación rectal.

Nuestros resultados demuestran que el porcentaje de fecundidad, %F= (novillas gestantes/novillas inseminadas) x 100, aumenta estadísticamente de forma significativa de un 45,3% hasta un 60,9% ( $p < 0,01$ ), mediante la selección de las novillas a inseminar. Este incremento, en torno a un 15% en el porcentaje de fecundación logrado con la selección, nos aproxima a las cifras obtenidas en IA de novillas a celo visto. Teniendo en cuenta nuestros resultados, comprobamos

que el valor predictivo para que una novilla quede gestante tras recibir un tratamiento de sincronización Ovsynch es casi dos veces superior si antes de realizar la IATF se comprueba ginecológicamente que dicha novilla presenta un celo evidente o no ha adelantado la ovulación, para decidir si se debe inseminar o no.

#### **4.2.- SUMMARY**

Even though many of the synchronization protocols, estrus induction and ovulation are designed to carry out AIFT on all the females to see whether there is estrus or no, it is a well-known fact that not all females react the same way to the treatment (cases without induction response, cases not synchronized or badly synchronized and so on) For this reason it is likely that a percentage of them are not for fertilization.

The selection practiced in an empirical way on the cows subjected to a synchronization protocol, estrus induction and ovulation in order to carry out AI only they are really capable, both anatomically and physiologically, is that we have been doing ever since we incorporated these treatments in reproduction on our farms. In this study, through a clinical test, we have established rigorous and quantitative values for these assessments. We think that guidelines, both selecting in females to be treated and when carrying out AI optimize any synchronization method for our own testing using Ovsynch treatment documented in heifers with poor results, thus attempting to show improvement in their reproductive efficiency.

For this study 769 heifers (Holstein) from different farms in the AFRIVEPA Cooperative, located in the Province of León were used. All the heifers had physiological and anatomical characteristics suitable to be inseminated (minimum age 14 months, minimum weight 350 kg, minimum height 125 cm at withers and

minimum pelvic area 135 cm<sup>2</sup>). All the heifers also underwent a gynecological examination with the aim of excluding those with any defect in their reproductive system or which had poorly developed ovaries. Two groups were alternatively and randomly established (Group A and Group B), were subjected to the same timing treatment, the Ovsynch protocol and administering PGF<sub>2α</sub> injection on day 6.

An AIFT was carried out on the 371 heifers from Group A between 12 and 24 hours (90% at 16 hours) after the final GnRH injection. Group B, initially made up of 398 heifers at the time of AI were explored by rectal palpation so that the heifers not estrus (or follicular active) and showed signs of early ovulation were not insinuated. In all cases. Finally this group was made up of 299 heifers which were inseminated. AI was carried out by the same veterinarian in all cases using the intercornual deep ipsilateral technique to the ovary with pre-ovulatory follicle. Pregnancy diagnosis was carried out by rectal examination between 35-40 days after AI, in all cases by rectal palpation.

Our results show that fertility percentages. %F equals (pregnant heifers/inseminated heifers) by 100, statistically significant increased from 45.35 to 60% ( $p < 0.01$ ) by selecting the inseminated heifers. This increase of about 15% of the percentage of fertilization with the selection closer to the figures obtained in AI heifers estrus can be seen. From our results, we found that the predictive values of a heifer becoming pregnant after receiving sync Ovsynch treatment is almost twice as high if prior to AIFT is gynecological checked to see that the heifer shows obvious estrus or has not had an early ovulation so as to decide whether to inseminate or not.

### **4.3.- INTRODUCCIÓN**

Una evidencia totalmente contrastada en el control reproductivo del vacuno de leche es que los mayores porcentajes de fecundidad en la inseminación artificial (IA) a celo natural son las alcanzadas en las hembras nulíparas. Sin embargo, la práctica reproductiva en las novillas plantea algunas dificultades que hace que los resultados muchas veces se alejen de la eficacia deseada. La detección del celo no siempre resulta fácil, dado que requiere una observación continua y sistemática, mucho más difícil de establecer en las hembras no productivas como las novillas; las cuales suelen permanecer en dependencias más alejadas y menos controladas y a las que generalmente el ganadero destina mucho menos tiempo de observación.

Aún manteniendo una buena práctica de observar el ganado tres veces al día (amanecer, mediodía y anochecer) durante al menos 20 minutos, la realidad es que un número significativo de celos no se detectan porque: a) son de corta duración (en torno un 15% de los celos tienen una duración menor de 10 horas), b) aparecen de noche (alrededor del 55% de los celos comienzan entre las dos y las ocho de la madrugada), c) el lugar de observación no es el ideal (sala de ordeño, zona de alimentación, etc); d) pueden tratarse de celos silentes (muy frecuentes durante el puerperio) y e) lo impiden causas ambientales (inclemencias del tiempo) y/o factores sociales entre las propias vacas (dominancias) (Domínguez , 2008).

Se ha calificado como un buen porcentaje de detección de celos en vacas de leche, cuando se alcanza el objetivo del 80% cada 21 días; entre el 50 y el 80% la eficacia reproductiva se resiente ostensiblemente y si es menor del 50% estaremos ante un problema grave (Ferguson, 1997, citado por Domínguez, 2008).

En este sentido los tratamientos hormonales de sincronización/ovulación constituyen una herramienta útil, que vienen a suplir las horas necesarias de vigilancia u otros métodos de detección de celo natural, al inducir el celo y permitir programar la IA a un tiempo fijo (Thatcher *et al.*, 2000). Evidentemente, no todas las vacas/novillas tratadas responden por igual al tratamiento, y difícilmente se alcanzan las cifras de gestación obtenidas con celo natural. No obstante son cada vez más los tratamientos utilizados, ya que entre otras ventajas permiten desarrollar un trabajo más organizado, programar lotes de gestación/parto, etc.

Uno de los tratamientos más empleados en la actualidad es el método Ovsynch (GPG) y sus variantes (Pursley, 2007). Consiste en la aplicación de dos inyecciones de GnRH (100 µg) los días 0 y 9 del tratamiento y una de PGF<sub>2α</sub> (25 mg) intercalada entre ambas (día 6-7), procediéndose a la IA a tiempo fijo (IATF) entre las 12 y 18 horas después de la segunda aplicación del GnRH. La fertilidad es inferior que con celo natural, pero se consigue una ovulación en el 85% de las vacas tratadas a las 24-32 horas (Pursley *et al.*, 1995, Burke *et al.*, 1996), a pesar de que las manifestaciones evidentes de celo sólo se observan en un máximo del 30% de las mismas.

Nuestra experiencia en el método GPG en vacas primíparas/multíparas nos ha permitido obtener unos resultados similares a los descritos en la bibliografía en torno a un porcentaje de fecundidad del 30-40% (Vasconcelos *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2001, El-Zarkouny *et al.*, 2004). Sin embargo Colazo y Ambrose, 2014, publican unos porcentajes de fecundidad obtenidos en diferentes estudios con una oscilación mayor, entre un 18% y un 43%.

No obstante, según nuestra opinión los porcentajes de fecundidad pueden ser incrementados si en lugar de IATF de todas las vacas tratadas, sólo se realiza la IA en las vacas que se confirme celo y un folículo preovulatorio adecuado,

comprobado mediante un examen ginecológico, aunque no presenten otras manifestaciones de celo, como reflejo de inmovilidad. Dicho reconocimiento clínico previo a la IA requiere una cierta habilidad técnica, pero una vez alcanzada, la mejora en la eficacia reproductiva compensa el tiempo que conlleva su realización, además de otorgar reconocimiento profesional a la labor del veterinario.

Si bien los programas de sincronización/ovulación fueron enfocados para la realización de una IATF con el fin de evitar el trabajo de la detección de celo, especialmente engorroso en explotaciones con un gran número de vacas, conllevan una pérdida de fertilidad con respecto a la IA a celo natural; dado que un número de vacas sometidas al tratamiento no van a alcanzar las condiciones fisiológicas para concebir. El detectar a estas vacas y excluirlas de la IATF, significaría no sólo un ahorro en semen, sino también una ganancia de tiempo para el siguiente servicio, ya que no habría que esperar al resultado del diagnóstico de gestación al cabo de 30-40 días.

Otro hecho también conocido es que el método GPG en novillas ofrece peores resultados que en vacas multíparas y en ocasiones discrepantes, debido a la propia fisiología hormonal de la pubertad. En comparación con las vacas lactantes, las novillas tienen un ritmo más rápido de crecimiento folicular (Pursley *et al.*, 1997) y una mayor frecuencia de los ciclos foliculares, de 3 ondas (Savio *et al.*, 1988). Por lo tanto, las novillas presentan una menor probabilidad de ovular un folículo dominante en respuesta a la primera inyección de GnRH en el protocolo Ovsynch en comparación con las vacas (Pursley *et al.*, 1995). Si se inicia Ovsynch durante las últimas etapas del ciclo estral, el cuerpo lúteo (CL) original de la ovulación espontánea precedente involucre antes de la inyección de PGF<sub>2α</sub>. La falta de ovulación a la primera GnRH no daría lugar a la formación de CL accesorio y potencialmente, un mayor riesgo de regresión prematura del CL y la expresión del estro original, provocando de este modo la asincronía en la IATF (Rivera *et al.*, 2004, Rabaglino *et al.*, 2010). El porcentaje de sincronización del método Ovsynch

en novillas de leche ha sido calculado en un 81,2% (Rivera et al., 2004), comprobándose que un número destacable de ellas adelantan el celo (17,7%). Por todo ello, consideramos aún más necesario realizar la selección de las novillas a inseminar cuando se utilizan estos tratamientos de sincronización con el fin de optimizar los rendimientos reproductivos.

En el presente estudio nos propusimos valorar la eficacia reproductiva del método de sincronización Ovsynch en novillas de leche, estableciendo una selección adecuada de las novillas, no sólo en relación a las características del desarrollo anatomofisiológico para poder ser madres y por lo tanto poder ser sometidas al tratamiento, sino también para ser aptas para la IATF programada.

La variante del método Ovsynch empleado en nuestro estudio, es el que habitualmente veníamos empleando en nuestra cooperativa para las novillas con mejores resultados. Dicho protocolo con respecto al original, se caracteriza por acortar en un día la administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (al 6º día), de acuerdo con la propuesta de ciertos autores que sugieren como el tratamiento más adecuado para las novillas (Rivera *et al.*, 2004)

#### **4.4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

En este estudio fueron utilizadas un total de 769 novillas de raza Frisona (Holstein) de distintas explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León, en las que si bien se realiza la inseminación artificial (IA) a celo natural (celo visto) en las novillas de recría, habitualmente también se llevan a cabo programas de sincronización de celo/ovulación con el método Ovsynch, conocido en español, bajo las siglas GPG. Todas las explotaciones son de carácter intensivo, con un tamaño entre 60 y 180 vacas en



producción (con medias en torno a los 9500 kg de leche por lactación), las cuales presentan unas condiciones sanitarias, ambientales y de alimentación similares.

Todas las novillas utilizadas en este estudio, presentaban unas características fisiológicas y anatómicas adecuadas para ser inseminadas, en concreto se establecieron como criterios de inclusión: una edad mínima de 14 meses, con un peso mínimo de 350 kg (55% del peso adulto), con un talla de mínima de 125 cm de altura a la cruz y una área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup>. Además, todas las novillas se sometieron a una exploración ginecológica, excluyendo aquellas que presentaban cualquier malformación en su aparato reproductor o bien unos ovarios poco desarrollados (ovarios infantiles).

De forma alternativa y aleatoria se establecieron los dos grupos del ensayo (Grupo A y Grupo B) a lo largo de un periodo de 30 meses (desde mediados del 2006 hasta diciembre 2008). Las novillas fueron agrupadas en lotes de 4 a 8 animales a la hora de intentar sincronizar los celos. Ambos grupos, A y B fueron sometidos al mismo protocolo de sincronización siguiendo la siguiente pauta:

- Día 0 = Inyección IM de 100 µg de gonadorelina (GnRH).
- Día 6 = Inyección IM de 15 mg de luprostiol (sintético de PGF<sub>2α</sub>).
- Día 8 = Inyección IM de 100 µg de gonadorelina (GnRH).
- Día 9 = Inseminación Artificial (IA) entre las 12-24 horas.

El **Grupo A** quedó constituido por 371 novillas procedentes de un total de 27 granjas. La mayor parte de estas novillas no habían sido inseminadas nunca, si bien algunas de ellas habían sido inseminadas una o dos veces con resultados negativos. En todas las novillas se realizó la IATF entre 12 y 24 horas (en un 90% a las 16 horas) después de la última inyección de GnRH, de acuerdo con el protocolo antes indicado.

El **Grupo B**, quedó constituido previamente por 398 novillas procedentes de las mismas 27 granjas. Igualmente la mayoría de las novillas no habían sido inseminadas anteriormente. Todas las novillas de este grupo, en el día 9 entre las 12 y 14 horas después de la segunda inyección de GnRH fueron exploradas por palpación rectal para confirmar y localizar la existencia de actividad folicular ovárica, seleccionando sólo aquellas que presentaban celo evidente y un folículo pre-ovulatorio (entre 1,5 y 2,5 cm de diámetro) para recibir la IA. Las novillas que no presentaron celo (ni actividad folicular) y las que mostraron signos de ovulación adelantada no fueron inseminadas. Por lo que finalmente este grupo quedo constituido por las 299 novillas que sí fueron inseminadas.

La IA en todos los casos de ambos grupos fue efectuada por el mismo veterinario, utilizando la técnica intracornual profunda ipsilateral al ovario con folículo pre-ovulatorio.

El semen utilizado consistía en dosis de semen convencional de fertilidad probada de distintos sementales Holstein, canadienses y americanos, en función de las características de la novilla y las preferencias de mejora del ganadero. Finalmente fueron utilizadas dosis procedentes de más de 35 sementales distintos. Todas estas dosis estaban envasadas en pajuelas de 0,25 ó 0,5 ml, con 12 millones de espermatozoides, conservadas en nitrógeno líquido a -196°C.

El diagnóstico de gestación (DG) se efectuó por exploración rectal entre los 35-40 días tras la IA en todos los casos por palpación rectal.

Los porcentajes de fecundidad,  $\%F = (\text{novillas gestantes} / \text{novillas inseminadas}) \times 100$ , obtenidos en los dos grupos fueron comparados mediante el test de comparación de dos porcentajes.

## **4.5.- RESULTADOS Y DISCUSION**

### ***4.5.1.- Resultados Grupo A.***

168 de las 371 novillas inseminadas (IATF) de este grupo fueron positivas en el diagnóstico de gestación a los 35-40 días, lo que representa un porcentaje de fecundidad medio del  $45,3 \pm 2,6\%$  (Tabla 4.1).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Rivera *et al.*, en 2004 y 2006, sin embargo están muy por encima de los señalados por otros autores ((Pursley *et al.*, 1995, Schmitt *et al.*, 1996). Esta mejoría en los resultados podría ser debida a la variante del protocolo empleada, al administrar la inyección de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  el día 6 en lugar del día 7. Tras la incorporación de este protocolo de sincronización en el ganado vacuno, ya algunos autores indicaban que debido a las particularidades fisiológicas del ciclo estral de las novillas, era necesario acortar el tiempo entre la primera inyección del GnRH y la administración de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Twagiramungu *et al.*, 1995, Rivera *et al.*, en 2004).

### ***4.5.2.-Resultados Grupo B.***

Como ha sido indicado en materiales y métodos, de las 398 novillas tratadas de este grupo sólo 299 fueron seleccionadas para la IA, lo que representa un  $75,1 \pm 2,2\%$ . La gran mayoría de las 99 novillas excluidas, lo fueron por no presentar celo (o ausencia de folículo preovulatorio), si bien algunas de ellas fueron porque la exploración ovárica reveló que la ovulación se había adelantado, en torno al 10%.

El porcentaje de celo obtenido en las novillas de nuestro estudio muestra unos buenos resultados, muy por encima de los señalados por algunos autores (Pursley et *al.*, 1995), los que sugerían la no recomendación del protocolo Ovsynch para novillas. Pensamos, que estos mejores resultados de tasa de celo (confirmado) obtenidos en nuestro estudio se deben a que todas las novillas que recibieron el tratamiento de sincronización previamente fueron examinadas ginecológicamente, excluyendo a aquellas que presentaban ovarios infantiles así como cualquier otra alteración morfológica en su aparato reproductor.

El simple hecho de haber alcanzado unas características anatómicas-fisiológicas relacionadas con la edad, tamaño y peso, no garantizan el éxito de la fertilidad. Es preciso confirmar que el aparato reproductor ha alcanzado su madurez y que no presenta ninguna patología o malformación.

Según nuestros resultados, casi un 25% de las novillas tratadas con el protocolo GPG deberían ser descartadas a la hora de la IA. En nuestro estudio se comprueba que estas novillas no se encuentran en el momento más oportuno para que se produzca la fecundación y que muy difícilmente puedan quedar gestantes, estando más que justificado el no realizar la inseminación de las mismas. Recordemos que muchas de estas novillas si sincronizaron celo, si bien presentaron una ovulación adelantada con respecto a la IATF, en nuestro caso fue en torno a un 10%, pero en la bibliografía han sido señaladas cifras superiores hasta de un 17,7% (Rivera et al., 2004).

De las 299 novillas inseminadas, el diagnóstico de gestación a los 35-40 días resultó positivo en 182 de ellas, lo que arroja un porcentaje de fecundidad medio de un  $60,9 \pm 2,8\%$ .

Evidentemente y, como era de esperar, nuestros criterios de selección en las novillas de este grupo, conducen a una elevación del porcentaje de fecundidad

frente a la obtenida en el grupo A. Según nuestro conocimiento, no hay estudios en los que la IA tras un programa de GPG en novillas no se realiza más que en las que presenten celo y no hayan adelantado la ovulación, para contrastar nuestros resultados. Si bien, Rivera *et al.* (2004 y 2006), sugerían esta posibilidad para obtener una mejoría en los porcentajes de fecundidad, ya que los primeros resultados con GPG en las novillas fueron decepcionantes (Pursley *et al.*, 1995).

#### **4.5.3.- Comparación de los resultados.**

Nuestros resultados demuestran que el porcentaje de fecundidad, %F= (novillas gestantes/novillas inseminadas) x 100, aumenta estadísticamente de forma significativa de un 45,3% hasta un 60,9% ( $p < 0,01$ ), mediante la selección de las novillas a inseminar (Tabla 4.1). Si bien, la impresión que puede percibir el ganadero en un principio, es que al inseminar menos novillas que las tratadas, las gestaciones alcanzadas van a ser inferiores. Esta impresión paradójica debe ser explicada a los ganaderos, indicándoles que para otorgar una mayor rentabilidad a los resultados de la IA es necesario descartar aquellas novillas en las que el tratamiento de sincronización no ha sido efectivo o bien en las que la ovulación se ha producido antes del tiempo esperado.

El incremento, en torno a un 15% en el porcentaje de fecundación, logrado con la selección de las novillas nos aproxima a las cifras obtenidas en IA a celo natural (Weigel 2004; Kuhn *et al.*, 2006), sin bien debemos admitir que no llegan a alcanzar las cifras más favorables valoradas incluso por encima del 65%, según la bibliografía (Seidel *et al.*, 1999; Sales, 2014).

**Tabla 4.1:** Resultados obtenidos en las novillas de los grupos A y B y resultados estadísticos de la comparación entre los porcentajes de fecundidad (%F).

	<b>GRUPO A GPG-IA Tiempo Fijo</b>	<b>GRUPO B GPG-IA Seleccionadas</b>
Nº	371	398
IA	371	299
DG + GESTANTES	168	182
% de Novillas que son IA	100%	75,1%
%F GESTANTES/IA	45,3%	60,9 %

Diferencia % = 15,6%    95% IC = 8,10 a 23,10%,  
 Resultados del Test  $\chi^2$ .     $\chi^2 = 15,53$ ,  $p < 0,0001$   
 Odds ratio = 1,88.    IC 95% entre 1,38 - 2,56

Se comprueba la existencia de diferencia estadísticamente significativa entre los %F de los grupos A y B ( $p < 0,01$ ).

No obstante, la optimización del método propuesto tendrá un mayor o menor valor en función del porcentaje de detección de celo que se observe en cada explotación. Así, en aquellas en que la observación de celos sea menor, la rentabilidad del método propuesto será mucho mayor. De tal forma y según nuestros resultados, podríamos admitir que en las granjas en las que la detección del celo en las novillas no supere el 80%, los porcentajes de fecundidad obtenidos a celo natural y mediante el protocolo GPG serían al menos similares, siempre y cuando las novillas a inseminar fueran seleccionadas siguiendo los criterios propuestos.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, comprobamos un valor predictivo de 1,9 veces superior de que una novilla quede gestante tras recibir un tratamiento de sincronización GPG si antes de realizar la IATF se comprueba

ginecológicamente que dicha novilla presenta un celo evidente o no ha adelantado la ovulación, para decidir si se insemina o no.

Las novillas que no superan el reconocimiento ginecológico de celo no serían inseminadas, produciéndose en primer lugar un ahorro en las dosis de semen, y en segundo lugar una ganancia de tiempo para alcanzar la gestación lo que a su vez disminuiría el tiempo no productivo del animal. Esta ganancia podría alcanzar todo el periodo de tiempo transcurrido hasta el momento del diagnóstico de gestación de haber sido inseminadas, es decir entre 35-40 días.

Si estimamos que más de la mitad de las novillas descartadas podrían quedar gestantes en una nueva tentativa de IA, bien tras la detección de un nuevo celo o tras someterlas a otra nueva sincronización, podríamos calcular una ganancia de producción láctea en torno a 20 días para las novillas que no fueron seleccionadas en la primera sincronización.

Sin duda esta pauta de optimización reportaría unos claros beneficios económicos para la explotación, valorados no sólo en el ahorro económico del semen utilizado en las novillas, sino también en el posible anticipo de la vida productiva.

Si atendemos a nuestros resultados, comprobamos que el ahorro en semen podría alcanzar hasta un 25% de su coste, es decir por cada 1000 € de gasto en semen para inseminar a las novillas de una explotación ahorraríamos unos 250 €, los que podrían ir destinados a la adquisición de dosis de semen de mejor calidad genética.

Por otro lado, si conseguimos adelantar la vida productiva de las novillas o dicho de otra forma si evitamos retrasos en la concepción, que según nuestros resultados podrían alcanzar un 15% de las mismas, disminuiríamos los costes de

la recría. Aunque el tiempo sea breve, éste puede alcanzar el periodo transcurrido hasta el diagnóstico de gestación, lo que sin duda sólo en alimentación supondría una cantidad a considerar. Hoffman (2014), sugiere que por cada ciclo estral perdido, se origina un coste adicional de 44 €, que puede ser imputado a los días de alimentación.

#### **4.4.- CONCLUSIONES**

1ª. La selección de las novillas mediante el examen ginecológico, previo a un tratamiento de sincronización como a la hora de realizar la IATF es una herramienta útil para optimizar sus resultados, ya que permite descartar aquellas que difícilmente van a responder al tratamiento, bien por presentar malformaciones o poco desarrollo en su aparato reproductor.

2ª. La optimización del método Ovsynch (GPG) mediante la selección de las novillas a inseminar, por la confirmación de celo evidente o la ausencia de una ovulación adelantada, proporciona unos porcentajes de fecundidad en torno a un 15% más elevado que los obtenidos cuando la IATF se realiza en todas las novillas tratadas.

3ª. La selección de las novillas mediante los controles ginecológicos señalados, previo al tratamiento Ovsynch (GPG) y previo a la IATF, elevan la probabilidad de gestación para un margen de confianza del 95% entre 1,4 y 2,6 veces, frente a las novillas que no son seleccionadas.

4ª y última. Se estima que esta mejora en la eficacia reproductiva de la recría de la granja, proporciona unos mayores rendimientos económicos, derivados de disminuir en torno a un mes el periodo no productivo de al menos un 15% de las novillas, junto con el ahorro de un 25% del gasto en semen.



# **CAPÍTULO 5**

## **ESTUDIO CLÍNICO 2**



---

## 5.- ESTUDIO CLÍNICO 2:

---

### “PORCENTAJES DE FECUNDIDAD EN NOVILLAS DE LECHE: COMPARACIÓN DE DISTINTOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN/SINCRONIZACIÓN DEL CELO FRENTE AL CELO NATURAL”

#### 5.1.- RESUMEN

En este estudio nos propusimos valorar, mediante la realización de dos ensayos clínicos, los porcentajes de fecundidad (%F) obtenidos tras la IA de novillas frisonas utilizando tres métodos diferentes de inducción/sincronización de celo/ovulación y comparar estos %F con los obtenidos tras la IA convencional a celo natural (CN), así como entre ellos mismos.

En el primer ensayo fueron utilizadas 872 novillas de raza Frisona (Holstein) de distintas explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León. Las novillas fueron clasificadas en tres grupos según manejo reproductivo. El **Grupo 1** (tratamiento Crestar®) quedó constituido por 366 novillas, el **Grupo 2** (tratamiento Ovsynch) con 222 novillas y el **Grupo 3** (Celo natural), constituido por 289 novillas, fue considerado el grupo control. Todas las novillas incluidas en el estudio cumplían unas condiciones anatómico-fisiológicas para poder ser inseminadas, confirmando mediante exploración clínica un aparato reproductor funcional y bien desarrollado. Además de acuerdo con nuestra pauta de optimización de los tratamientos de sincronización (abordado en el estudio anterior) a todas las novillas de los grupos 1 y 2 en el momento de realizar la IA se les practicó una exploración ginecológica, siendo descartadas las novillas que no presentaban folículo pre-ovulatorio ó aquellas en que se comprobaba un adelanto en la ovulación. Por lo cual en el grupo 1 se realizó la IA

en 305 novillas, mientras que en el grupo 2, la IA se realizó en 167. En el segundo ensayo fueron utilizadas 178 novillas (**grupo 4**), las cuales se sometieron al protocolo CIDR<sup>®</sup>-Cosynch 56 opción 2, y en las que se aplicaron los mismos criterios de selección y optimización antes señalados, por lo que sólo en 151 de ellas se realizó la IA. El diagnóstico de gestación fue realizado a los 35-40 días de la IA por palpación rectal.

Los porcentajes de fecundidad (%F) obtenidos en los grupos 1 (tratamiento Crestar<sup>®</sup>) y 2 (tratamiento Ovsynch), de un 61,6% y un 61,1% respectivamente, fueron significativamente más bajos que el obtenido en el grupo 3 (CN) de un 69,7%. Sin embargo esta diferencia estadísticamente significativa no se comprobó con el grupo 4 (CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2), que presentó un %F similar al grupo control, calculado en nuestro estudio en un 70,2%.

Los porcentajes de sincronización (%S) obtenidos por el protocolo Crestar<sup>®</sup> y el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch56-opción 2, son prácticamente idénticos (83,3% vs 84,8%), por encima del obtenido en el protocolo Ovsynch (75,2%). Atendiendo a estos resultados, deberíamos admitir, que los tratamientos de sincronización empleados en nuestro estudio, incluido el protocolo Ovsynch, constituyen unos métodos válidos para el control reproductivo de novillas frisonas, ya que las cifras de sincronización obtenidas por ellos se aproxima al porcentaje de detección de celo considerado como muy favorable del 80%. Lo que nos permitiría estimar unos porcentajes de fecundidad aceptables incluso en el caso que se realizara la IATF en todas las novillas.

Porcentajes de fecundidad que son mejorados en nuestro estudio, atendiendo a nuestros criterios de optimización de los tratamientos de sincronización, que conducen a sólo inseminar a las novillas que estén en un momento adecuado para ello. A partir de nuestros resultados, pudimos estimar unos porcentajes medios de gestación (%G), si la IA se practicará a tiempo fijo,

para la población de novillas frisonas de nuestra provincia de un 51,4% para el protocolo Crestar<sup>®</sup>, de un 45,9% para el tratamiento Ovsynch y de un 59,5% para el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Cosynch 56 opción 2. Siendo este último, incluso superior al %G estimado de un 55,8% para la IA en novillas a celo visto, aún considerando un valor tan favorable como el 80% de detección de celo.

## **5.2.- SUMMARY**

In this study we propose to study, by carrying out two clinical tests, the fertility rates (%F) obtained after AI on Friesian heifers using three different methods of induction, estrus synchronization/ovulation and compare these %F to those obtained after conventional natural estrus AI as well as between each other.

In the first test 872 Friesian heifers were used (Holstein) from different farms in the AFRIVEPA Cooperative located in the Province of León. The heifers were divided into three groups depending on their productive management- Group 1 (Crestar<sup>®</sup> treatment) was made up of 366 heifers, Group 2 (Ovsynch) 222 heifers and Group 3 (natural estrus) made up of 289 heifers was considered as the control group. All the heifers included in this study had the anatomical and physiological conditions to be inseminated, being confirmed by clinical examination and a well- developed functional reproductive system. Following our optimization synchronization treatment guidelines (discussed in the previous study), all the heifers in groups 1 and 2 at the time of AI underwent a gynecological examination whether to be discarded or not. Thus, AI was carried out on 305 heifers in in group 1, while in group 2 AI was performed on 167 heifers. In the second test 178 heifers (group 4) underwent the CIDR<sup>®</sup>- Cosynch 56 Option 2 where the same criteria for the selection and optimization previously mentioned was applied, which meant that only AI was carried out on 151 heifers. Pregnancy diagnosis was made 35-40 days after AI by rectal palpation.

The fertility rates (%F) obtained in group 1 (Crestar<sup>®</sup> treatment) and group 2 (Ovsynch) of 61.6% and 61.1% respectively were significantly lower than those obtained in Group 3/Natural Estrus) of 69%. However, a statistically significant difference was found in Group 4 (CIDR<sup>®</sup>-56 Co-Synch Option 2) which showed a percentage similar to the control group, calculated in our study at 72.2% F.

The percentages of estrus (%S) obtained by the protocol and Crestar<sup>®</sup> CIDR<sup>®</sup>- Co-Synch-Option 2 protocol are almost identical (83.35% vs 84.8%), higher than that obtained by the Ovsynch protocol (75.2%). Based on these results, we must admit that the Ovsynch protocol synchronization treatments used in this study are valid for Friesian heifers reproductive control methods as the figures obtained by synchronizing them approaches the detection estrus rate percentage considered as being very favorable at 80%. This allows us to estimate the percentages of acceptable fertility if AIFT is carried out on all the heifers. Fertility rates improved in our study, based on our optimization treatment synchronization criteria, only inseminated heifers which are at the appropriate time and allows us to estimate pregnancy rates (%G) if AI is applied at the right time to the Friesian heifer population in our province of 51.4%, Friesian heifers for the Crestar<sup>®</sup> protocol of 45%, Ovsynch treatment and 59.5% for the CIDR<sup>®</sup>-Cosynch 56 Option2 protocol. The latter is even higher than %G 55.8% estimated for AI in estrus heifers and even considering a value as favorable as 80% estrus detection.

### **5.3.- INTRODUCCIÓN**

Las biotecnologías de la reproducción, que permiten inducir y sincronizar celos en novillas, son una herramienta interesante en su control reproductivo. Se trata de conseguir como objetivo que las novillas tengan su primer parto a los 24 meses, realizando la primera inseminación a los 14-15 meses de vida (Doblas y Ruiz, 2015b). Según Kuhn et al., (2006) el porcentaje de fecundidad es máximo a una edad intermedia entre 15 y 16 meses. Estos mismos autores señalan que el porcentaje de fecundidad en novillas mayores de 26 meses de edad es inferior en un 10% al obtenido cuando se inseminan a edades más tempranas.

La ventaja fundamental de la inducción y sincronización del celo/ovulación en novillas es poder prescindir de la detección de celos, labor que en la mayoría de las veces es onerosa y poco eficaz, dado que muchos de los protocolos utilizados permiten la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). De igual forma, cabe destacar que la inducción y sincronización permite utilizar dosis de alto valor genético y costo económico elevado con mayor eficacia, organiza el trabajo veterinario y facilita la labor y el manejo por parte del ganadero. En definitiva nos proporciona un mayor número de celos por unidad de tiempo y por lo tanto mayores oportunidades para conseguir una buena fertilidad y alcanzar el objetivo del parto de novillas a los 24 meses de edad (Domínguez et al, 2008).

Los distintos métodos de inducción y sincronización de celo, se han ido incorporando desde principios de la década de los setenta del pasado siglo, a medida que los investigadores y los laboratorios comerciales iban desarrollando esta tecnología. Estos métodos han sido aplicados ampliamente en vacas multíparas. Sin embargo, las particularidades endocrinas y la detección de celos más sintomáticos, han hecho que su aplicación en novillas haya sido más limitada, al igual que las aportaciones bibliográficas, especialmente escasas las relativas a nuestro País.

En este sentido, pensamos que nuestra experiencia a lo largo de estos últimos años puede aportar concreción a los resultados, valorando las observaciones y datos que empíricamente los clínicos de vacuno de leche adquirimos con nuestro trabajo, día a día, en las granjas.

En este estudio, nos propusimos valorar, en dos ensayos clínicos prospectivos, longitudinales y consecutivos, los porcentajes de fecundidad obtenidos en novillas mediante la inducción y sincronización del celo utilizando tres métodos diferentes; y comparar los resultados entre ellos y con respecto a la inseminación convencional a celo natural (celo visto), considerado como Grupo Control.

Los tres métodos utilizados en la inducción y sincronización del celo fueron:

- **Protocolo Crestar<sup>®</sup>**, que incorpora un implante SC de norgestomet durante 10 días más una inyección IM de valeriato de estradiol y norgestomet, con IA a las 48 horas de la retirada del implante. Este medicamento a partir del 15 de octubre del 2006 fue prohibida su utilización en España (tras la transposición de una Directiva Europa), debido a la limitación de administrar estrógenos en vacuno. El Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado, entre las que se encontraban el 17- $\beta$ -estradiol o sus derivados de tipo éster, establecía en su Disposición transitoria única que hasta el 14 de octubre de 2006 se podrá autorizar que se administren a animales de explotación medicamentos veterinarios que contengan 17- $\beta$ -estradiol o sus derivados de tipo éster para la inducción del celo en el ganado bovino, equino, ovino o caprino, autorizados de conformidad con el Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, y demás normativa vigente en materia de medicamentos veterinarios. Después de esta fecha dichos medicamentos fueron retirados del mercado.



- **Método Ovsynch** (conocido en castellano bajo las siglas GPG, las cuales corresponden a las iniciales de las hormonas utilizadas en el tratamiento, es decir GnRH-PGF<sub>2α</sub> -GnRH). Dicho protocolo cumple las mismas pautas que el indicado en el estudio anterior, con IA entre las 12 y 24 h desde la última inyección de GnRH.

- **Método CIDR<sup>®</sup> - Co-Synch 56 h.** Se trata de un protocolo denominado, por Pfizer Salud Animal (actualmente Zoetis), que es el laboratorio que comercializa el dispositivo intravaginal de progesterona, como "variante opción 2".

## 5.4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.4.1.- MATERIALES Y MÉTODOS: ENSAYO CLINICO 1

En este primer ensayo clínico fueron utilizadas un total de 872 novillas de raza Frisona (Holstein) de distintas explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León. Todas las explotaciones son de carácter intensivo, con un tamaño entre 60 y 180 vacas en producción (con medias en torno a los 9500 kg de leche por lactación), las cuales presentan unas condiciones sanitarias, ambientales y de alimentación similares.

Todas las novillas utilizadas en este estudio presentaban unas características fisiológicas y anatómicas adecuadas para ser inseminadas, en concreto se establecieron como criterios de inclusión: una edad mínima de 14 meses, con un peso mínimo de 350 kg (55% del peso adulto), con un talla de mínima de 125 cm de altura a la cruz y una área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup>. Todas las novillas fueron sometidas a una exploración ginecológica, excluyendo aquellas que presentaban ovarios poco desarrollados. El criterio de exclusión

basado en la existencia de ovarios infantiles fue especialmente determinante en las novillas que fueron sometidas a métodos de sincronización.

A lo largo de un periodo de 24 meses (desde mediados del año 2004 hasta mediados del año 2006) se establecieron de forma aleatoria los tres grupos de este ensayo: **Grupo 1** (Implantes), **Grupo 2** (GPG), **Grupo 3** (Control). Los grupos 1 y 2 se constituyeron con la inclusión de lotes de 3 a 8 novillas. Los tratamientos de sincronización efectuados se recogen con detalle en las Figuras 5.1 y 5.2. El grupo 3 o control fue constituido a medida que iban siendo seleccionadas las novillas, tras la detección del celo natural (CN). La pauta para detectar el celo fue que las novillas eran observadas por los ganaderos dos-tres veces repartidas en el día, en busca de reflejo de inmovilidad positivo cuando se dejan montar por otras novillas.

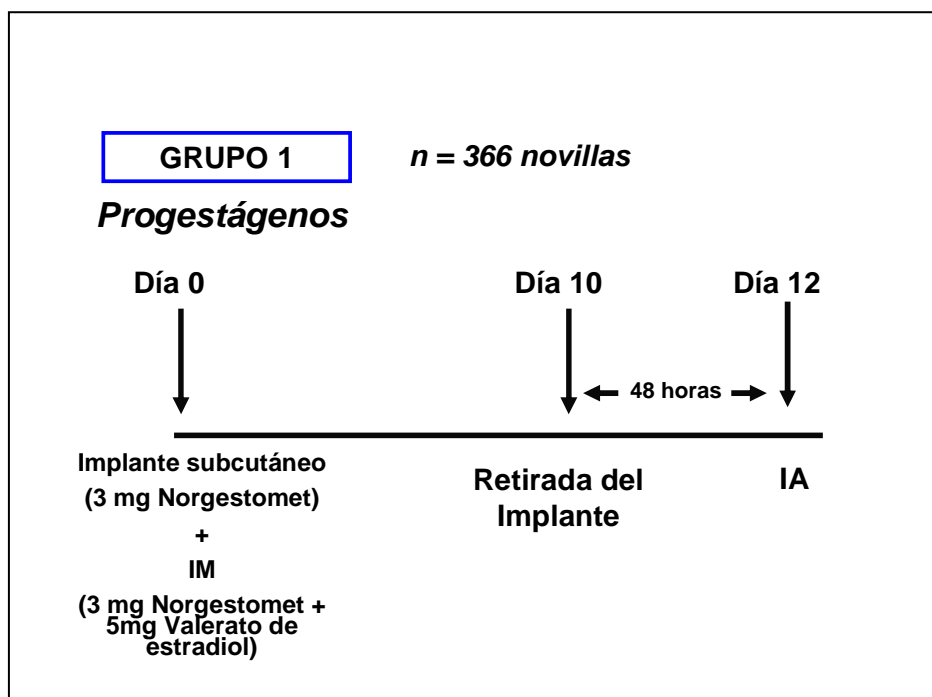


Figura 5.1. Tratamiento sincronización grupo 1: Protocolo Crestar<sup>®</sup>.

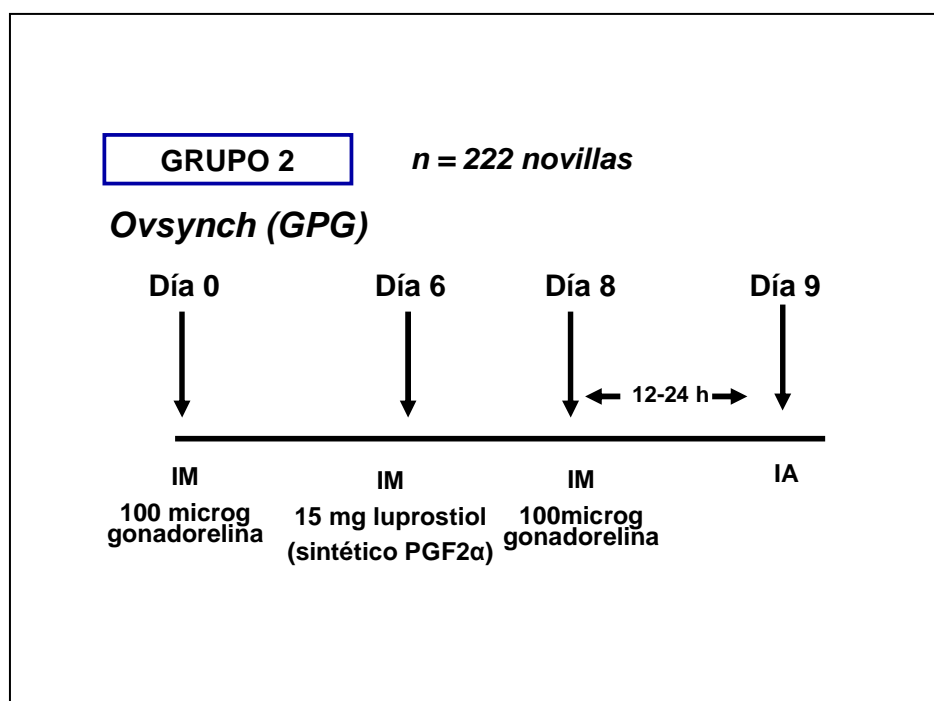


Figura 5.2. Tratamiento sincronización grupo 2: Método Ovsynch (GPG).

El **Grupo 1** quedó constituido por 366 novillas procedentes de un total de 31 granjas. La mayor parte de estas novillas no habían sido inseminadas nunca, si bien algunas de ellas habían sido inseminadas una o dos veces con resultados negativos. Las novillas fueron IA en torno a las 48 horas de retirada del implante (extraído con ayuda de una cuchilla de bisturí). Previamente a la IA, de acuerdo con nuestros criterios de optimización del método (abordado en el estudio anterior) se realizaba la confirmación de celo, comprobándose la existencia y valoración del folículo pre-ovulatorio, además de valorar el tono del útero y las características del flujo vaginal. Tras la evaluación ginecológica, las novillas que no presentaban folículo pre-ovulatorio o aquellas en que se comprobaba un adelanto en la ovulación eran descartadas para la inseminación. Con lo cual de este grupo se inseminaron un total de 305 novillas.

El **Grupo 2**, quedó constituido por 222 novillas procedentes de las mismas 31 granjas. Igualmente la mayoría de las novillas no habían sido inseminadas previamente. Todas las novillas de este grupo, tras la sincronización y

previamente a la inseminación programada a tiempo fijo, al igual que las del grupo 1, fueron exploradas por palpación rectal para confirmar y localizar la existencia de actividad folicular ovárica, seleccionando sólo aquellas que presentaban celo evidente en el momento de inseminar. Las novillas que no presentaron celo (ni actividad folicular) y las que mostraron signos de ovulación adelantada no fueron inseminadas. Por lo que finalmente en este grupo las novillas que se inseminaron fueron 167.

El **Grupo 3** (Control), quedó constituido por 284 novillas con celo natural (CN) de las mismas 31 granjas. Para la detección de celos, como ya ha sido indicado, las novillas eran observadas por los ganaderos dos-tres veces al día, en busca de reflejo de inmovilidad positivo cuando se dejaban montar. Tras la detección visual de los síntomas de celo se procedió a una exploración ginecológica de valoración folicular y confirmación de celo en las primeras 12 horas. Sólo en los casos de confirmación de celo se realizaba la IA.

La IA en todos los casos de los distintos grupos fue efectuada por el mismo veterinario, utilizando la técnica intracornual profunda ipsilateral al ovario con folículo pre-ovulatorio.

El semen utilizado consistía en dosis de semen convencional de fertilidad probada de distintos sementales Holstein, canadienses y americanos, en función de las características de la novilla y las preferencias de mejora del ganadero. Finalmente fueron utilizadas dosis procedentes de más de 35 sementales distintos. Todas estas dosis estaban envasadas en pajuelas de 0,25 ó 0,5 ml, con 12 millones de espermatozoides, conservadas en nitrógeno líquido a -196°C.

El diagnóstico de gestación (DG) se efectuó entre los 35-40 días tras la IA en todos los casos por palpación rectal.

Los porcentajes de fecundidad,  $\%F = (\text{novillas gestantes/novillas inseminadas}) \times 100$ , obtenidos en los tres grupos fueron comparados dos a dos, mediante el test estadístico de comparación de porcentajes. Del mismo modo fueron comparados los porcentajes de sincronización o celo,  $\%S = (\text{novillas con celo/novillas tratadas}) \times 100$ , obtenidos en los grupos tratados (grupo 1 y 2). Por último se compararon los porcentajes de gestación ( $\%G$ ) obtenidos en los tres grupos, calculando este parámetro a partir del cociente,  $(\text{novillas gestantes/número de novillas totales}) \times 100$ . Teniendo en cuenta que para el grupo 1 y 2 el número de novillas totales es el total de las novillas tratadas, y que para el caso del grupo control (grupo 3), el número total de novillas fue estimado a partir una cifra óptima de detección de celos del 80%.

#### **5.4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS: ENSAYO CLÍNICO 2**

En este segundo ensayo clínico se utilizaron un total de 178 novillas procedentes de las mismas granjas, con unas características fisiológicas y anatómicas adecuadas para ser inseminadas, como las descritas para el ensayo 1.

Este ensayo fue llevado a cabo meses más tarde que el ensayo anterior, con la incorporación del dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR<sup>®</sup>) en el mercado. Así desde finales del año 2007 y hasta mediados del 2009 se fueron confeccionando distintos lotes de novillas (entre 4 y 8 ejemplares), las cuales fueron sincronizadas con el método CIDR<sup>®</sup>-Cosynch 56 opción 2. Esta serie de novillas constituirán el **grupo 4** de nuestro estudio. El protocolo de tratamiento empleado se describe en la Figura 5.3.

Al igual que en los grupos de tratamiento anteriores (grupos 1 y 2), las novillas de este grupo, tras la sincronización y previo a la IATF, fueron exploradas por palpación rectal para confirmar y localizar la existencia de actividad ovárica

folicular, seleccionando sólo aquellas que presentaban celo evidente en el momento de la IA. Finalmente se realizó la IA en 151 novillas. Del mismo modo, la inseminación artificial fue realizada por el mismo veterinario, utilizando la técnica intracornual profunda ipsilateral al ovario con folículo pre-ovulatorio.

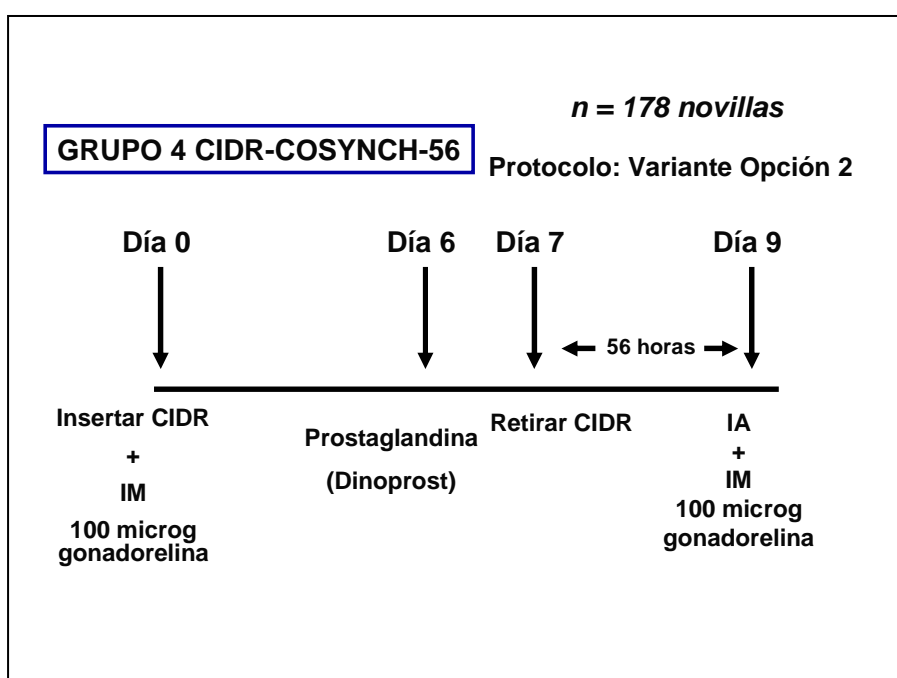


Figura 5.3. Tratamiento sincronización grupo 4. Método CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56-opción 2.

El semen utilizado consistía en dosis de semen convencional de fertilidad probada de distintos sementales Holstein, canadienses y americanos, en función de las características de la novilla y las preferencias de mejora del ganadero. Finalmente fueron utilizadas dosis procedentes de más de 35 sementales distintos. Todas estas dosis estaban envasadas en pajuelas de 0,25 ó 0,5 ml, con 15 millones de espermatozoides, conservadas en nitrógeno líquido a -196°C.

El diagnóstico de gestación, al igual que en el ensayo anterior, se efectuó por palpación rectal entre los 35-40 días tras la IA en todos los casos.

El porcentaje de fecundidad,  $\%F = (\text{novillas gestantes/novillas inseminadas}) \times 100$ , obtenido en este grupo fue comparado con los obtenidos en los tres grupos del ensayo clínico anterior. La comparación fue realizada dos a dos mediante el test de comparación de porcentajes.

Del mismo modo fueron comparados los porcentajes de celo o sincronización,  $\%S = (\text{novillas con celo/novillas tratadas}) \times 100$ , obtenidas en este grupo 4, frente a los obtenidos en los grupos con tratamiento del ensayo anterior (grupos 1 y 2).

Por último, también fue comparado el porcentaje de gestación ( $\%G$ ) obtenido en este grupo, con los obtenidos en los grupos anteriores, definiendo este parámetro como ha sido explicado en el ensayo anterior, como el cociente:  $(\text{novillas gestantes/novillas totales}) \times 100$ .

## **5.5.- RESULTADOS Y DISCUSION**

### **5.5.1.- RESULTADOS DEL ENSAYO CLINICO 1**

#### **Resultados Grupo 1.**

El número de novillas que presentaron celo y una adecuada condición fisioginecológica para ser inseminadas tras las 48 horas de retirada del implante fue de 305 de las 366 tratadas, lo que nos permitió calcular el porcentaje medio de sincronización (%S) para este grupo, cuyo resultado fue de un  $83,3 \pm 1,9\%$ .

De las 305 novillas inseminadas de este grupo 188 de ellas resultaron positivas al diagnóstico de gestación (DG) a los 35-40 días, lo que representa un %F medio de  $61,6 \pm 2,8\%$ . Estos resultados ligeramente inferiores a los reportados por Logue et al., 1991, y por Nell en 1990 (citado por Broers, 1999).

Si consideramos los resultados de DG positivo sobre el total de las novillas tratadas, el %G medio para este grupo se situó en un  $51,4 \pm 2,6\%$ .

#### **Resultados Grupo 2**

Aunque fueron 176 las novillas de este grupo las que realmente desarrollaron celo, sólo 167 de las 222 novillas tratadas fueron inseminadas en el tiempo previsto, ya nueve de ellas fueron descartadas para la inseminación porque mostraron una ovulación adelantada. De las 167 novillas inseminadas, el DG a los 35-40 días resultó positivo en 102 de ellas. Todos estos resultados arrojan un %S medio del  $75,2 \pm 2,9\%$ ; un %F medio del  $61,1 \pm 3,8\%$  y un %G medio de  $45,9 \pm 3,3\%$ . El %F de este grupo coincide con el obtenido en el estudio anterior con el mismo protocolo, y como anteriormente ha sido indicado es manifiestamente



superior a los primeros resultados documentados en novillas (Pursley *et al.*, 1995), si bien la modificación del protocolo (adelantando un día la inyección de PGF<sub>2α</sub>) ya había sido sugerido como necesario para incrementar la eficacia en el desarrollo del protocolo en novillas (Twagiramungu *et al.*, 1995, Rivera *et al.*, 2004, Rivera *et al.*, 2006), y así obtener unos porcentajes de fecundidad incluso superiores a los obtenidos en nuestro estudio.

Tabla 5.1. Porcentajes de sincronización (%S), de fecundidad (%F) y de gestación (%G) obtenidos en los grupos 1, 2 y 3.

	<b>GRUPO 1 CRESTAR®</b>	<b>GRUPO 2 OVSYNCH (GPG)</b>	<b>GRUPO 3 CELO VISTO (CONTROL)</b>
<b>n</b>	<b>366</b>	<b>222</b>	<b>284</b>
<b>%S (novillas celo/novillas tratadas) x 100</b>	<b>83,3%</b>	<b>75,2%</b>	
<b>IA</b>	<b>305</b>	<b>167</b>	<b>284</b>
<b>Gestación (DG +)</b>	<b>188</b>	<b>102</b>	<b>198</b>
<b>%F (novillas gestantes/novillas IA) x 100</b>	<b>61,6%</b>	<b>61,1%</b>	<b>69,7%</b>
<b>%G (novillas gestantes/novillas totales) x 100</b>	<b>51,4%</b>	<b>45,9%</b>	<b>55,8%*</b>

\* Porcentaje estimado considerando un 80% de detección de celos.

### Resultados Grupo 3

Los resultados obtenidos en el DG en nuestro grupo control, es decir 198 novillas gestantes de las 284 inseminadas, nos permitió calcular un %F medio a la

IA con celo natural de un  $69,7 \pm 2,7\%$ . Considerando que en nuestras granjas la detección de celos en el caso más favorable fuera de un 80%, podríamos calcular que el tamaño de la muestra global, en la que se detectaron los 284 celos, se correspondería con un total de 355 novillas. A partir de esta estimación podemos calcular un %G medio para la población de novillas inseminadas a celo natural en nuestras granjas de un  $55,8 \pm 2,6\%$ .

Todos los resultados expuestos quedan recogidos en el Tabla 5.1.

### **Comparación de los resultados.**

Como era de esperar nuestro estudio pone de manifiesto un mayor %F a la IA en el grupo control (Celo Natural), que se sitúa en los promedios más altos de los señalados entre los distintos estudios (Seidel et al., 1999; Weigel 2004; Kuhn et al., 2006) y que cumpliría con los parámetros a alcanzar en un adecuado programa de cría (Sales, 2014).

Nuestros resultados en los %S y %F en las novillas tratadas (grupo 1 y 2) son similares a los reflejados en la mayoría de los estudios, tanto en el grupo de las novillas tratadas con los implantes Crestar® (Nell, 1990 citado por Broers, 1999), como en el grupo de las que fueron sometidas al protocolo Ovsynch (Rivera *et al.*, 2004, Rivera et al., 2006). Esta mejoría en los %S y %F de nuestro estudio podrían ser explicados por los criterios aplicados en la selección, tanto a la hora de incluir las novillas en los tratamientos de sincronización como en el momento de la IATF. La primera exploración ginecológica permite descartar novillas no aptas para el tratamiento, mientras que la segunda, concomitante a la IA, nos permite seleccionar sólo las adecuadas, eliminando aquellas que no presentaban celo ó bien evidenciaban una ovulación adelantada.

Si comparamos, dos a dos, los %F obtenidos en nuestro estudio, mediante el test de comparación de porcentajes, comprobamos que las diferencias observadas muestran una significación estadística, entre el grupo 3 (Celo natural), frente a cualquiera de los dos grupos de tratamiento (Tabla 5.2). Los %F del grupo 1 y 2, estadísticamente, pueden considerarse similares.

**Tabla 5.2.** Resultados estadísticos de la comparación de los porcentajes de fecundidad (%F) entre los tres grupos.

<p><b>GRUPO 1 CRESTAR®</b> %F = 61,6% N = 305</p>		
<p>Diferencia = 0,5% 95% IC = -8,7 a 9,7 X<sup>2</sup> = 0,00 GL= 1 p = 0,994</p>	<p><b>GRUPO 2 OVSYNCH (GPG)</b> %F = 61,1% n = 167</p>	
<p>Diferencia = 8,1% 95% IC = 0,5 a 15,7 X<sup>2</sup> = 3,92 GL= 1 p = 0,048</p>	<p>Diferencia = 8,6% 95% IC = -0,5 a 17,7 X<sup>2</sup> = 3,12 GL= 1 p = 0,082</p>	<p><b>GRUPO 3 CELO VISTO (CONTROL)</b> %F = 69,7% n = 284</p>

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los %F de los Grupos 1 y 3 ( $p < 0,05$ ) y casi significativas entre los Grupos 2 y 3 ( $p < 0,1$ ).

Esta misma similitud debe ser considerada al comparar los %G entre los grupos 1 y 2 (Tabla 5.4). Sin embargo debemos admitir la existencia de una diferencia estadísticamente significativa cuando comparamos los %S, mucho más favorable para el tratamiento Crestar® frente al protocolo GPG (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3** Resultados estadísticos de la comparación de los porcentajes de sincronización (%S) entre los grupos 1 y 2.

<b>GRUPO 1 CRESTAR®</b> %S = 83,3% n = 366	
Diferencia = 8,1% 95% IC = 1,2 a 14,9 X2 = 5,22 GL= 1 p = 0,023	<b>GRUPO 2 OVSYNCH (GPG)</b> %C = 75,2% n = 222

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los %S de los Grupos 1 y 2 ( $p < 0,05$ )

**Tabla 5.4.** Resultados estadísticos de la comparación de los porcentajes de gestación (%G) entre los tres grupos (\* Valores estimados, considerando el 80% de celos detectados)

<b>GRUPO 1 CRESTAR®</b> %G = 51,4% n = 366		
Diferencia = 5,5% 95% IC = -2,8 a 13,8 X2 = 1,46 GL= 1 p = 0,223	<b>GRUPO 2 OVSYNCH (GPG)</b> %G = 45,9% n = 222	
Diferencia = 4,4% 95% IC = -2,9 a 11,7 X2 = 1,23 GL= 1 p = 0,272	Diferencia = 9,9% 95% IC = 1,5 a 18,2 X2 = 4,97 GL= 1 p = 0,026	<b>GRUPO 3 CELO VISTO (CONTROL)</b> %G = 55,8%* n = 355*

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los %G de los Grupos 2 y 3 ( $p < 0,05$ ).

Obviamente, debemos admitir que siempre hay un porcentaje de celos que no son observados o pueden pasar desapercibidos, y por lo tanto a la hora de

valorar la eficiencia reproductiva en una granja se debe considerar el porcentaje de detección de celo. En este sentido para calcular los denominados %G se deben considerar todas las novillas con capacidad reproductiva de la explotación, y si en ésta, las novillas son IA a celo natural, nunca se podrá alcanzar la cifra del %F, ya que sería admitir que todos los celos son detectados.

En nuestro estudio, y habiendo considerado una excelente detección de celos del 80% para nuestras granjas, el %G se estimó en un 55,8%. Dejando este porcentaje mucho más próximo a los obtenidos en los grupos con tratamiento, hasta el punto que su comparación no permite encontrar diferencias estadísticas entre %G del grupo 3 (Celo natural) y el grupo 1 (Crestar<sup>®</sup>) (Tabla 5.4). No obstante sigue constatándose un mayor %G a la IA con celo natural que con cualquiera de los dos protocolos empleados, lo que está en línea con lo señalado en la bibliografía (Weigel 2004; Kuhn et al., 2006).

## **5.5.2. RESULTADOS ENSAYO CLINICO 2**

### **Resultados Grupo 4.**

El número de novillas que presentaron celo y una adecuada condición ginecológica para ser inseminadas tras las 56 horas de retirada del dispositivo intravaginal de progesterona fue de 151 de las 178 tratadas, lo que nos permite calcular un %S medio para este grupo de un  $84,8 \pm 2,7\%$  (Tabla 5.5).

Atendiendo a estos resultados comprobamos como el método CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch56-opción 2, proporciona mejores resultados de sincronización que los anteriores, siendo significativamente superior al %S obtenido por el método GPG ( $84,8\%$  vs.  $75,2\%$ ,  $p < 0,05$ ), y similar al de los implantes SC de progestágenos ( $84,8\%$  vs  $83,3\%$ ).

**Tabla 5.5.** Resultados Porcentaje fecundidad (%F) Grupo 4

	<b>GRUPO 4 CIDR<sup>®</sup>-COSYNCH 56</b>
<b>N</b>	<b>178</b>
<b>%S (novillas celo/novillas tratadas) x 100</b>	<b>84,8%</b>
<b>IA</b>	<b>151</b>
<b>Gestación (DG +)</b>	<b>106</b>
<b>%F (novillas gestantes/novillas IA) x 100</b>	<b>70,2%</b>
<b>%G (novillas gestantes/novillas totales) x 100</b>	<b>59,5%</b>

De las 151 novillas en las que se realizó la IA en este grupo (grupo 4), 106 novillas resultaron positivas en el diagnóstico de gestación a los 35-40 días, lo que representó un %F medio de un  $70,2 \pm 3,7\%$ . Si consideramos los resultados de gestación positiva sobre el total de las novillas tratadas de este grupo, el %G medio se situaría en un  $59,5 \pm 3,7\%$ , un porcentaje netamente superior al reportado por Lopes *et al.*, (2013) de un 35,7% utilizando un protocolo similar a nuestro y al obtenido por Rabaglino *et al.*, (2010) utilizando un protocolo de 5 días y una ó dos inyecciones de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (46,1% y 48,6%, respectivamente) y similares a los publicado por Lima *et al.*, (2013) con un protocolo de 5 días de un 53,5% y 59,4%, según administración de una o dos inyecciones de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  respectivamente, y por Kasimanickam *et al.*, (2014), utilizando distintos protocolos.

## Comparación de los resultados.

Si comparamos estos %F y %G con los obtenidos en los grupos del ensayo 1 (Tabla 5.6 y Tabla 5.7), comprobamos que la eficacia reproductiva proporcionada con el método CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch56-opción 2 es notablemente superior a la obtenida por los otros protocolos de tratamiento, es decir al empleo de implantes subcutáneos de progestágenos como sobretodo a la obtenida con el método Ovsynch (GPG), alcanzando unos %F y %G prácticamente idénticos, desde un punto de vista estadístico, a los obtenidos en novillas inseminadas a celo natural.

**Tabla 5.6** .Resultados estadísticos de la comparación de los Porcentajes fecundidad (%F) entre el Grupo 4 y los Grupos 1, 2 y 3.

	<p><b>GRUPO 4</b> <b>CIDR<sup>®</sup>-COSYNCH 56</b> %F = 70,2% n = 151</p>
<p><b>GRUPO 1</b> <b>CRESTAR<sup>®</sup></b> %F = 61,6% n = 305</p>	<p>Diferencia = 8,6% 95% IC = -0,5 a 17,7 X<sup>2</sup> = 2,90 GL= 1 p = 0,092</p>
<p><b>GRUPO 2</b> <b>OVSYNCH (GPG)</b> %F = 61,1% n = 167</p>	<p>Diferencia = 9,1% 95% IC = -1,3 a 19,5 X<sup>2</sup> = 2,51 GL= 1 p = 0,118</p>
<p><b>GRUPO 3</b> <b>CELO VISTO (CONTROL)</b> %F = 69,7% n = 284</p>	<p>Diferencia = 0,5% I95% IC = -8,5,5 a 9,5 X<sup>2</sup> = 0,00 GL= 1 p = 0,999</p>

Aunque no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas, el porcentaje de fecundidad del Grupo 4 es netamente superior a los obtenidos en los Grupos 1 y 2.

Los %S obtenidos por el protocolo Crestar<sup>®</sup> y el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch56-opción 2, son prácticamente idénticos (83,3% vs 84,8%), por encima del obtenido en el protocolo Ovsynch (75,2%). Según estos resultados, hasta este último método podría ser considerado como válido para el control reproductivo de novillas frisonas, ya que la cifra de sincronización se aproxima al porcentaje de detección de celo considerado como muy favorable del 80%. Lo que nos permitiría estimar unos porcentajes de fecundidad aceptables en el caso que se realizara la IATF en todas las novillas.

**Tabla 5.7.** Resultados estadísticos de la comparación de los Porcentajes de gestación (%G) entre el Grupo 4 y los Grupos 1,2 y 3. (\* Valores estimados, considerando el 80% de celos detectados)

	<p><b>GRUPO 4</b> <b>CIDR<sup>®</sup>-COSYNCH 56</b> %G = 59,5% n = 178</p>
<p><b>GRUPO 1</b> <b>CRESTAR<sup>®</sup></b> %G = 51,4% n = 366</p>	<p>Diferencia = 8,1% 95% IC = -1,0 a 17,2 X<sup>2</sup> = 2,65 GL= 1 p = 0,105</p>
<p><b>GRUPO 2</b> <b>OVSYNCH (GPG)</b> %G = 45,9% n = 222</p>	<p>Diferencia = 13,6% 95% IC = 3,8 a 23,3 X<sup>2</sup> = 6,78 GL= 1 p = 0,009</p>
<p><b>GRUPO 3</b> <b>CELO VISTO (CONTROL)</b> %G* = 55,8% n* = 355</p>	<p>Diferencia = 3,70% I95% IC = -5,2 a 12,6 X<sup>2</sup> = 0,52 GL= 1 p = 0,474</p>

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los %G de los Grupos 4 y 2 ( $p < 0,01$ ). \* Valores estimados.

En nuestra opinión el protocolo Crestar<sup>®</sup> presenta la ventaja con respecto al protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch56-opción 2, de un procedimiento clínico más simple y



seguro para proporcionar la progesterona, ya que los dispositivos intravaginales, aunque no es frecuente, pueden ser expulsados. En cualquier caso, la prohibición de administrar estrógenos en el ganado vacuno, ha motivado que el protocolo Crestar® no pueda ser utilizado en nuestro País y por ello la posible supremacía en su uso no podría ser ni considerada en nuestras explotaciones.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio vienen a confirmar que la inserción de un dispositivo intravaginal de progesterona mejora en gran medida los resultados del protocolo Ovsynch (GPG) en novillas, incrementando en torno a 9 puntos porcentuales, tanto el %S como el %F, lo que proporciona una eficiencia reproductiva que se podría considerar similar a la alcanzada por IA a celo visto, e incluso superior si se cumplen las pautas de optimización establecidas en nuestro estudio.

Mellieon *et al.*, (2012), sin alcanzar nuestros resultados, ya sugerían unas claras diferencias de %F entre las novillas sometidas a un protocolo similar al de nuestro estudio (7 días con dispositivo intravaginal) según se realizara la IA, bien a celo evidente o bien a IATF (46,5% vs 26,8%).

## 5.4. CONCLUSIONES

1ª Los porcentajes de fecundidad medios obtenidos en la IA de novillas frisonas sometidas a un tratamiento de inducción/sincronización Crestar® y Ovsynch quedan estimados en torno a un 61% en ambos casos, cifra significativamente inferior al obtenido tras la IA de las novillas con celo natural, de un  $69,7 \pm 2,7\%$ .

2ª Considerando el más que favorable porcentaje de detección de celo de un 80%, el porcentaje de gestación estimado para una población de novillas frisonas

desciende a un  $55,8 \pm 2,6\%$ , aproximando esta cifra a los porcentajes obtenidos por los protocolos, tanto Crestar<sup>®</sup> como Ovsynch, cuando se consideran todas las novillas tratadas.

3<sup>a</sup> La combinación del dispositivo intravaginal (CIDR<sup>®</sup>) con una variante del método Ovsynch, el Co-Synch y la IA a las 56 horas tras la retirada del dispositivo, mejora en 9 puntos porcentuales al método Ovsynch, tanto el porcentaje de fecundidad como el porcentaje de gestación.

4<sup>a</sup> y última. El tratamiento CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-opción 2, cumpliendo nuestro método de optimización que limita la IA sólo a aquellas hembras que presenten el momento adecuado para ello, se revela como un método de elección en el manejo reproductivo de las novillas en las explotaciones de ganado vacuno lechero, proporcionando un porcentaje de fecundidad, en torno a un 70%, similar al obtenido en la IA a celo visto, así como un porcentaje de gestación incluso superior, aún considerando el 80% de detección de celos.

# **CAPÍTULO 6**

## **ESTUDIO CLÍNICO 3**



## **6.- ESTUDIO CLÍNICO 3:**

### **“VALORACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE SEMEN SEXADO EN LA INSEMINACIÓN DE NOVILLAS FRISONAS: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CELO NATURAL Y CON DISTINTOS PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN/SINCRONIZACIÓN DE CELO/OVULACIÓN”**

#### **6.1.- RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización del semen sexado en la inseminación artificial (IA) de novillas frisonas de la provincia de León. Para ello, se utilizó una muestra de 852 animales procedentes de catorce explotaciones de la Cooperativa AFRIVEPA, todas ellas con unas condiciones sanitarias, de manejo y de alimentación similares. En nuestro estudio, se valoraron fundamentalmente el porcentaje de fecundidad (%F), el sexo y viabilidad de la descendencia, globalmente y en función de diferentes parámetros, tales como el factor granja, el manejo reproductivo para llevar a cabo la IA (celo natural frente a distintos tratamientos de inducción y/o sincronización de celo), número de IA y semental utilizado. Los resultados se compararon, además, con otros obtenidos en estudios anteriores en la misma Cooperativa, pero empleando semen convencional.

Nuestros resultados muestran un %F medio del  $50,5 \pm 1,7\%$  cuando se utiliza semen sexado, sin que existan diferencias significativas según granja, método reproductivo utilizado ni número de IA. En cambio, los %F presentaron

diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en función del semental empleado. Los %F según semental utilizado fueron muy variables, lo que creemos debido a factores que afecten a la propia fertilidad intrínseca del semental y a la calidad del semen utilizado.

Los %F según manejo reproductivo (celo natural, protocolo Ovsynch, CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-opción 2) fue de 18 a 22 puntos porcentuales menor que los obtenidos con el semen convencional en los mismos grupos en nuestra Cooperativa.

El porcentaje medio de hembras nacidas con el semen sexado fue de un  $92,3 \pm 1,5\%$ , coincidiendo con lo señalado por las propias empresas distribuidoras de semen. Las tasas de abortos (1,8%) y nacidos muertos (un 5,0% en el caso de las hembras y un 8% para los machos) fueron mínimas, encontrándose también dentro de los límites previsibles.

El semen sexado disponible en la actualidad, a pesar de sus limitaciones en cuanto a su menor %F, es una buena alternativa para garantizar la reposición de reproductoras en las granjas de vacuno de leche, estimándose en nuestro estudio que la probabilidad de obtener una hembra tras la primera IA de una novilla con semen sexado es 1,8 veces superior frente al semen convencional, ( $p < 0,05$ ).

## **6.2.- SUMMARY**

The aim of this study is to evaluate the use of sexed semen used in artificial insemination (AI) used in Friesian heifers in the Province of León (Spain). In order to carry this out 852 animals were used, all from 14 different farms within the AFRIVEPA farming cooperative. All the farms which were used complying with the

standard sanitary conditions and normal feeding conditions. The fertility percentage (%F), sex and offspring viability both overall and taking into account different parameters such as the farm reproductive management to carry out AI (natural estrus as opposed to different inducing treatment and /or synchronization of estrus, number of AI and sire used were evaluated in this study. The results found were compared to other results from previous studies on the same farm but using conventional semen.

Our results show a %F average of  $50.5\% \pm 1, 7\%$  when sexed semen was used with no significant differences depending on the farm, breeding method used and the number of AI. However, %F showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ), depending on the sire used. %F varied considerably depending on the sire used, which is probably due to the intrinsic fertility of the sire used and the quality of the semen used.

%F depending on reproductive management (natural estrus, Ovsynch, CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-option 2 protocol was between 18 to 20% lower than those obtained using conventional semen in the same group in our Cooperative.

The average percentage of females born with sexed semen was  $92.3 \pm 1,5\%$ , which coincided with those reported by our own semen distributors. Abortion rates (1.8%) and stillborn (5.0% in the case of females and 8.0% in the case of males) were minimal, within the expected limits.

Sexed semen available at present, despite its limitations with regard to the low %F is a good alternative in order to ensure breeding replacement on dairy cattle farms, estimating in this study that the probability of the first AI heifer with sexed semen is 1.8 times higher compared to that of conventional semen ( $p < 0.05$ ).

### **6.3.- INTRODUCCIÓN**

El semen sexado se utiliza cada vez con más frecuencia en nuestro País en la inseminación de vacuno de leche, con el objetivo de incrementar la producción, aumentando el porcentaje de nacimientos de hembras y, por tanto, el beneficio económico. El mayor precio del semen sexado frente al convencional recomienda que sea utilizado principalmente en novillas por su mayor facilidad de concepción. No obstante, la eficacia que ofrece actualmente este tipo de semen, asegurando un elevado porcentaje de descendencia de hembras, justifican su empleo también en vacas de alta producción contrastada, a pesar de proporcionar unas menores tasas de fecundidad.

Sin embargo, los resultados de campo todavía son reducidos y casi todos los estudios se restringen a los países de origen de los sementales utilizados. Por ello, se hace necesario contrastar los resultados ofrecidos por las casas comerciales con los obtenidos en ganaderías particulares de regiones geográficas determinadas.

Para ello, en el presente estudio nos propusimos valorar la utilización de semen sexado en novillas frisonas de la provincia de León (España). Con este fin, fueron seleccionadas catorce explotaciones de la Cooperativa AFRIVEPA en las que en los últimos años se está incorporando la utilización de semen sexado en sus programas de cría.

A la hora de realizar este estudio, nos propusimos como objetivo general, valorar la utilización de semen sexado en novillas de leche, calculando el porcentaje de fecundidad y el porcentaje de hembras obtenidas, así como la viabilidad de la descendencia y comparar estos resultados con los obtenidos con semen convencional. Además, nos propusimos analizar la posible influencia de



distintos factores en la utilización del semen sexado, tales como el factor granja, el manejo reproductivo para la IA, el número de IA y el semental empleado.

## **6.4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.4.1.- Novillas**

En este estudio fueron utilizadas un total de 852 novillas de raza Frisona de 14 explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León, que en estos últimos años han incorporado el empleo de semen sexado en sus programas de recría. Todas son explotaciones de carácter intensivo, con un tamaño de entre 60 y 180 vacas en producción (con medias en torno a los 10000 kg de leche por lactación), que presentan unas condiciones sanitarias, ambientales, de manejo y alimentación similares.

De las 852 novillas estudiadas, 59 novillas pertenecen a la Granja A, 20 novillas a la Granja R, 29 novillas a la Granja CA, 120 novillas a la Granja V, 168 novillas a la Granja J, 44 novillas a la Granja S, 121 novillas a la Granja H, 36 novillas a la Granja O, 31 novillas a la Granja OT, 54 novillas a la Granja JA, 44 novillas a la Granja M, 59 novillas a la Granja C, 25 novillas a la Granja T y 42 novillas a la Granja SC.

Todas las novillas utilizadas presentaban unas características fisiológicas y anatómicas adecuadas para ser inseminadas. Estos criterios de selección son los que rutinariamente empleamos en la Cooperativa AFRIVEPA para considerar apta a una novilla para la IA, y que coinciden con los utilizados en los dos estudios anteriores. En concreto, estos criterios se trataban de: una edad mínima de 14

meses, un peso mínimo de 350 kg (55% del peso adulto), una talla mínima de 125 cm de altura a la cruz y un área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup>.

Para realizar nuestro estudio se confeccionó una ficha con el fin de anotar los datos correspondientes a cada novilla (*figura 6.1*). En cada una de estas granjas se contempló un periodo variable, coincidiendo su inicio con la incorporación del semen sexado para las inseminaciones de las novillas. Este periodo abarcó en su conjunto más de 7 años, con un total de 90 meses (desde finales del 2007 hasta mayo de 2015).

<b>Nº:</b>		
<b>GANADERIA:</b>		
<b>NOVILLA:</b>	<b>FECHA NACIMIENTO:</b>	
<b>MÉTODO:</b>	<b>FECHA IA:</b>	<b>Nº IA:</b>
<b>EDAD MESES:</b>	<b>CATEGORIA EDAD:</b>	<b>ESTACION:</b>
<b>SEMENTAL:</b>	<b>SEMEN SEXADO:</b>	<b>ORIGEN TORO:</b>
<b>DIAGNOSTICO GESTACION:</b>	<b>FECHA DG:</b>	
<b>ABORTO:</b>		
<b>F PARTO:</b>	<b>SEXO:</b>	<b>VIVO/MUERTO:</b>
<b>DURACION GESTACION:</b>	<b>CAT DIAS GESTACIÓN:</b>	

**METODO:** CN, GPG, CIDR<sup>®</sup>/PRID<sup>®</sup>, PR

**CATEGORIA EDAD (en meses):** A (<15,5), B (15,5-17), C (17-19,5), D (19,5-21), E (>21)

**ORIGEN TORO:** CAN (Canadá), NL (Holanda), USA (Estados Unidos), I (Italia)

**CATEGORIA DÍAS GESTACIÓN:** A (< 275 días) y B (> 275 días)

**Figura 6.1.** Modelo de ficha de recogida de datos.

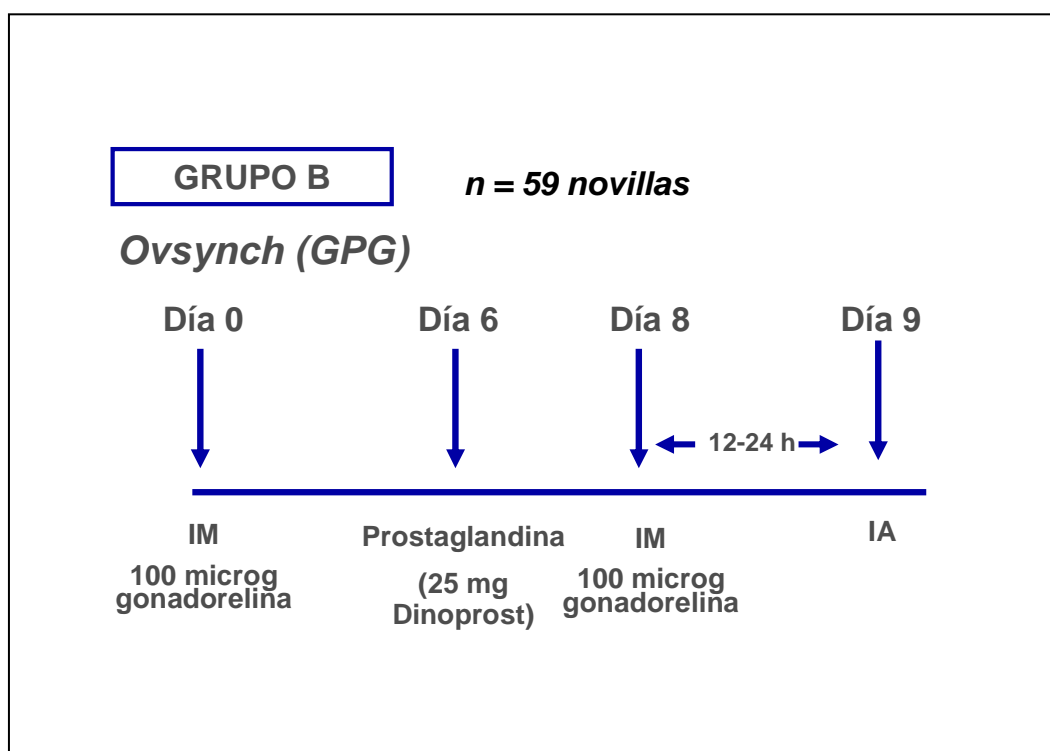
### **6.4.2.- Método reproductivo**

Las características particulares del manejo reproductivo de las explotaciones, principalmente determinadas por las propias decisiones del ganadero, nos permitió establecer 4 grupos distintos en función del tratamiento aplicado a la hora de realizar las inseminaciones de las novillas.

El **Grupo A o Celo Natural (CN)**, incluye a las novillas inseminadas a celo visto. Para la detección de celos en estas explotaciones, las novillas eran observadas por los ganaderos dos-tres veces repartidas en el día, en busca de reflejo de inmovilidad positivo cuando las montan otras novillas. Además, se constató por nuestra parte mediante exploración ginecológica la existencia de celo. Este grupo quedó constituido por un total de 641 novillas procedentes de las 14 granjas. La mayor parte de estas novillas, concretamente 496, no habían sido inseminadas nunca, si bien algunas de ellas habían sido inseminadas una o varias veces con resultados negativos. Concretamente, 118 de ellas habían recibido 1 inseminación previa, 20 de ellas 2 inseminaciones y 7 de las novillas, 3 o más inseminaciones.

El **Grupo B o Método Ovsynch (GPG)**, quedó constituido por 59 novillas de 8 granjas distintas, que fueron sometidas a un protocolo de sincronización GPG para su inseminación a tiempo fijo (*figura 6.2*). En este caso, la inclusión de los animales fue principalmente en lotes de entre 3 y 6 novillas, aunque se programó algún caso particular con una o dos novillas. Todas las novillas incluidas en este grupo fueron sometidas a una previa exploración ginecológica, para confirmar que todas ellas presentaban unos ovarios funcionales y desarrollados. Al igual que en el grupo anterior, la mayor parte de las novillas, concretamente 41, no habían sido sometidas antes a ninguna inseminación, salvo 13 de ellas que previamente habían recibido 1 inseminación y 5 novillas 2 inseminaciones.

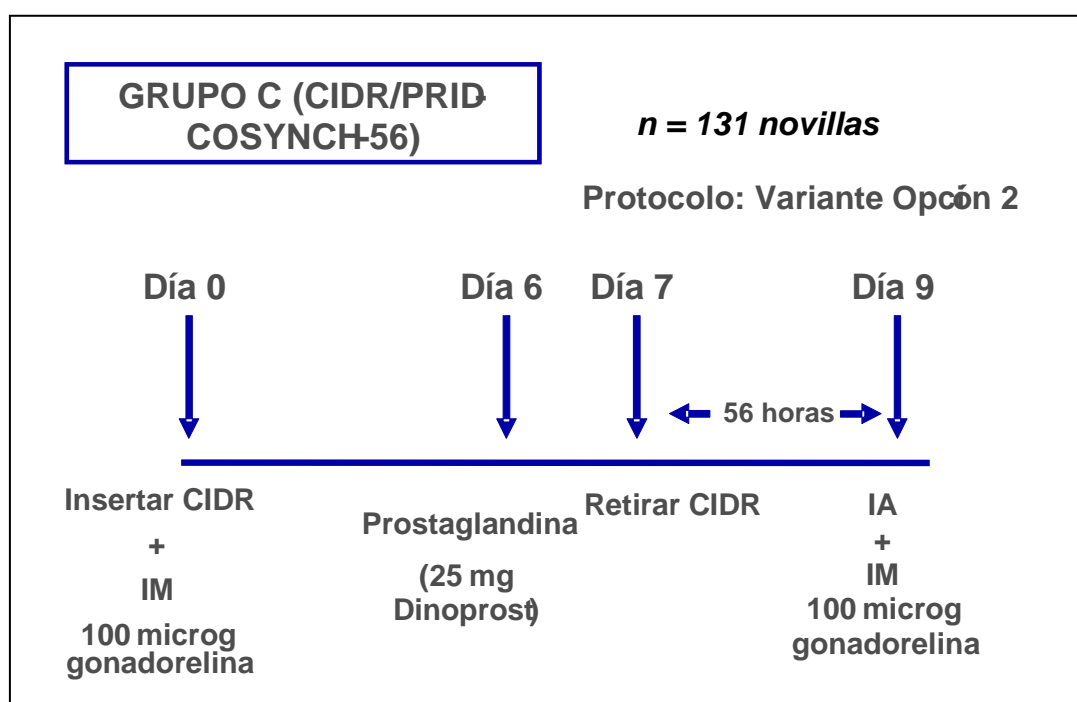
Este protocolo se basa en la administración de GnRH y PGF<sub>2α</sub> siguiendo las mismas pautas que en los ensayos anteriores en cuanto a este tratamiento. Con la primera inyección de GnRH, en el día 0, se induce una ovulación o luteinización del folículo dominante y la formación de la consiguiente onda de crecimiento folicular. Al aplicar la PGF<sub>2α</sub> en el día 6, se hace regresar el cuerpo lúteo formado y, con la última dosis de GnRH, se induce la formación de un nuevo folículo, que estará en el momento óptimo cuando se realice la IA. La administración de la PGF<sub>2α</sub> se lleva a cabo en el día 6 y no en el 7 como ocurre en vacas, ya que las novillas tienen tres ondas foliculares y las vacas solo dos (Rivera, 2004).



**Figura 6.2.** Tratamiento sincronización grupo B: Método Ovsynch (GPG).

El **Grupo C** o **dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®/PRID®-Co-Synch-56, opción 2)**, quedó constituido por 131 novillas de 7 granjas distintas, que fueron sometidas a un protocolo de sincronización para

su inseminación a tiempo fijo. En este caso, la inclusión sucesiva de los animales fue también en lotes de entre 2 y 8 novillas. Todas las novillas incluidas en este grupo fueron sometidas a una previa exploración ginecológica, para confirmar que todas ellas presentaban unos ovarios funcionales y desarrollados. Al igual que en el grupo anterior, la mayor parte de las novillas, concretamente 102, no habían sido sometidas antes a ninguna inseminación, salvo 22 de ellas que previamente habían recibido 1 IA, 5 novillas 2 IA y 2 novilla 3 IA. El tratamiento para la sincronización utilizado en este grupo fue una combinación de un método GPG + un dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR<sup>®</sup>/PRID<sup>®</sup>), siguiendo el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56 horas, opción 2 (figura 6.3).



**Figura 6.3.** Tratamiento sincronización grupo C: CIDR-Co-Synch-56-opción 2.

Aunque tanto el CIDR<sup>®</sup> (Zoetis) como el PRID<sup>®</sup> (Ceva Salud Animal) son dispositivos intravaginales liberadores de progesterona, la diferencia entre ellos radica en la forma de los mismos y en la cantidad de progesterona que contiene

cada uno (1,38 g el primero y 1,55 g el segundo). Este tipo de dispositivos actúan como un depósito natural de progesterona, que tras ser liberada es absorbida por la mucosa vaginal e inhibe la liberación de LH y FSH, frenando la ovulación y, por tanto, la aparición del celo. Al retirarlos, la progesterona en sangre disminuye rápidamente y el animal entra en celo en las siguientes 30-60 horas, de ahí que la inseminación se realice a las 56 horas tras la retirada, momento en que se administra una GnRH que induzca la ovulación (Lucy et al., 2001).

El **Grupo D o Prostaglandina (PR)** se trataba de novillas inseminadas a celo visto, a las que previamente se había administrado una inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a la dosis de 25mg de dinoprost trometamina. Para la detección de celos en estas explotaciones, las novillas fueron observadas por los ganaderos dos-tres veces repartidas en el día, en busca de reflejo de inmovilidad positivo cuando se dejan montar. Además, se constató por nuestra parte mediante exploración ginecológica la existencia de celo. Este grupo quedó constituido por 21 novillas procedentes de un total de 9 granjas. Igualmente, la mayor parte de estas novillas no habían sido inseminadas nunca, si bien 5 de ellas habían sido inseminadas una vez con resultado negativo y 1 novilla dos veces.

### **6.4.3.- Semen sexado**

El semen utilizado consistía dosis de semen sexado de fertilidad probada de distintos toros de raza Holstein de origen canadiense, estadounidense, italiano u holandés, en función de las características de la novilla y de las preferencias de mejora del ganadero. De tal forma, fueron utilizadas dosis procedentes de más de 30 sementales distintos. Todas estas dosis estaban envasadas en pajuelas de 0,25 ml y 2 millones de espermatozoides, conservadas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.4.4.- Inseminación artificial**

En el grupo A (CN) y en el grupo D (PR), la inseminación artificial se realizó entre las 12 y 14 horas posteriores a la detección de celo, siguiendo la pauta a.m./p.m. o p.m./a.m. del día siguiente. Las novillas del grupo C (CIDR<sup>®</sup>/PRID<sup>®</sup>-Co-Synch-56-Opción 2) fueron inseminadas lo más cercano posible a las 56 horas desde la retirada del dispositivo intravaginal (entre 52 y 60 horas) concurrente además con la inyección de la segunda GnRH. Las novillas del grupo B (GPG) fueron inseminadas a las 16 horas (entre 15 y 17 horas) de la inyección de la segunda GnRH.

Todas las novillas del estudio, en el momento de la IA, fueron exploradas por palpación rectal para confirmar y localizar la existencia de actividad folicular ovárica y para comprobar la existencia de celo. Esta comprobación fue constatada en todas las novillas que se incluyeron en los grupos A y D. Hechos que igualmente se confirmaron en todas las novillas que forman parte de los grupos B y C, ya que las novillas que tras los tratamientos no presentaron celo (ni actividad folicular), así como las que mostraron signos de ovulación adelantada, fueron excluidas y no computaron para nuestro estudio.

La IA en todos los casos fue efectuada por el mismo veterinario, utilizando la técnica intracornual profunda ipsilateral al ovario con folículo pre-ovulatorio.

#### **6.4.5.- Diagnóstico de gestación**

El diagnóstico de gestación (DG) se efectuó por exploración rectal entre los 35 y los 40 días tras la IA en todos los casos, por palpación rectal y/o examen ecográfico.

#### **6.4.6.- Partos e incidencias**

Los partos, incluidas la fecha y la descendencia, fueron anotados por los propios ganaderos. También reflejaron las posibles incidencias de los mismos (nacidos muertos, partos gemelares, partos distócicos, etc) y las incidencias a lo largo de toda la gestación (bajas, abortos, etc).

#### **6.4.7.- Análisis y estudio estadístico de los resultados**

A partir de los datos recogidos nos propusimos calcular los porcentajes de fecundidad,  $\%F = (\text{novillas gestantes/novillas inseminadas}) \times 100$ , de forma global y en función de las distintas variables consideradas (método, nº de IA, granja y semental).

Del mismo modo, nos propusimos calcular los porcentajes de parto y el género de la descendencia.

Con el fin de alcanzar los objetivos previstos, los datos recogidos fueron analizados y tratados estadísticamente con el programa informático MedCalc<sup>®</sup> versión 4.16g-Windows 95.

Para la comparación de variables cualitativas se utilizó el test de  $\chi^2$  con corrección de Yates y el test de comparación de porcentajes. Para cuantificar la importancia de una asociación se calculó el "*Odds Ratio*" (razón de oportunidades) y de esta forma la predicción de un suceso. Se considerará que las diferencias observadas alcanzan una significación estadística cuando la  $p$  sea menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ) y casi significativa cuando la  $p$  sea menor de 0,1 y mayor de 0,05 ( $p < 0,1$ ).



## 6.5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.5.1.- Porcentaje de fecundidad global

El porcentaje de fecundidad global en las novillas inseminadas con semen sexado de todas las granjas, sin tener en cuenta ningún otro parámetro, fue del  $50,5 \pm 1,7\%$ , lo que significa que 430 de las 852 novillas estudiadas se quedaron gestantes tras ser inseminadas con este tipo de semen. Este resultado lo podemos considerar francamente bueno, siendo ligeramente superior al reseñado por DeJarnette et al. (2009), que obtienen un %F con semen sexado del 47% en novillas Holstein. En otro estudio realizado por DeJarnette et al. (2011), este porcentaje se redujo al 41%.

### 6.5.2.- Porcentaje de fecundidad según manejo reproductivo

Teniendo en cuenta los distintos métodos empleados para el manejo reproductivo de las granjas, obtenemos los siguientes resultados:

- **Grupo A (CN):** 332 de las 641 novillas inseminadas de este grupo con CN fueron positivas en el DG a los 30- 40 días, lo que representa un porcentaje de fecundidad medio del  $51,8 \pm 1,9\%$ . Si se tienen en cuenta solamente las novillas inseminadas por primera vez, el porcentaje de fecundidad es muy similar, del 51,6%.
- **Grupo B (GPG):** 25 de las 59 novillas inseminadas que habían sido sometidas a un tratamiento GPG para sincronizar el celo fueron positivas en el DG, lo que supone un porcentaje de fecundidad medio de un  $42,4 \pm$

6,4%. Cuando se evalúan exclusivamente las novillas inseminadas por primera vez, el porcentaje de fecundidad fue del 43,9%.

- **Grupo C (CIDR®/PRID®-Co-Synch-56, Opción 2):** 64 de las 131 novillas inseminadas, cuyo celo se sincronizó empleando dispositivos intravaginales de progesterona, fueron positivas en el DG, lo que representa un porcentaje de fecundidad medio de un  $48,8 \pm 4,4\%$ . Si solamente se estudian las novillas inseminadas por primera vez, el porcentaje de fecundidad fue del 47,1%.
- **Grupo D (PR):** 9 de las 21 novillas inseminadas tras ser tratadas con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fueron positivas en el DG, lo que supone un porcentaje de fecundidad medio del  $42,9 \pm 10,8\%$ . Teniendo en cuenta solamente a las novillas inseminadas por primera vez, el porcentaje de fecundidad medio baja al 40%.

Si comparamos los porcentajes de fecundidad medios obtenidos según los distintos métodos de manejo de la reproducción, comprobamos que los resultados observados no alcanzan diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,454$ ) (tabla 6.1). En el caso de las novillas inseminadas por primera vez, tampoco se comprueba la existencia de diferencias significativas entre los diferentes métodos utilizados ( $p= 0,558$ ). Estos resultados coinciden con los del estudio realizado por Sá Filho et al. (2010), que informan de que no encuentran diferencias significativas entre los distintos métodos utilizados.

Schenk *et al.*, (2009) obtienen un porcentaje de fecundidad del 34% en novillas inseminadas con semen sexado a las 55-56 horas después de la eliminación CIDR® y la inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el mismo momento ( $n=32$ ), en comparación con el 49% obtenido cuando la IATF se realizaba entre 67 a 68 horas después de la eliminación CIDR® ( $n=35$ ). Este último porcentaje es similar al

obtenido en nuestro estudio, si bien nuestro protocolo con dispositivo intravaginal de progesterona difiere en que la aplicación de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se realiza un día antes de la retirada del dispositivo, si bien la IA se realiza a las 56 horas.

Mallory et al. (2013), reflejaron diferencias en la %F en la IA de novillas con semen sexado tras tratamiento de CIRD<sup>®</sup> 14 días, en función si se realizaba la IATF en todas las novillas o sólo en aquellas que presentaban manifestación de celo (26% vs 46%), siendo esta cifra similar a la obtenida por nosotros en el grupo C (CIDR<sup>®</sup>/PRID<sup>®</sup>-Co-Synch-56, Opción 2), lo que viene a confirmar nuestra propuesta de sólo inseminar las novillas con celo evidente para mejorar la eficiencia reproductiva del semen sexado.

**Tabla 6.1.** Distribución de los resultados del diagnóstico de gestación (DG) según el método de reproducción.

MÉTODO REPRODUCTIVO	DG SI	DG NO	TOTALES	%F
<b>GRUPO CN</b>	332	309	641	51,8
<b>GRUPO GPG</b>	25	34	59	42,4
<b>GRUPO CIRD<sup>®</sup></b>	64	67	131	48,8
<b>GRUPO PR</b>	9	12	21	42,9
<b>TOTALES</b>	430	422	852	50,5

Resultados del Test  $\chi^2$ :  $\chi^2 = 2,62$   $p = 0,454$  (no significativo).

Aunque hemos señalado que no hemos podido encontrar diferencias estadísticamente significativas en función del método de manejo reproductivo, queremos destacar el hecho de que las inseminaciones con semen sexado tras la sincronización con dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (Grupo C) alcanza un porcentaje de fecundidad muy próximo al obtenido con celo natural, mientras que Pérez-Marín (2009) refleja en su estudio que el porcentaje de fecundidad es un 15% inferior cuando se realizan inseminaciones a tiempo fijo que cuando se detectan los celos de forma natural. Esta divergencia podría ser explicada por el hecho de que en nuestro estudio, como ha sido indicado en el apartado de materiales y métodos, la IA sólo se realiza en aquellas novillas que muestren celo confirmado tras la palpación rectal. Además, se descartan también aquellas que en el momento de la IA han presentado una ovulación adelantada. En este estudio, con independencia del tratamiento, hemos utilizado los mismos criterios de optimización que quedaron valorados en el estudio 1 de esta memoria, y que aportaron una mejora en la eficacia reproductiva del método GPG.

### **6.5.3.- Comparación de los porcentajes de fecundidad del semen sexado y el semen convencional**

Si se comparan los resultados obtenidos en este estudio con otros realizados anteriormente en la misma Cooperativa y con semen convencional, comprobamos que los porcentajes de fecundidad son inferiores al utilizar semen sexado. Así, en el ensayo 1, del estudio anterior con semen convencional, en las 284 novillas inseminadas a celo natural se obtuvo un porcentaje de fecundidad del 69,7% y en las 167 novillas tratadas con Ovsynch (GPG) el porcentaje obtenido fue de un 61,1%. En el ensayo 2, realizado con 178 novillas sincronizadas con el método CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-Opción 2, el porcentaje de fecundidad tras la IA fue del 70,2%.

Estas diferencias eran esperables, porque es importante tener en cuenta que la fertilidad del semen sexado es menor, estimándose en torno a un 20% inferior al semen convencional (DeJarnette et al., 2010). Estas variaciones son atribuibles no sólo a la menor concentración de espermatozoides de las pajuelas (2 millones *vs* 15 millones), sino también a la calidad de los mismos, que se pueden ver alterados por el proceso de separación.

Chebel et al. (2010), reportan en sus dos estudios, realizados con novillas a la primera IA unas diferencias del 13,7% y del 10,3%, respectivamente, entre los porcentajes de fecundidad obtenidos con semen convencional y con semen sexado.

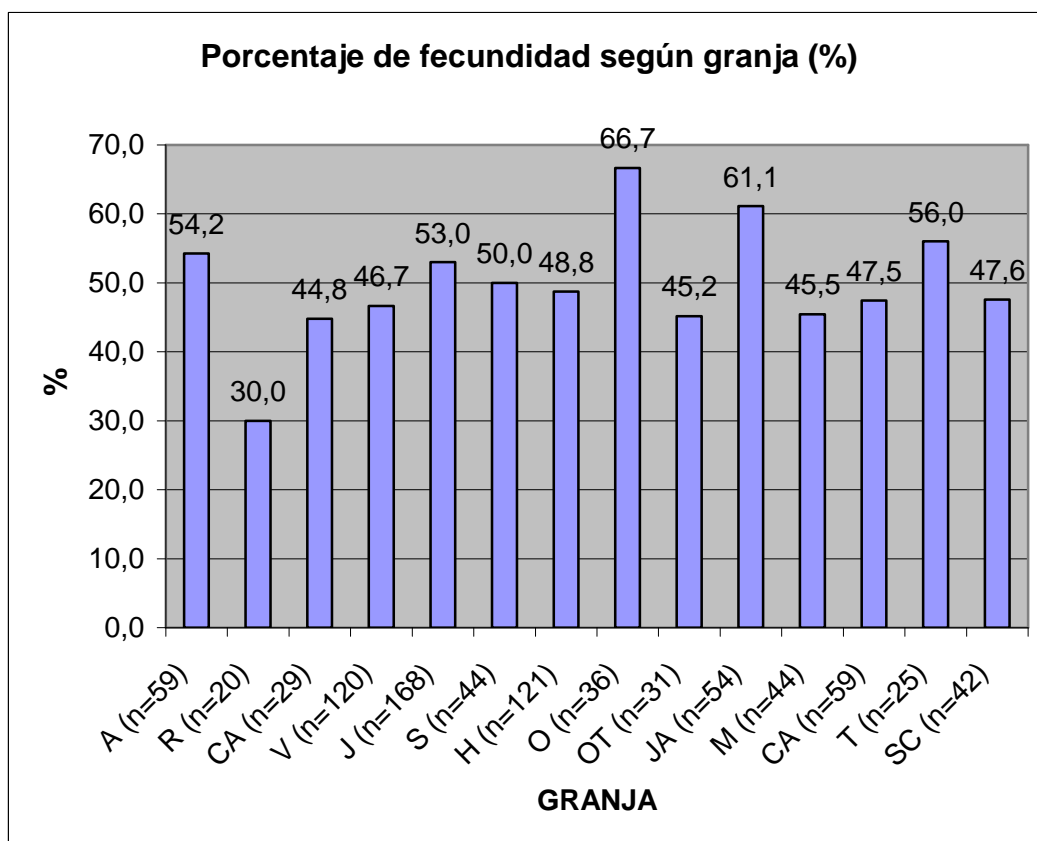
Teniendo en cuenta todos estos datos, se puede decir que los resultados obtenidos en nuestro estudio son homogéneos y relativamente buenos en todos los grupos, ya que los %F medios oscilan entre 18 y 22 puntos porcentuales menos que los obtenidos con el semen convencional en la misma Cooperativa, aunque algo peores que los porcentajes de fecundidad de los estudios antes citados.

Colazo y Ambrose, (2013) investigaron si el protocolo PRID<sup>®</sup>-Co-Synch modificado de 5 días (es decir sin la GnRH inicial) es adecuado para el uso de semen sexado en novillas lecheras. En un diseño experimental dos por dos, novillas cíclicas fueron divididas para recibir dos tratamientos de PGF<sub>2α</sub> separadas 14 días con la IA, 12 horas después de la detección de celos, o un protocolo PRID<sup>®</sup>-Co-Synch modificado de 5 días con IATF 72 horas después de la retirada del dispositivo intravaginal y la administración de PGF<sub>2α</sub>. Las novillas fueron inseminadas con semen sexado o semen convencional de uno de los cuatro toros utilizados en el estudio. El porcentaje de fecundidad global fue mayor en novillas inseminadas después de la detección del estro que en aquellas sometidas a la IATF (70 vs. 63%, respectivamente). Más importante aún, las novillas que fueron

IATF con semen sexado tuvieron una tasa de preñez del 61%, que no fue estadísticamente diferente de la tasa de preñez de las novillas inseminadas con semen convencional (64%).

### 6.5.4.- Porcentajes de fecundidad según granja

Además del método de manejo reproductivo, otro de los parámetros considerados a la hora de analizar los porcentajes de fecundidad fue el factor granja (Figura 6.4).



**Figura 6.4.** Distribución de los porcentajes de fecundidad según granja.

Resultados del Test  $\chi^2$ :  $\chi^2 = 12,99$   $p = 0,45$  (no significativo).

Aunque las variaciones en los porcentajes de fecundidad entre las distintas explotaciones no llegan a ser estadísticamente significativas ( $p = 0,45$ ), comprobamos la existencia de importantes diferencias entre ellas, por ejemplo el 66,7% de la explotación O frente a un 30,0% de la ganadería R.

Cuando se evalúan estos mismos parámetros pero solamente en las novillas que son inseminadas por primera vez, las diferencias entre los porcentajes de fecundidad se muestran igualmente no significativas ( $\chi^2 = 15,08$ ;  $p = 0,31$ ), lo que podría ser explicado por unas condiciones similares en el manejo de las novillas en las distintas explotaciones.

No obstante, pensamos que las diferencias observadas pueden ser también atribuidas a la fertilidad del semental utilizado, ya que los sementales empleados en las granjas son distintos, salvo alguna excepción. Este parámetro se estudiará más adelante en este mismo estudio.

#### **6.5.5.- Porcentajes de fecundidad según número de IA**

En nuestro estudio, tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,87$ ) cuando se tiene en cuenta el número de IA al que fueron sometidas las novillas (*tabla 6. 2*).

Atendiendo a estos resultados, se observa que el porcentaje de fecundidad en las novillas inseminadas por primera vez es del 50,2%, muy similar al porcentaje de fecundidad medio. En las novillas sometidas a más inseminaciones existen pequeñas variaciones en el porcentaje de fecundidad, pero sin que éstas sigan ningún orden descendente o ascendente, tal y como había señalado Dejarnette et al. (2009). Por eso, y dado el reducido número de animales

sometidos a 3 ó más inseminaciones incluidos en nuestro estudio, no se pueden establecer conclusiones en cuanto a este parámetro.

**Tabla 6.2.** Distribución de los resultados del diagnóstico de gestación (DG) en función del número de IA al que fue sometida la novilla.

Nº IA	DG SÍ	DG NO	TOTALES	% DE FECUNDIDAD
<b>1</b>	328	326	654	50,2%
<b>2</b>	80	78	158	50,6%
<b>3</b>	16	15	31	51,6%
<b>4</b>	5	2	7	71,4%
<b>5</b>	1	1	2	50,0%
<b>TOTALES</b>	430	422	852	50,5%

Resultados del Test  $\chi^2$ :  $\chi^2 = 1,274$ ;  $p = 0,87$  (no significativo).

### **6.5.6.- Porcentajes de fecundidad según semental utilizado en la IA**

No sólo son importantes las novillas y cómo se manejan, sino que los sementales empleados para la obtención de semen sexado también tienen un papel fundamental en la eficacia de la IA y, por tanto, resulta necesario valorarlos. En este trabajo nos propusimos estudiar los porcentajes de fecundidad y otros parámetros en relación con el semental empleado (tabla 6.3). En esta tabla, los sementales aparecen clasificados en un ranking por porcentaje de fecundidad. Se



considera el grupo de "otros" al conjunto de los sementales con los que se han realizado menos de 10 IA.

**Tabla 6.3.** Relación de los porcentajes de fecundidad y otros parámetros reproductivos según sementales empleados en la IA

Toro (origen)	Nº Novillas Inseminadas	% Fecundidad*	Nº Bajas	Nº Abortos	% Desdencencia Hembra **	% Viabilidad
Jordan (Canadá)	27	77,8	4		100,0	100,0
Ace (Holanda)	25	72,0			83,3	100,0
Baltimor (Canadá)	15	66,7	4		83,3	100,0
Chapel (USA)	15	66,7			100,0	100,0
Seaver (Canadá)	11	63,6			71,4	100,0
Billion (USA)	19	63,2	4	1	57,1	100,0
Shamroch (USA)	16	62,5		1	100,0	100,0
Atlantic (USA)	29	62,1			100,0	83,3
Million (USA)	47	61,7	11	1	92,3	53,8
Sailing (Canadá)	13	61,5			87,5	87,5
Cabriolet (USA)	10	60,0	0	0	-	-
Legend (USA)	46	58,7	2		88,0	100,0
Armstead (USA)	19	57,9	7		100,0	100,0
Jerrick (Canadá)	21	57,1			100,0	100,0
Kampman (USA)	13	53,8			85,7	100,0
Kingly (Canadá)	82	53,7	7		97,3	100,0
Puzzle (USA)	42	52,4		1	66,7	100,0
Lavanguard (Canadá)	42	50,0	2		89,5	94,7
Macutchen (USA)	13	46,2			100,0	100,0
Otros (Varios Países)	105	45,7	7		92,1	97,4
Gabor (USA)	37	43,2	2		100,0	92,9
Logan (USA)	18	38,9			71,4	100,0
Lecciso (ITALIA)	13	38,5			100,0	100,0
Mascalesse (Italia)	65	36,9		1	95,7	95,7
Lureck (Canadá)	38	36,8		1	85,7	100,0
Nitro (USA)	16	31,3	2		100,0	66,7
Spectrum (Canadá)	13	30,8		1	100,0	0,0
Cole (USA)	11	27,3	1		100,0	100,0
Steady (Canadá)	14	21,4			100,0	100,0
Saloon (Canadá)	17	11,8			100,0	100,0
	852	50,5	53	7	92,3	95,0

\* Resultados test de  $\chi^2$ :  $\chi^2 = 58,97$   $p < 0,01$ .

\*\* Resultados test de  $\chi^2$ :  $\chi^2 = 37,37$   $p = 0,11$ .

Admitiendo las limitaciones propias de una muestra reducida como la nuestra, al analizar nuestros resultados se comprueba que existen diferencias estadísticamente significativas ente los porcentajes de fecundidad según semental utilizado en la IA ( $p < 0,01$ ).

Destacan, en este aspecto, dos toros que superan un porcentaje de fecundidad del 70% (incluso superior a lo esperado con semen convencional), por lo que podemos considerarlos como excelentes: Jordan y Ace. Tras éstos, y por encima del 65%, Baltimor y Chapel, seguidos de Seaver, Billion, Shamroch, Atlantic, Million y Mailing, todos ellos superando un porcentaje de fecundidad del 60% por lo que se podrían considerar como sementales muy buenos, en un segundo grupo.

Por otro lado, existen cinco sementales con un porcentaje de fecundidad muy bajo, inferior al 32%, lo que supone más de un 15% inferior a la media de nuestro estudio (50,5%).

En cuanto al resto de los sementales, observamos que 7 de ellos se sitúan por encima de la media con un rango entre 60,0% y 52,4%. Mientras que otros 7 junto con el grupo de Otros, se sitúan por debajo con un rango entre 50,0% y 36,8%.

Estas variaciones en los porcentajes de fecundidad se podrían relacionar con las prácticas de manejo de una explotación en concreto, pero se descarta esta hipótesis porque no todas las dosis de un mismo semental han sido empleadas en la misma granja, obteniéndose en general tasas altas, medias y bajas en todas las granjas en función del semental utilizado.

Las variaciones en el porcentaje de fecundidad entre los diferentes sementales son esperables, tal y como ya habían sido señaladas por Morotti *et al.*, en 2014, de hasta un 29% entre sementales.

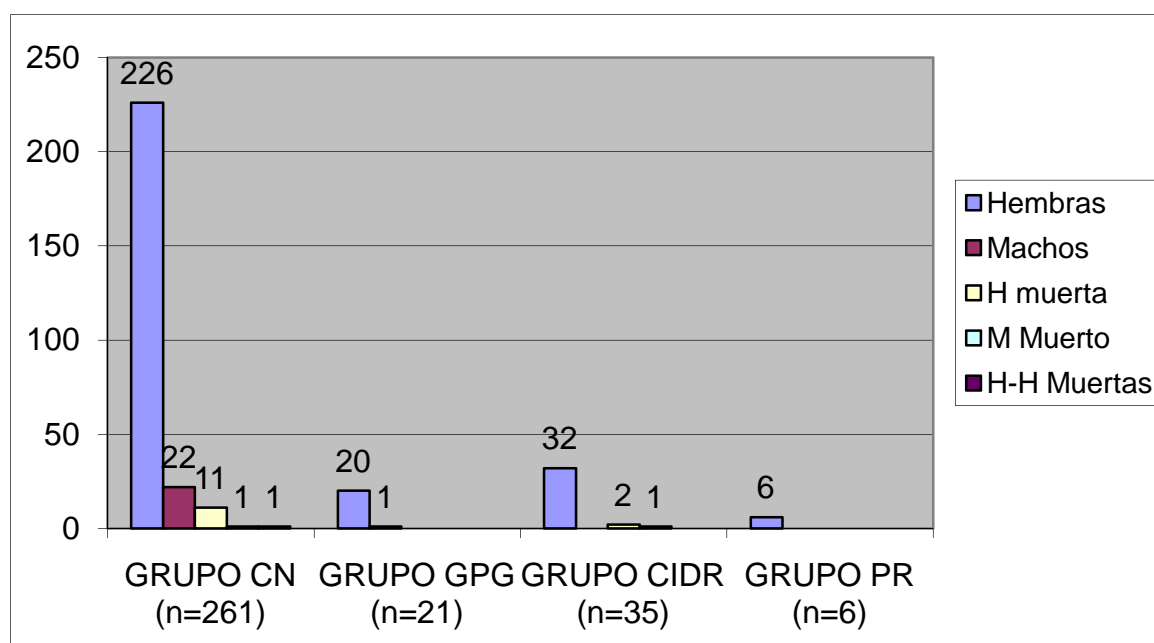
Según la bibliografía, estas variaciones pueden ser explicadas por la tecnología utilizada para la obtención del semen sexado en las distintas casas comerciales (Rath *et al.*, 2009), por el tipo de dosis utilizada (Lucena *et al.*, 2014) o por el método de conservación del mismo (Underwood *et al.*, 2010). En nuestro estudio, no se puede relacionar ni con el tipo de dosis utilizada, ya que todas son pajuelas con un volumen de 0,25 ml y 2 millones de espermatozoides, ni con el método de conservación, porque en todos los casos se conservan congelados en nitrógeno líquido. Así, la causa de estas variaciones, además de por la propia fertilidad intrínseca del semental, sería atribuible al método de separación y obtención en las casas comerciales, aún conociendo que la elaboración de todas las pajuelas en la actualidad está realizada por la misma tecnología (Sexing Technologies), propietaria de la patente de las máquinas de separación de los espermatozoides.

### **6.5.7.- Sexo de la descendencia**

De las 430 novillas que se diagnosticaron como gestantes, 53 de ellas causaron baja por distintos motivos en las explotaciones, por lo que no fue posible su seguimiento. Del resto de las 377 novillas inseminadas y diagnosticadas como gestantes, habían parido un total de 323 en el momento en el que se realizó este estudio. De ellas, 298 han tenido hembras, lo que supone una media de  $92,3 \pm 1,5\%$ . En el caso de los machos, nacieron un total de 25 (7,7%).

Según nuestros resultados, ni el método utilizado para el manejo de la reproducción ( $p = 0,503$ ) en las diferentes granjas (Figura 6.5), ni el número de

IA practicado ( $p = 0,732$ ) influyeron sobre el sexo de la descendencia, lo que parece lógico. Sin embargo en función de la granja las diferencias observadas en cuanto al sexo de la descendencia no pueden ser atribuidas al azar ( $p=0,03$ ). Estas variaciones podrían explicarse por los diferentes sementales empleados en cada granja, más que a cualquier otro factor del manejo implicado.



**Figura 6.5.** Distribución en valores absolutos del sexo de la descendencia y la viabilidad de la misma según el método empleado en el manejo reproductivo

Como ha sido señalado, el 92,3% de las crías paridas por las novillas han sido hembras, por lo que se cumplen las expectativas, ya que el uso de semen sexado proporciona un porcentaje de hijas hembras de aproximadamente el 90% (Dejarnette *et al.*, 2009; Morotti *et al.*, 2014). Cifra señalada por las propias casas comerciales de distribución del semen.

En el caso del semen convencional, el nacimiento de hembras y machos está equilibrado, siendo aproximadamente del 50% (Xu, 2014). Otros autores precisan estos porcentajes, en un 48% para hembras (Norman *et al.*, 2010) y un 52% para machos (Tubman *et al.*, 2010). Basándonos en estos datos, podríamos

indicar que la principal ventaja del semen sexado es asegurar una descendencia hembra, unos 40 puntos porcentuales superior al semen convencional, lo que resulta fundamental en las explotaciones lecheras en cuales se necesite una gran tasa de reposición (Hosseini-Zadeh *et al.*, 2010).

Si sólo tenemos en cuenta los nacimientos obtenidos con la primera IA obtenemos una descendencia hembra del 93,1% (229 hembras/246 nacidos) y si la limitamos a la obtenida exclusivamente con el celo natural (Grupo A) es del 91,2% (238 hembras/ 261 nacidos).

Atendiendo al porcentaje de fecundidad obtenido en este grupo A (CN) del 51,8%, nuestros resultados indicarían que tras inseminar 100 novillas, se obtendrían 47 hembras a la primera inseminación, o dicho de otra forma, por cada 100 pajuelas de semen sexado utilizadas en novillas con celo natural e inseminadas por primera vez, obtendríamos entre 41 y 53 hembras para una probabilidad del 95%.

Esta cifra es un 33% superior a la que se obtendría al inseminar 100 novillas con semen convencional, considerando las cifras antes señaladas para nuestra Cooperativa (porcentaje de fecundidad = 69,7%; nacidas hembras= 47%). En este caso, con 100 pajuelas de semen convencional se obtendrían 33 hembras.

Teniendo en cuenta estas cifras, comprobamos un valor predictivo de 1,8 veces superior de obtener una hembra tras inseminar por primera vez una novilla con semen sexado frente al semen convencional (Tabla 6.4).

**Tabla 6.4** Tabla de asociación estimada a partir de las tasas obtenidas de hembras nacidas en función del tipo de semen utilizado

	<b>SEMEN SEXADO</b>	<b>SEMEN CONVENCIONAL</b>
<b>TOTALES 1ª IA</b>	229	284
<b>ESTIMACIÓN DE HEMBRAS NACIDAS</b>	108	93

Resultados: Odds ratio= 1,83; IC 95%= 1,28 – 2,62

Si analizamos el sexo de la descendencia en relación con el semental empleado para la IA, comprobamos que existen importantes diferencias, aunque en nuestro estudio no alcanzan a ser estadísticamente significativas ( $p = 0,11$ ). La muestra reducida, especialmente en algunos de los sementales podrían explicar estos resultados no significativos, los que deberían ser contrastados con mayores muestras ya que pensamos que los porcentajes del sexo de la descendencia según semental, al igual que ocurre en sus porcentajes de fecundidad no serían atribuibles al propio azar.

No obstante, cabe destacar como en algunos toros como Billion, Seaver, Puzzle y Logan sus porcentajes de descendencia hembras se sitúan por debajo del 75%. En contraposición a los sementales que arrojan un 100% de descendencia hembra, incluso algunos de ellos con un número considerable de novillas inseminadas (por encima de 10 novillas) como Jordan, Chapel, Atlantic, Jerrick y Gabor. En el estudio realizado por Morotti *et al.*, (2014), también comprueban diferencias de hasta 13 puntos porcentuales entre unos sementales y otros en relación con el género de la descendencia, por lo que estas variaciones estarían

justificadas y serían atribuibles fundamentalmente al método de obtención del semen (Rath *et al.*, 2009).

### **6.5.8.- Viabilidad de la descendencia: abortos y nacidos muertos.**

Entre las 377 novillas gestantes y que permanecieron en las granjas, solamente se produjeron 7 abortos, lo que supone un 1,8%. Estos abortos corresponden a 7 sementales diferentes, por lo que no se pueden relacionar con ninguno de ellos. El porcentaje de abortos al utilizar semen sexado y convencional, ha sido valorado en un 6,1% y un 6,5%, respectivamente, sin que exista relación entre el tipo de semen y el número de abortos (Healy *et al.*, 2013).

En cuanto a la viabilidad de la descendencia, de las 299 hembras nacidas (ya que uno de los partos fue gemelar), 15 de ellas nacieron muertas, incluyendo las gemelas, lo que supone un 5,0%. En el caso de los machos, de los 25 nacidos, dos nacieron muertos, lo que supone un porcentaje de mortalidad del 8,0%. Hay que tener en cuenta que ha sido señalado que la mortalidad es mayor en el caso de los machos cuando se utiliza semen sexado (Healy *et al.*, 2013). Además, la tasa de mortalidad en ambos sexos es un 1,5% mayor cuando se utiliza semen sexado que cuando se utiliza semen convencional (Healy *et al.*, 2013).

Si se relaciona la viabilidad de la descendencia con el semental empleado, no existen diferencias significativas pero, al igual que ocurría con el sexo de la descendencia, destacan dos de ellos por sus peores resultados, en esta ocasión son Atlantic y Million. De la descendencia del primero, en la que el 100% fueron hembras, 3 de las 18 nacieron muertas, lo que supone un 16,67% de mortalidad y de la descendencia del segundo: Million, de 13 nacidos, 6 nacieron muertos

(46,1% de mortalidad). De ellos 1 era macho y 5 hembras, entre las que se incluían, computando como una, el único parto gemelar de nuestro estudio.

No obstante, los resultados de nuestro estudio en cuanto al número de abortos y nacidos muertos es muy limitado, por lo que serían necesarios nuevos estudios con el fin de poder precisar estos aspectos de la reproducción de novillas con semen sexado.

## **6.6.- CONCLUSIONES**

1ª. El porcentaje de fecundidad medio en novillas frisonas obtenida con la utilización de semen sexado comercial queda estimado en un  $50,5 \pm 3,4\%$ , para un margen de confianza del 95%, siendo el porcentaje de hembras nacidas entre el 89,3% y el 95,3%.

2ª. La probabilidad de obtener una ternera tras la primera inseminación de una novilla con celo natural utilizando semen sexado queda estimada en un  $47,3 \pm 6,2\%$  para un margen de confianza del 95%.

3ª. De los factores estudiados en la utilización del semen sexado, granja, método de reproducción, número de IA y semental empleado, sólo este último se muestra significativamente influyente sobre los porcentajes de fecundidad de la novillas frisonas ( $p < 0,01$ ).

4ª y última. Se puede concluir que el uso de semen sexado en novillas de leche, a pesar de tener un porcentaje de fecundidad inferior al semen convencional, es una herramienta eficaz para garantizar una buena reposición de reproductoras, ya que la cantidad de hembras nacidas tiene un valor 1,8 veces superior al obtenido con semen convencional ( $p < 0,05$ ).



# **CAPÍTULO 7**

## **DISCUSIÓN GENERAL**



## **7.- DISCUSIÓN GENERAL**

---

Desde los inicios de nuestra actividad profesional en la Cooperativa AFRIVEPA, hemos empleado la IA en el manejo reproductivo tanto de vacas como novillas, y de esta forma, utilizando semen procedente de sementales probados con alto valor genético, hemos conseguido una continua mejora en las explotaciones. La aplicación comercial desde mediados del siglo pasado, ha hecho que la IA haya desplazado a la monta natural en el ganado vacuno de leche, constituyendo la IA desde hace décadas como una de las más importantes técnicas de reproducción asistida, ya que cumple los tres pilares básicos para su aplicación al resultar: simple, económica y exitosa (Vishwanath, 2003)

En nuestras granjas como norma general, siempre que se ha observado un celo en una vaca o novilla, es inseminada, bien por el ganadero o bien por el veterinario, en cuyo caso se comprueba previamente la idoneidad del momento. No obstante, para facilitar el manejo reproductivo también hemos ido incorporando distintos tratamientos de inducción/sincronización de celo/ovulación, en función de las necesidades y estrategias de cada explotación. Si bien algunos de estos protocolos han sido diseñados para la IATF, en nuestro caso cuando hemos utilizado algunos de estos tratamientos, siempre hemos querido comprobar cuantas de las vacas o novillas tratadas, realmente sincronizaban el celo u ovulaban, para realizar la IA sólo en aquellas que teníamos máximas garantías de estar en el momento oportuno. De esta forma, proporcionábamos a través de nuestra actividad técnica profesional un valor añadido al manejo reproductivo, descartando las hembras que por razones fisiológicas no estaban en condiciones para la fecundación.

## **7.1.- OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO OVSYNCH (GPG) EN NOVILLAS FRISONAS/HOLSTEIN, MEDIANTE LA SELECCIÓN DE LAS NOVILLAS A INSEMINAR**

Tal y como se describe en el capítulo de revisión bibliográfica, el grado de crecimiento folicular, la duración del proestro y el nivel de funcionamiento del CL son características fisiológicas que han sido relacionadas con la fertilidad de las hembras en el ganado vacuno. Estos factores pueden verse aún más comprometidos en las novillas, en las que todavía no se alcanzado un alto grado de madurez sexual, y por lo tanto los ciclos estrales pueden ser menos homogéneos, no sólo entre las distintas novillas, sino incluso en una misma novilla. Además, como ha sido señalado en la revisión, las novillas presentan generalmente tres ondas foliculares en su ciclo estral.

Estos aspectos de la fisiología de la reproducción, aunque difíciles de controlar, son susceptibles de ser modificados mediante tratamientos hormonales. Tratamientos hormonales que a su vez han permitido conocer mejor los efectos de los factores antes señalados sobre la fecundación y la supervivencia embrionaria. A partir de todos estos conocimientos se han podido fundamentar las estrategias encaminadas a mejorar los rendimientos reproductivos.

En nuestra opinión, estas estrategias no sólo deben centrarse en la búsqueda de protocolos hormonales más efectivos, bien incorporando o sustituyendo los fármacos empleados, bien ajustando las dosis y pautas, etc. que conduzcan a mayores índices de fecundación y supervivencia embrionaria, tras la IA; sino que también deben contemplar mejoras en el manejo, involucradas en el éxito o en el fracaso de la IA.

Mejoras en el manejo, no sólo limitadas a la habilidad y experiencia técnica, el manejo del semen, y el depósito correcto del semen en el útero durante la IA

(Barth, 1993), sino también cualquier otra que conduzca a que el encuentro de los gametos se produzca en las mejores condiciones reproductivas y en el momento preciso. En esta línea, fue enfocado nuestro primer ensayo clínico, precisar y valorar ciertas condiciones de la esfera reproductiva de las novillas, previas y en el momento de la IA, que permita mejorar un protocolo de sincronización/ovulación a tiempo fijo, como el Ovsynch (GPG).

Entendemos que esta selección de las novillas a tratar e inseminar sería necesaria para cualquier otro método de inducción/sincronización de celo/ovulación, lo que permitiría mejorar los rendimientos reproductivos en todos ellos, y así conseguir un importante ahorro económico en semen, además de una ganancia de tiempo para la posible concepción, con un anticipo de la vida productiva.

Nuestra experiencia, antes de realizar una IA en cualquier vaca, ya sea nulípara, primípara o multípara, nos ha conducido a practicar un examen ginecológico para valorar el celo y precisar en qué ovario se encuentra el folículo preovulatorio, y después depositar el semen en el cuerno apropiado. Esta práctica, nos ha permitido mejorar los índices reproductivos de nuestras explotaciones.

Para valorar esta mejora empírica y dar fundamento a lo que veníamos realizando desde hace años, fue diseñado el estudio 1 presentado en esta memoria, que si bien fue realizado posteriormente a otros ensayos que se presentan en este trabajo, lo incluimos en primer lugar en la memoria, en aras de otorgar una presentación más lógica.

Elegimos el método GPG como protocolo de sincronización, porque es uno de los que en novillas ha arrojado unos resultados peores, y que, sin embargo, en nuestro caso, no los habíamos observado como tan decepcionantes. Los conocimientos publicados y nuestra propia experiencia, nos había conducido a

determinar que la mejor variante del método GPG para novillas, era la administración de PGF<sub>2α</sub> en el sexto día a partir de la primera inyección de GnRH, en lugar del día 7 como en las vacas. Este protocolo junto con los criterios de selección de las novillas a tratar e inseminar, nos proporcionaba aparentemente unos resultados más aceptables que los recogidos en la bibliografía.

En nuestra cooperativa es una práctica habitual el protocolo GPG en vacas, y por extensión también es utilizado en novillas. Ambos protocolos se ejecutan paralelos en el tiempo salvo la primera inyección de GnRH que en las novillas se administra un día después y esto hace que el manejo de los animales y el trabajo veterinario con visitas programadas se efectúe el mismo día.

El estudio clínico 1, la optimización del método GPG, nos ha permitido confirmar una impresión en un hecho cierto y que nos reafirma que estas mejoras en el manejo y la técnica, que sólo pueden ser proporcionadas por el veterinario, se hacen imprescindibles para mejorar la eficiencia reproductiva y la rentabilidad de nuestras explotaciones.

Esta selección de las novillas a IA, según nuestros resultados, permite mejorar hasta un 15% los porcentajes de fecundidad con respecto a la IATF, alcanzando cifras que se aproximan a los porcentajes obtenidos en celo natural.

El incremento, en torno a un 15% en el porcentaje de fecundación, obtenido con la selección de las novillas, nos aproxima a las cifras obtenidas en IA a celo natural (Weigel, 2004; Kuhn *et al.*, 2006), si bien no llegan alcanzar las cifras más favorables valoradas incluso por encima del 65% (Seidel *et al.*, 1999, Sales, 2014). No obstante, la optimización del método propuesto tendrá un mayor o menor valor en función del porcentaje de detección de celo que se observe en cada explotación. Así en aquellas que la observación de celos sea menor, la rentabilidad del método propuesto será mucho mayor. De tal forma y según

nuestros resultados, podríamos admitir que en las granjas en las que la detección del celo en las novillas no supere el 80%, los porcentajes de fecundidad obtenidos a celo natural y mediante el protocolo GPG serían al menos similares, siempre y cuando las novillas a inseminar fueran seleccionadas siguiendo los criterios propuestos por nosotros.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, comprobamos un valor predictivo de 1,9 veces superior de que una novilla quede gestante tras recibir un tratamiento de sincronización GPG si antes de realizar la IATF se comprueba ginecológicamente que dicha novilla presenta un celo evidente o no se ha adelantado la ovulación, para decir si se insemina o no.

Debemos tener en cuenta que cualquier tratamiento hormonal no provoca en todas las hembras tratadas la misma respuesta. Así, los protocolos Ovsynch no sincronizan adecuadamente la ovulación en aproximadamente un tercio de las hembras de ganado vacuno. Rivera et al., (2004) observaron que un 17,7% de las novillas adelantan celo cuando se tratan con GPG, comprobando que el porcentaje de novillas sometidas a un protocolo GPG en el que se constató la regresión del CL y la ovulación fue del 81,2%. Mientras, que Colazo *et al.*, (2009b) reportaron que en vacas Holstein en lactación tratadas con Ovsynch el 11% ovuló antes de la IATF, el 12% no respondió al tratamiento de PGF<sub>2α</sub> y un 9% no ovularon después de la 2ª GnRH, lo que indica que la tasa de sincronización (definida como el % de vacas cuyo CL sufrió regresión y ovularon dentro de las 24 horas después de IATF) fue sólo del 68%.

Las novillas que no superen el reconocimiento ginecológico de celo no serán inseminadas, produciéndose en primer lugar un ahorro en las dosis de semen, y en segundo lugar una ganancia de tiempo para alcanzar la futura gestación, lo que a su vez disminuiría el tiempo no productivo del animal. De no observarse un nuevo celo, esta ganancia de tiempo podría alcanzar todo el

periodo tiempo transcurrido hasta el momento del diagnóstico de gestación, es decir entre 35-40 días.

Si estimamos que más de la mitad de las novillas descartadas podrían quedar gestantes en una nueva tentativa de IA, bien tras la detección de un nuevo celo o tras ser sometidas a otra nueva sincronización, podemos calcular una ganancia en el tiempo de producción láctea en torno a un mes para las novillas que no fueron seleccionadas en la primera sincronización. Sin duda el método de optimización reportaría unos claros beneficios económicos para la explotación, valorados no sólo en el ahorro económico del semen utilizado en las novillas, sino también en el anticipo de la vida productiva.

Si atendemos a nuestros resultados, comprobamos que el ahorro del semen podría alcanzar hasta un 25% de su coste, es decir por cada 1000 euros de gasto en el semen para inseminar a las novillas de una explotación ahorraríamos unos 250 euros, los que podrían ir destinados a la adquisición de dosis de semen de mejor calidad genética.

Por otro lado, si conseguimos adelantar la vida productiva de las novillas, o dicho de otra forma, si evitamos retrasos en la concepción de las mismas, que según nuestros resultados podrían alcanzar un 15%, disminuiríamos los costes de la recría. Aunque el tiempo sea breve, este puede alcanzar el periodo transcurrido hasta el diagnóstico de gestación, lo que sin duda sólo en alimentación supondría una cantidad a considerar. Hoffman (2014), sugiere que por cada ciclo estral perdido de retraso, un coste adicional de 44 euros puede ser imputado a los días de alimentación.



## **7.2.- PORCENTAJES DE FECUNDIDAD EN NOVILLAS DE LECHE: COMPARACIÓN DE DISTINTOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN/SINCRONIZACIÓN DEL CELO FRENTE AL CELO NATURAL**

Uno de los principales problemas en el control reproductivo de nuestras granjas es la falta de detección de celo, que si bien a pesar de ser más manifiesto sintomáticamente en las novillas, sus condiciones de manejo, junto con la menor atención que suelen recibir, hacen que esta falta de detección de celo se acentúe. Aunque se ha avanzado mucho en el estudio sobre la fisiología y técnicas reproductivas, sigue habiendo un muro que salvar en la IA: la detección del estro, que determina el momento óptimo de la inseminación. En este terreno no hemos podido competir con el toro como detector de vacas en estro. Además, las novillas suelen estar apartadas del núcleo principal de la granja, por lo que aún es más difícil prestar la adecuada atención para la detección del estro. La mejora en la detección del estro en novillas es una necesidad nunca lo suficientemente valorada, pero que podemos compensar en parte con un adecuado protocolo de sincronización del estro e inseminación a tiempo predeterminado. El control del ciclo estral nos permite sincronizar a las novillas y aumentar la eficacia del uso de la IA. Otra ventaja añadida es la interacción social entre los animales, ya que el aumento del número de novillas en celo en un periodo corto de tiempo puede mejorar la expresión del estro y por tanto facilitarnos su detección.

En este sentido y dado que en nuestras granjas veníamos utilizando distintos tratamientos de inducción/sincronización de celo/ovulación, nos propusimos valorar los más empleados en el manejo reproductivo de las novillas. Estudio que se ha sido presentado en el capítulo 5 (estudio clínico 2) de esta memoria. Concretamente valoramos la eficacia reproductiva de tres protocolos

(Crestar<sup>®</sup>, Ovsynch, y CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2), y los comparamos a la obtenida mediante IA en novillas a celo natural (celo visto).

Según nuestros resultados, los porcentajes de fecundidad (%F) obtenidos en los primeros grupos de tratamiento fueron, aunque inferiores que el grupo control (celo natural), más que aceptables, ya que proporcionaban cifras en torno al 61%. En el caso del tratamiento Ovsynch muy por encima de la mayoría de los porcentajes de fecundidad reportados en novillas. En el caso del grupo tratado con CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2, obtuvimos un %F similar al grupo control, calculado en nuestro estudio en un 70,2%. Que al igual que lo sucedido con el tratamiento GPG esta cifra era francamente superior a la mayoría de las publicadas. Recordemos que en estos ensayos clínicos, las novillas tratadas y que finalmente eran inseminadas atendían a los criterios de optimización establecidos por nosotros, por lo que los mejores resultados quedarían justificados, ya que en todos los grupos de tratamiento no todas las novillas se inseminan.

De los distintos tratamientos empleados por nosotros, los mejores resultados han sido obtenidos con el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2. Cuando se combina el uso de progesterona con prostaglandinas puede conseguirse una mejor sincronización de la ovulación y del estro en las novillas cíclicas. El tratamiento con progesterona, debido a la retroalimentación negativa que ejerce sobre el hipotálamo para la liberación del pico preovulatorio de LH, no permite una nueva ovulación durante el tratamiento. La aplicación de prostaglandinas al final de un tratamiento con progesterona actúa sobre un posible cuerpo lúteo presente antes de la aplicación de la progesterona. Por otra parte, estos métodos pueden inducir el estro en novillas no cíclicas, ya que pueden funcionar como inductores de la ciclicidad (Anderson et al., 1996), y mejorar con ello el nivel de detección de estros (Richardson et al., 2002, citado por Elli, 2009).

A la vista de nuestros resultados, la sincronización del celo en novillas debe considerarse como una herramienta que reduce los costes de manejo implicados en la IA, toda vez que elimina la necesidad de detección de celo, además de controlar posibles retrasos de la pubertad. En este sentido cabe señalar como hace Risco (2002), que la eficacia de gestación, que nosotros en nuestro estudio hemos denominado porcentaje de gestación (%G), lo que en términos anglosajones se denomina "pregnancy rate", se define como el producto de la eficacia en la detección del celo (%C, es decir el porcentaje de detección de celo) por el porcentaje de fecundidad (%F) obtenida tras la IA. De esta forma, tanto el incremento en la eficacia en la detección del celo (%C), como en los porcentajes de fertilidad (%F) se traduce en las novillas en un acortamiento del periodo de inseminación que debe realizarse entre los 13 y 15 meses de edad cuando hayan alcanzado al menos el 55% del peso vivo adulto. Este efecto se traduce evidentemente en un aumento de la productividad lechera de la novilla en sus futuras lactaciones y reduce notablemente el porcentaje de eliminación por problemas reproductivos, así como los costes al reducir los días improductivos.

En realidad, los métodos de sincronización que permiten una IATF es como si incrementaran la eficacia de la detección del celo hasta el 100%. No obstante, como hemos indicado repetidamente, según nuestra experiencia para obtener los mejores resultados sólo llevamos a cabo la IA cuando comprobamos que las novillas están en celo, especialmente al comprobar la presencia del folículo preovulatorio.

Por ello hemos querido comparar los distintos métodos utilizados asimilando el %G del grupo control, al %G de los grupos tratados, considerando este porcentaje en función del total de las novillas tratadas, cuyos resultados hemos recogido en las Tablas 5.4 y 5.7. A la vista de los resultados, se advierte que el método Ovsynch es el que proporciona una eficacia reproductiva más baja, mientras que para el resto de los grupos sus %G podrían considerarse similares, si

bien el porcentaje más alto y que destaca incluso por encima del grupo control es el obtenido por el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2.

Hay que destacar también que la posibilidad de realizar IATF con los métodos de inducción y sincronización del celo, tiene la ventaja que la mayoría de las novillas que no quedan gestantes repiten celo sincronizadamente al cabo de 21 días, lo cual también es una ventaja añadida de los métodos de inducción y sincronización, porque es coincidente con la visita veterinaria programada semanalmente.

Risco en 2002, cuantificó económicamente la ganancia de renta neta de un método de inducción y sincronización similar al utilizado por nosotros (CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2), frente a novillas inseminadas a celo visto, teniendo en cuenta una serie de parámetros, tales como el coste del tratamiento (20 euros, incluidos gastos de aplicación), coste de pajuela de semen (60 euros), coste diario del mantenimiento de las novillas por encima de los 15 meses (2,50 euros/día) y coste de mano de obra para detección de celo en novillas (15 euros por granja). En esta valoración, aprecia que la ganancia de renta neta por novilla protocolizada con inseminación artificial a tiempo fijo a las 56 h, asciende a 162,5 euros en comparación con el sistema de inseminación a celo visto. No obstante cabe advertir que en este cálculo no tuvo en cuenta las ventajas económicas que también conlleva la organización del trabajo, ni tampoco los beneficios sobre producción lechera de futuras lactaciones, ni los menores gastos de reposición al ganar una media de 40 días de adelanto en las IA de las novillas.

### **7.3.- VALORACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE SEMEN SEXADO EN LA INSEMINACIÓN DE NOVILLAS FRISONAS: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CELO NATURAL Y CON DISTINTOS PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN/SINCRONIZACIÓN DE CELO/OVULACIÓN**

A pesar de que la utilización del semen sexado en la IA del ganado vacuno de leche ha ido aumentando con el paso del tiempo en estos últimos años en nuestro País, pocos son los estudios publicados al respecto. Valorar los resultados obtenidos con el semen sexado y comparar los mismos con respecto al uso de semen convencional se hace necesario, no sólo desde un punto de vista general debido a la gran importancia económica del vacuno de leche como animal de producción, sino que desde un punto de vista particular, parece imprescindible para disponer de criterios objetivos a la hora de adoptar las decisiones oportunas en los programas reproductivos a desarrollar en las distintas explotaciones. En este trabajo, nos propusimos valorar la utilización del semen sexado en las hembras con mayores índices de fertilidad, las novillas, y comparar sus resultados con los obtenidos por nosotros con semen convencional.

Nuestro estudio sitúa al porcentaje de fecundidad global obtenido tras la IA de novillas con semen sexado, sin considerar ningún tipo de variable, en un  $50,5 \pm 1,7\%$ . Cifra que aun siendo inferior a la obtenida con semen convencional, se podría considerar muy buena, teniendo en cuenta que más del 90% de la descendencia va ser hembra. La gran mayoría de los estudios arrojan unos porcentajes con semen sexado inferiores a las obtenidos por nosotros, tanto de un punto de vista global o de forma particular cuando se comparan muestras con características similares (Seidel y Schenk, 2008; Domínguez *et al.*, 2011).

Desde la incorporación del semen sexado, sus porcentajes de fecundidad han sido considerablemente inferior a los obtenidos con semen convencional (Wheeler *et al.*, 2006; Seidel, 2007, citado por Cooke *et al.*, 2014), justificadas principalmente por el menor número de espermatozoides de las pajuelas y por una menor viabilidad de los mismos, consecuencia del propio proceso de clasificación y separación (Seidel *et al.*, 1999). Sin embargo estudios posteriores, debido a las mejoras en la obtención y congelación de este tipo de semen, han demostrado que las diferencias en los porcentajes de fecundidad entre semen sexado y convencional han ido reduciéndose, aunque sigue siendo inferior el porcentaje de fecundidad cuando se utiliza semen sexado (Hall *et al.*, 2010, citados en Cooke *et al.*, 2014).

Esta mejoría en los %F en la IA con semen sexado, también ha sido observada cuando se incorporan criterios de optimización a la hora de emplear métodos de sincronización y/o inducción de celo, hasta el punto de alcanzar cifras similares a las obtenidas con celo natural, como se refleja en nuestro estudio. Así, coincidiendo con los resultados de Sá Filho *et al.*, (2010), las diferencias observadas en nuestro estudio entre los %F según método reproductivo no alcanzaron significación estadística, tanto para las primeras, como las sucesivas IA.

En la mayoría de los estudios, tanto para semen sexado como para semen convencional, se señala unos mayores %F cuando las novillas son IA con celo natural frente a cualquier programa de IATF (Pérez-Marín, 2009). No obstante Colazo y Ambrose, en 2013, señalan en un estudio realizado con protocolo PRID<sup>®</sup> 5 días en novillas, la ausencia de diferencias significativas entre semen sexado y semen convencional (61% vs 64%).

Además, como hemos comprobado en nuestro estudio, cuando se incorporan criterios de selección en las novillas sometidas a los protocolos de

sincronización y sobre todo sólo se inseminan las que presentan celo manifiesto, los %F se aproximan a los obtenidos con celo natural. Esta selección que en un principio parece ir en contra del propósito de los métodos de sincronización de IATF a todas las hembras tratadas, en el caso de explotaciones no excesivamente grandes, donde todo el ganado puede recibir un manejo individual por parte del ganadero y del veterinario, permite como quedó demostrado en nuestro primer estudio clínico, unos mejores índices reproductivos y una mayor rentabilidad económica.

Evidentemente cuando se comparan los %F entre el semen sexado y el semen convencional, aplicando los criterios de selección por igual en ambos casos, las diferencias entre ellos vuelven a situarse en el margen esperado.

El %F obtenido con semen sexado ha sido reportado en torno a un 20% menor que el obtenido con el semen convencional (DeJarnette et al., 2010), no obstante existe en la bibliografía algunas divergencias, señalándose tanto diferencias mayores (Norman *et al.*, 2010), como menores (Seidel y Schenk, 2008; Domínguez *et al.*, 2011).

De acuerdo con la bibliografía consultada, las mayores diferencias entre los %F tras la IA con semen sexado, se observan cuando se considera como variable el semental empleado. Evidentemente las propias características intrínsecas de los distintos sementales van a condicionar sus índices de fertilidad, aun reconociendo que la muestra es reducida, en nuestro estudio ya hemos podido comprobar diferencias estadísticamente significativas entre los %F obtenidos en las novillas según semental utilizado (Seidel y Schenk, 2008). Destacando algunos sementales con cifras por encima de la que se podría esperar con semen convencional (superior al 70%), mientras que otros arrojan unos %F tan bajos (incluso inferiores al 30%) que desaconsejan su utilización.

En nuestra opinión, antes de comprar/utilizar una gran cantidad de dosis de un semental, debería ser valorada el %F obtenido tras la IA de unas cuantas novillas (8-10 serían suficientes) para desechar o confirmar la idea. En principio todos aquellos que se sitúen por encima de la media de nuestra cooperativa (%F>50%) podrían ser recomendados.

El sexo hembra de la descendencia tras la IA con semen sexado obtenido en nuestro estudio (de un  $92,3 \pm 1,5\%$ ), fue ligeramente superior al señalado en la bibliografía (Dejarnette *et al.*, 2009; Morotti *et al.*, 2014), así como al indicado por las propias empresas distribuidoras del semen (90% hembras), sin que se apreciaran diferencias estadísticamente significativas en función del semental empleado. Esta constancia en torno al 90% en la cifra del sexo de progenie y similitud entre los distintos sementales quedaría explicada por la precisión del método de separación que en todos los casos es el mismo, ya que en el mercado sólo hay disponible una única tecnología, la que es comercializada por la empresa que dispone de su patente (Sexing Technologies).

No obstante en nuestro estudio, aun reconociendo lo reducido de la muestra, se sugieren resultados que apuntan a posibles diferencias en el sexo de la descendencia, como el observado en función de las granjas, las que principalmente podrían ser atribuidas a las pajuelas de distintos sementales utilizados, que si bien anteriormente indicamos como no significativas, lo cierto es que realmente alcanzaron la casi significación ( $p < 0,1$ ). De mantenerse esta tendencia, con un mayor número en la muestra de estudio, podríamos confirmar esta significación. En este sentido, si bien la tecnología utilizada actual permite alcanzar una precisión en la clasificación del 90% de los espermatozoides, no necesariamente todas las dosis comercializadas presentan esta proporción. De hecho, el semental que en nuestro estudio arrojó una menor tasa de hembras en su progenie (Billion) fue precisamente el que sabíamos que algunas de las dosis



utilizadas presentaban unos porcentajes de espermatozoides con cromosoma X menores a los habituales.

Con vistas a valorar la probabilidad de obtener una descendencia hembra con la utilización del semen sexado frente al convencional, limitamos este análisis a novillas inseminadas por primera vez a celo natural, la que pudo ser precisada en 1,8 veces superior. Este resultado puede ser utilizado como base para organizar la reposición en una granja o para programar una venta de hembras, atendiendo al número de novillas que se precisaran inseminar y el número de dosis de semen necesarias.

Según la bibliografía consultada, en otros parámetros a tener en cuenta en toda gestación, como son la duración de la misma, el peso de la cría al nacimiento, la facilidad de parto, el vigor de la ternera o el peso al destete, no se aprecian diferencias respecto al uso de semen convencional (Tubman et al., 2004). Además, según Seidel Jr (2003), tampoco existen diferencias en la tasa de abortos, en la mortalidad neonatal ni en las anomalías que sufren los animales al nacimiento. Nuestros resultados, apuntan hacia estas apreciaciones de una forma global, si bien el reducido número de abortos y mortinatos observados, no resultarían suficientes para poder precisar estos aspectos, los que se deberían completar con nuevos estudios, ya que pensamos que sí podrían existir diferencias, particularmente en función del semental utilizado. No obstante, algunos autores señalan que el número los mortinatos en novillas es algo superior cuando se emplea el semen sexado frente al convencional, especialmente cuando la descendencia se trata de crías macho (Norman et al. 2010).

#### **7.4.- ESTRATEGIAS A DESARROLLAR EN EL CONTROL REPRODUCTIVO DE LAS NOVILLAS DE NUESTRAS GRANJAS.**

Tras revisar los conocimientos disponibles y analizar los resultados obtenidos en nuestros estudios, nos proponemos abordar nuestro último objetivo planteado en esta Tesis doctoral: *“Diseñar una estrategia futura, adecuada y eficaz para el control reproductivo de las granjas de vacuno lechero de la provincia de León, enfocado a las novillas de reposición”*.

Previamente, nos gustaría hacer una serie de consideraciones.

Hay que mentalizar al ganadero para que invierta más tiempo y esfuerzo en la cría de novillas y en su manejo reproductivo, pues representa un 15-20 % del coste total de producción.

En general, las novillas suelen estar fuera del alcance de la vista, en zonas menos accesibles de la explotación (ocupando a veces el espacio que ocupaban las vacas de producción en instalaciones antiguas y obsoletas), en praderas etc. También suelen ser encargadas las labores con las novillas a mano de obra poco especializada con errores frecuentes en el manejo, especialmente en lo que se refiere a la alimentación.

Del mismo modo en décadas pasadas, la cría de novillas ha recibido poca atención de la comunidad científica en comparación con las vacas en lactación. Como resultado, hay una limitada información en varias áreas del manejo de novillas. Por ejemplo, el anestro, no ha sido tan frecuentemente estudiado en novillas de leche.

Las novillas de reposición a menudo sufren un manejo deficiente y una alta proporción no llega a incorporarse al rebaño y producir, debido en muchos casos a

fallos en la fertilidad. Se ha demostrado que las pérdidas totales de vacuno joven hasta la edad del parto rondan el 25 % de las terneras nacidas (Brickell *et al.*, 2008)

Es primordial contar con un registro de datos de reproducción o crecimiento, pues nos van a ayudar en la toma de decisiones. Hay que intentar por todos los medios a nuestro alcance, hacer ver al ganadero que sin este registro el fracaso va a estar garantizado.

La mayoría de los productores de leche no saben el estado real del rendimiento reproductivo de sus novillas. Por lo tanto, se deben hacer esfuerzos para evaluar el nivel de detección de celo, que en muchas ocasiones es bajo debido a la escasa observación, así como anotar los resultados del porcentaje de fecundación de las novillas, y por lo tanto, la eficiencia con que conseguimos gestaciones.

A la hora de plantearnos desarrollar un programa reproductivo en novillas debemos tener en cuenta 3 factores importantes: la edad, la condición corporal y un estado adecuado del tracto reproductivo, que inciden sobre la ciclicidad en las novillas.

Como ha sido señalado, en el control reproductivo de las novillas el objetivo es conseguir el primer parto a los 24 meses, esto implica que debemos conseguir una inseminación fértil al menos a los 15 meses. No obstante, este tiempo puede variar en función de los factores antes señalados y según el tipo de manejo, así las primeras IA en las novillas se realizan entre los 13 y 18 meses de edad y por tanto los primeros partos ocurren entre los 23 y 31 meses.

Las explotaciones más grandes alcanzan edades al primer parto más tempranas en comparación con las explotaciones más pequeñas. La causa puede

ser debida a grupos más homogéneos de novillas y el uso de estrategias reproductivas más adecuadas, además de mejores instalaciones en general. Los ganaderos y veterinarios necesitan prestar atención a la distribución de la edad al primer parto, no simplemente a la media de edad al primer parto (Jiménez, 2013).

Los ganaderos del futuro también deberían tratar de no criar más novillas que las que realmente necesitan para mantener su censo. Hay que tener en cuenta las limitaciones que se imponen por parte de las centrales lecheras y adaptarse, pues la leche fuera de esos patrones de producción, hoy en día va ser vendida a precios irrisorios. Por ello, la pregunta que deben hacerse los ganaderos, es ¿cuántas novillas necesitan criar para mantener el tamaño de la explotación? Para responder a esta pregunta hay que tener en cuenta el porcentaje de eliminación en las vacas en lactación y la edad al primer parto. Podemos recurrir a utilizar una interesante herramienta libre en internet, accesible al público en general en <http://dairymgt.uwex.edu/tools.php>.

A la hora de establecer una estrategia, que no necesariamente debe ser única, ya que puede variar en función de las características y necesidades de cada granja, el primer factor condicionante que nos planteamos es la eficacia en la detección de celos.

Por parte del ganadero hay demasiada confianza en la observación visual del celo natural. Se ha demostrado que el uso de ayudas a la detección de celo: pinturas en la base de la cola, dispositivos Kamar<sup>®</sup> o medidores electrónicos de actividad (podómetros) etc. mejoran significativamente la tasa de inseminación y, tras tener en cuenta consideraciones de explotación y el aspecto financiero, consideramos recomendable el uso de estas tecnologías en nuestras granjas.

En general, las novillas bien manejadas deberían alcanzar la pubertad y tener ciclos normales reproductivos alrededor de los 11-12 meses de edad. Por lo

tanto, como normalmente las novillas entran en las rutinas de inseminación-reproducción a los 13-14 meses y como muestran signos claros de estro que duran 12-18h, la mayoría de las explotaciones que utilicen rutinas sistemáticas de detección de celos tales como observación sistemática de celos o ayudas a la detección de celos tienden a tener un detección de celos excelente en este tipo de animales con unas tasas de 65-70% o más (Chebel, 2010).

Una opción importante a la que recurren mucho los ganaderos es al uso de las prostaglandinas como inductoras de celo en novillas cíclicas. En nuestra opinión este uso es una buena elección para acortar la media de días que transcurren hasta la IA. La administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induce un comportamiento de celo más sincronizado, facilitando la detección de celo en más novillas en un periodo tiempo, por comportamiento e interacción social (más animales en celo simultáneamente). El uso de prostaglandinas puede reducir el tiempo hasta conseguir la gestación en unos 7 a 10 días en novillas de leche en comparación con las novillas no tratadas (Chebel, 2010).

Un 72% de novillas fueron detectadas en celo dentro de la semana posterior al tratamiento con una dosis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; mientras que sólo un 36% de novillas que no recibieron tratamiento fueron detectadas en celo en el mismo periodo. Por tanto, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  doblaría la cantidad de novillas gestantes en el plazo de una semana. Además, el porcentaje de fecundidad no difirió entre las novillas inducidas a mostrar celo con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en comparación con las novillas no tratadas (Stevenson *et al.*, 2008a). Por eso no es sorprendente que el uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  como estrategia de sincronización sea ampliamente conocido y usado en novillas por todo el mundo.

Los porcentajes de fecundidad (P/IA) de las inseminaciones a celo visto espontáneo o provocado mediante tratamiento con prostaglandinas en novillas son excepcionales, por lo que en las explotaciones con buena rutina de detección

de celos no se necesita otra ayuda adicional de manipulación hormonal del ciclo estral.

Sin embargo, esta condición se da en muy pocas granjas. La inducción y sincronización del celo es un método válido para paliar esta situación toda vez que permite mejorar la eficacia de la Inseminación Artificial, aparte de las siguientes ventajas:

- Soluciona la falta de detección de celos, ya que incluso permite la IATF.
- Permite hacer lotes para venta. Fue una práctica muy habitual hace unos años en las regiones donde existía comercio de novillas y además es aplicable en animales que se destinan a subastas, concursos etc.
- Permite hacer lotes programados para producción. Una característica a tener en cuenta en la IA de las novillas es que el efecto del estrés por calor es menos importante que en las vacas (Sartori 2002), por lo podemos adelantar o retrasar la IA de las novillas para suplir la falta de partos de las vacas.
- Aumenta la eficacia de la IA. Estos tratamientos tienen un valor esperado neto mayor (VAN) que un programa de detección de celos visual (Olynk y Wolff, 2008).
- Facilita el manejo y la atención por el ganadero. Es importante la interacción social entre animales (más celos concentrados en menor tiempo).
- Permite utilizar dosis de semen de altísima calidad genética con la mayor eficacia (dosis fraccionadas). Tema muy importante hace unos años pues las dosis de semen tenían unos precios muy altos, hoy con la puesta en el mercado de más

sementales y la importancia de la competencia comercial ha hecho que esta casuística tenga menos importancia.

- Organiza el trabajo veterinario. En base a nuestra experiencia y rutina de trabajo, con visitas programadas semanalmente (independientemente del tamaño de la granja), un protocolo que demostró eficacia, como ya quedó reflejado en el ensayo clínico 1, es el Ovsynch (GPG) de 6 días, pues permite con su correspondiente optimización unos porcentajes aceptables de fecundidad y además hay que variar sólo un día con respecto al uso del GPG en vacas. Esto hace que los dos protocolos sean paralelos en el tiempo y no necesiten visitas suplementarias. Por otra parte al ser las visitas semanales (múltiplos de 7) coincidiremos en muchos casos con las posibles repeticiones de celo a los 21 días.

Desde el punto de vista de producción, la correcta identificación y procedencia de los animales garantizan los procesos de mejoramiento y aumento en los niveles de producción. Se ha demostrado que el apareamiento no aleatorio de animales que están emparentados conlleva a la endogamia y esta tiene un efecto negativo directo sobre parámetros productivos como fertilidad, número de hijos por animal, sobrevivencia de los animales, ganancia de peso, producción de leche. Se ha comprobado que en iguales condiciones de manejo (estar criados los animales en el mismo centro), los porcentajes de fecundidad en novillas sufren una variación importante teniendo en cuenta el % de consanguinidad.

Conociendo estos datos es imprescindible hacer un buen programa de acoplamiento con sementales mejorantes, para evitar los aspectos negativos de la endogamia y a su vez potenciar todos los aspectos positivos que esta herramienta nos proporciona.

Otra herramienta valiosa y con gran futuro, es el test genómico, para que los productores de leche puedan mejorar su eficiencia criando menos animales.

Este test se podría realizar en todas las terneras justo después del nacimiento y así mantener sólo los mejores animales” (Cabrera, 2013, citado por Jiménez, 2013). El test genómico en estos momentos puede resultar todavía caro, pero podemos recurrir, en las granjas con control lechero y adscritas a CONAFE, a los datos de los animales reflejados en el índice de pedigrí.

Por último, ante la decisión de usar semen sexado o semen convencional es importante tener en consideración y evaluar con mucho detenimiento variables como el precio de las novillas de reemplazo, precio de la leche, precio de las vacas para eliminar, así como variables productivas tales como porcentajes de fecundidad. Para garantizar una fecundidad aceptable, Select Sires recomienda restringir el uso de semen sexado al primer y segundo servicio de novillas nulíparas cíclicas con celo detectado. Sin embargo, algunos autores señalan que protocolos de sincronización con progestágenos (PRID<sup>®</sup>) han proporcionado resultados similares a los obtenidos con celo natural con ambos tipos de semen (Colazo y Ambrose, 2011). Además, recientemente ha irrumpido en mercado el denominado semen “Sexed Ultra<sup>®</sup>” (Sexing Technologies) que ofrece un 94% de efectividad en comparación con el semen convencional (Moreno, 2015).

Tras todas estas consideraciones, formularemos una propuesta general de manejo reproductivo a llevar a cabo en las novillas de nuestras granjas.

En aquellas granjas que la detección de celos sea deficiente, aplicaremos programas de inducción/sincronización de celo/ovulación en todas las novillas de reposición, utilizando en las dos primeras IA semen sexado.

Según nuestra experiencia el tratamiento CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56 horas, opción 2, es el que alcanza unos porcentajes de fecundidad, incluso por encima de los obtenidos en la IA con celo natural, por lo que sería el método a utilizar, si bien también ha sido señalado PRID<sup>®</sup>/CIDR<sup>®</sup> de 5 días con resultados similares (Colazo



y Ambrose, 2011). Este protocolo de 5 días ha sido modificado (sin GnRH inicial, una sólo inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a la retirada e IA a las 72 horas de retirado el dispositivo intravaginal de progesterona), lo que hace que éste sea muy práctico y de fácil cumplimiento.

En las granjas con buena detección de celos, se comenzará por inseminar las novillas a celo visto. Aquellas en las que no se haya visto celo se les administrarán prostaglandinas con un protocolo de 14 días entre ambas. Las que no manifiesten celo entrarán en un programa con progestágenos como los anteriormente señalados.

En ambos casos, una vez realizado el DG negativo, las novillas se volverán a resincronizar con protocolo de progestágeno.

Si la granja precisara crecer o incrementar su reposición por diferentes causas, lo aconsejable sería el uso de protocolos de PRID<sup>®</sup>/CIDR<sup>®</sup> y semen sexado.

En aras de alcanzar mayor rentabilidad se aconsejaría el uso de semen sexado en nulíparas y primíparas, más las vacas múltiparas excepcionales, y al resto de las hembras inseminarlas con semen de cruce industrial.



# **CAPÍTULO 8**

## **CONCLUSIONES**



## **8.- CONCLUSIONES**

---

Tras analizar y discutir los resultados de nuestro trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones, las que fueron presentadas en cada uno de los estudios clínicos realizados y que ahora enumeramos a continuación:

- **Primera:** La selección de las novillas mediante el examen ginecológico, previo a un tratamiento de sincronización como a la hora de realizar la IATF es una herramienta útil para optimizar sus resultados, ya que permite descartar aquellas que difícilmente van a responder al tratamiento, bien por presentar malformaciones o poco desarrollo en su aparato reproductor.
- **Segunda:** La optimización del método Ovsynch (GPG) mediante la selección de las novillas a inseminar, mediante la confirmación de celo evidentes o la ausencia de una ovulación adelantada, proporciona unos porcentajes de fecundidad en torno a un 15% más elevado que los obtenidos cuando la IATF se realiza en todas las novillas tratadas.
- **Tercera:** La selección de las novillas mediante los controles ginecológicos señalados, previo al tratamiento Ovsynch (GPG) y previo a la IATF, elevan la probabilidad de gestación para un margen de confianza del 95% entre 1,4 y 2,6 veces, frente a las novillas que no son seleccionadas.
- **Cuarta:** Se estima que esta mejora en la eficacia reproductiva utilizando estos protocolos de la cría de la granja, proporciona unos mayores rendimientos económicos, derivados de disminuir en torno a un mes el periodo no productivo de al menos un 15% de las novillas, junto con el ahorro de un 25% del gasto en semen.

- **Quinta:** Los porcentajes de fecundidad medios obtenidos en la IA de novillas frisonas sometidas a un tratamiento de inducción/sincronización Crestar<sup>®</sup> y Ovsynch quedan estimados en torno a un 61% en ambos casos, cifra significativamente inferior al obtenido tras la IA de las novillas con celo natural, de un  $69,7 \pm 5,4\%$  ( $p < 0,05$ ).
- **Sexta:** Considerando el más que favorable porcentaje de detección de celo de un 80%, el porcentaje de gestación estimado para una población de novillas frisonas desciende a un  $55,8 \pm 2,6\%$ , aproximando esta cifra a los porcentajes obtenidos por los protocolos, tanto Crestar<sup>®</sup> como Ovsynch, cuando se consideran todas las novillas tratadas.
- **Séptima:** La combinación del dispositivo intravaginal (CIDR<sup>®</sup>) con una variante del método Ovsynch, el Co-Synch y la IA a las 56 horas tras la retirada del dispositivo, mejora en 9 puntos porcentuales al método Ovsynch, tanto el porcentaje de fecundidad como el porcentaje de gestación.
- **Octava:** El tratamiento CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-opción 2, cumpliendo nuestro método de optimización que limita la IA solo a aquellas hembras que presenten el momento adecuado para ello, se revela como un método de elección en el manejo reproductivo de las novillas en las explotaciones de ganado vacuno lechero, proporcionando un porcentaje de fecundidad, en torno a un 70%, similar al obtenido en la IA a celo visto, así como un porcentaje de gestación incluso superior, aún considerando el 80% de detección de celos.

- **Novena:** El porcentaje de fecundidad medio en novillas frisonas obtenida con la utilización de semen sexado comercial queda estimado en un  $50,5 \pm 3,4\%$ , para un margen de confianza del 95%, siendo el porcentaje de hembras nacidas entre el 89,3% y el 95,3%.
- **Décima:** La probabilidad de obtener una ternera tras la primera inseminación de una novilla con celo natural utilizando semen sexado queda estimada en un  $47,3 \pm 6,2\%$  para un margen de confianza del 95%.
- **Décimo primera:** De los factores estudiados en la utilización del semen sexado, granja, método de reproducción, número de IA y semental empleado, sólo este último se muestra significativamente influyente sobre los porcentajes de fecundidad de la novillas frisonas ( $p < 0,01$ ).
- **Décimo segunda y última:** Se puede concluir que el uso de semen sexado en novillas de leche, a pesar de tener un porcentaje de fecundidad inferior al semen convencional, es una herramienta eficaz para garantizar una buena reposición de reproductoras, ya que la cantidad de hembras nacidas tiene un valor 1,8 veces superior al obtenido con semen convencional ( $p < 0,05$ ).





# **CAPÍTULO 9**

## **RESUMEN/SUMMARY**



## **9.1.- RESUMEN**

---

La memoria presentada como Tesis doctoral es fruto del trabajo científico y profesional desarrollado dentro del campo de la reproducción del vacuno de leche, centrado en las novillas de reposición, las que constituyen el futuro de las explotaciones. Nuestro propósito era aportar nuestra experiencia, a partir de la labor desarrollada en la clínica de campo en esta última década y de esta forma proporcionar datos objetivos y rigurosos sobre el manejo reproductivo de las novillas. Para ello, tras una minuciosa y completa revisión bibliográfica, presentamos tres ensayos clínicos, los que fueron diseñados para poder ser realizados a partir del trabajo realizado rutinariamente en nuestras explotaciones de la Cooperativa AFRIVEPA de la provincia de León.

En el **primer estudio clínico** nos propusimos establecer y valorar unas pautas que aplicadas, bien a la hora de seleccionar las hembras para tratar o bien a la hora de realizar la IA, permitieran mejorar la eficacia de cualquier método de inducción/sincronización de celo/ovulación, si bien para nuestra comprobación decidimos realizarlo utilizando uno de los tratamientos que habían sido documentados con unos pobres resultados en novillas, el protocolo Ovsynch, con el fin de poner más de manifiesto como conseguir esta mejora.

Para este estudio se utilizaron 769 novillas de raza Frisona (Holstein) de distintas explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León. Todas las novillas presentaban unas características fisiológicas y anatómicas adecuadas para ser inseminadas (edad mínima de 14 meses, peso mínimo de 350 Kg., altura mínima a la cruz de 125 cm y una área pélvica mínima de 135 cm<sup>2</sup>). Además, todas las novillas se sometieron a una exploración ginecológica, excluyendo aquellas que presentaban cualquier malformación en su aparato reproductor o bien unos ovarios poco desarrollados. De forma alternativa y aleatoria se establecieron los dos grupos del ensayo (Grupo

A y Grupo B), los que fueron sometidos al mismo tratamiento de sincronización, el protocolo Ovsynch, administrando la inyección de la PGF<sub>2α</sub> en el día 6.

En las 371 novillas del Grupo A se realizó la IATF entre 12 y 24 horas (en un 90% a las 16 horas) después de la última inyección de GnRH. El Grupo B, constituido inicialmente por 398 novillas, en el momento de la IA fueron exploradas por palpación rectal, de tal forma que las novillas que no presentaron celo (ni actividad folicular) y las que mostraron signos de ovulación adelantada no fueron inseminadas. Por lo que finalmente este grupo quedó constituido por las 299 novillas que sí fueron inseminadas. La IA en todos los casos fue efectuada por el mismo veterinario, utilizando la técnica intracornual profunda ipsilateral al ovario con folículo pre-ovulatorio. El diagnóstico de gestación (DG) se efectuó por exploración rectal entre los 35-40 días tras la IA en todos los casos por palpación rectal.

Nuestros resultados demuestran que el porcentaje de fecundidad, %F= (novillas gestantes/novillas inseminadas) x 100, aumenta estadísticamente de forma significativa de un 45,3% hasta un 60,9% ( $p < 0,01$ ), mediante la selección de las novillas a inseminar. Este incremento, en torno a un 15% en el porcentaje de fecundación logrado con la selección, nos aproxima a las cifras obtenidas en IA de novillas a celo visto. Teniendo en cuenta nuestros resultados, comprobamos que el valor predictivo para que una novilla quede gestante tras recibir un tratamiento de sincronización Ovsynch es casi dos veces superior si antes de realizar la IATF se comprueba ginecológicamente que dicha novilla presenta un celo evidente o no ha adelantado la ovulación, para decidir si se debe inseminar o no.

En el **segundo estudio clínico** nos propusimos valorar, mediante la realización de dos ensayos clínicos, los porcentajes de fecundidad (%F) obtenidos tras la IA de novillas frisonas utilizando tres métodos diferentes de

inducción/sincronización de celo/ovulación y comparar estos %F con los obtenidos tras la IA convencional a celo natural (CN), así como entre ellos mismos.

En el primer ensayo fueron utilizadas 872 novillas de raza Frisona (Holstein) de distintas explotaciones pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA, localizadas en la provincia de León. Las novillas fueron clasificadas en tres grupos según manejo reproductivo. El **Grupo 1** (tratamiento Crestar<sup>®</sup>) quedó constituido por 366 novillas, el **Grupo 2** (tratamiento Ovsynch) con 222 novillas y el **Grupo 3** (Celo natural), constituido por 289 novillas, fue considerado el grupo control. Todas las novillas del estudio incluidas en el estudio cumplían unas condiciones anatomo-fisiológicas para poder ser inseminadas, confirmando mediante exploración clínica un aparato reproductor funcional y bien desarrollado. Además de acuerdo con nuestra pauta de optimización de los tratamientos de sincronización (abordado en el estudio anterior) a todas las novillas de los grupos 1 y 2 en el momento de realizar la IA se les practicó una exploración ginecológica, siendo descartadas las novillas que no presentaban folículo pre-ovulatorio ó aquellas en que se comprobaba un adelanto en la ovulación. Por lo cual en el grupo 1 se realizó la IA en 305 novillas, mientras que en el grupo 2, la IA se realizó en 167.

En el segundo ensayo fueron utilizadas 178 novillas (**grupo 4**), las cuales se sometieron al protocolo CIDR<sup>®</sup>-Cosynch 56 opción 2, y en las que aplicaron los mismos criterios de selección y optimización antes señalados, por lo que sólo en 151 de ellas se realizó la IA. El diagnóstico de gestación fue realizado a los 35-40 días de la IA por palpación rectal.

Los porcentajes de fecundidad (%F) obtenidos en los grupos 1 (tratamiento Crestar<sup>®</sup>) y 2 (tratamiento Ovsynch), de un 61,6% y un 61,1% respectivamente, fueron significativamente más bajos que el obtenido en el grupo 3 (CN) de un 69,7%. Sin embargo esta diferencia estadísticamente significativa no se comprobó

con el grupo 4 (CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch 56 opción 2), que presentó un %F similar al grupo control, calculado en nuestro estudio en un 70,2%.

Los porcentajes de sincronización (%S) obtenidos por el protocolo Crestar<sup>®</sup> y el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch56-opción 2, son prácticamente idénticos (83,3% vs 84,8%), por encima del obtenido en el protocolo Ovsynch (75,2%). Atendiendo a estos resultados, deberíamos admitir, que los tratamientos de sincronización empleados en nuestro estudio, incluido el protocolo Ovsynch, constituyen unos métodos válidos para el control reproductivo de novillas frisonas, ya que las cifras de sincronización obtenidas por ellos se aproxima al porcentaje de detección de celo considerado como muy favorable del 80%. Lo que nos permitiría estimar unos porcentajes de fecundidad aceptables incluso en el caso que se realizara la IATF en todas las novillas. Porcentajes de fecundidad que son mejorados en nuestro estudio, atendiendo a nuestros criterios de optimización de los tratamientos de sincronización, que conducen a sólo inseminar a las novillas que estén en un momento adecuado para ello. A partir de nuestros resultados, pudimos estimar unos porcentajes medios de gestación (%G), si la IA se practicará a tiempo fijo, para la población de novillas frisonas de nuestra provincia de un 51,4% para el protocolo Crestar<sup>®</sup>, de un 45,9% para el tratamiento Ovsynch y de un 59,5% para el protocolo CIDR<sup>®</sup>-Cosynch 56 opción 2. Siendo este último, incluso superior al %G estimado de un 55,8% para la IA en novillas a celo visto, aún considerando un valor tan favorable como el 80% de detección de celo.

En el **tercer estudio clínico** nos propusimos evaluar la utilización del semen sexado en la inseminación artificial (IA) de novillas frisonas de la provincia de León. Para ello, se utilizó una muestra de 852 animales procedentes de catorce explotaciones de la Cooperativa AFRIVEPA, todas ellas con unas condiciones sanitarias, de manejo y de alimentación similares. En nuestro estudio, se valoraron fundamentalmente el porcentaje de fecundidad (%F), el sexo y viabilidad de la descendencia, globalmente y en función de diferentes parámetros, tales como el

factor granja, el manejo reproductivo para llevar a cabo la IA (celo natural frente a distintos tratamientos de inducción y/o sincronización de celo), número de IA y semental utilizado. Los resultados se compararon, además, con otros obtenidos en estudios anteriores en la misma Cooperativa, pero empleando semen convencional.

Nuestros resultados muestran un %F medio del  $50,5 \pm 1,7\%$  cuando se utiliza semen sexado, sin que existan diferencias significativas según granja, método reproductivo utilizado ni número de IA. En cambio, los %F presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en función del semental empleado. Los %F según semental utilizado fueron muy variables, lo que creemos debido a factores que afecten a la propia fertilidad intrínseca del semental y a la calidad del semen utilizado.

Los %F según manejo reproductivo (celo natural, protocolo Ovsynch, CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-opción 2) fue de 18 a 22 puntos porcentuales menor que los obtenidos con el semen convencional en los mismos grupos en nuestra Cooperativa.

El porcentaje medio de hembras nacidas con el semen sexado fue de un  $92,3 \pm 1,5\%$ , coincidiendo con lo señalado por las propias empresas distribuidoras de semen. Las tasas de abortos (1,8%) y nacidos muertos (un 5,0% en el caso de las hembras y un 8% para los machos) fueron mínimas, encontrándose también dentro de los límites previsibles.

El semen sexado disponible en la actualidad, a pesar de sus limitaciones en cuanto a su menor %F, es una buena alternativa para garantizar la reposición de reproductoras en las granjas de vacuno de leche, estimándose en nuestro estudio que la probabilidad de obtener una hembra tras la primera IA de una novilla con semen sexado es 1,8 veces superior frente al semen convencional, ( $p < 0,05$ ).

**Palabras clave:**

Control reproductivo. Novillas frisonas. Inseminación artificial. Sincronización. Ovulación. GnRH. PGF<sub>2α</sub>. Ovsynch. Implantes de progesterona. Dispositivos intravaginales de progesterona. Fecundidad. Semen sexado. Porcentaje descendencia hembra.



## 9.2.- SUMMARY

The report submitted as a doctoral thesis is the result of scientific work carried out in the field of dairy cattle reproduction, focusing on replacement heifers, which are the future of farming. Our purpose is to contribute with our experience from the field work clinic over the last decade and thus provide objective and rigorous data on the reproductive management of heifers. To do so after a thorough and complete review, we present three clinical tests, which are designed from the work routinely carried out in our AFRIVEPA Cooperative in the Province of León.

In the **first clinical study** we aimed at establishing and evaluating guidelines when applied, either when selecting females to be treated or when performing AI, allowing us to improve the effectiveness of any synchronization method, estrus induction and ovulation, for our testing we decided to carry this out using one of the treatments which documented poor results in heifers: the Ovsynch protocol in order to achieve an improvement.

For this study 769 heifers (Holstein) from different farms in the AFRIVEPA Cooperative, located in the Province of León were used. All the heifers had physiological and anatomical characteristics suitable to be inseminated (minimum age 14 months, minimum weight 350 kg, minimum height 125 cm at withers and minimum pelvic area 135 cm<sup>2</sup>). All the heifers also underwent a gynecological examination with the aim of excluding those with any defect in their reproductive system or which had poorly developed ovaries. Two groups were alternatively and randomly established (Group A and Group B), were subjected to the same timing treatment, the Ovsynch protocol and administering PGF<sub>2α</sub> injection on day 6.

An AIFT was carried out on the 371 heifers from Group A between 12 and 24 hours (90% at 16 hours) after the final GnRH injection. Group B, initially made

up of 398 heifers at the time of AI were explored by rectal palpation so that the heifers not estrus (or follicular active) and showed signs of early ovulation were not inseminated. In all cases. Finally this group was made up of 299 heifers which were inseminated. AI was carried out by the same veterinarian in all cases using the intercornual deep ipsilateral technique to the ovary with pre-ovulatory follicle. Pregnancy diagnosis was carried out by rectal examination between 35-40 days after AI, in all cases by rectal palpation.

Our results show that fertility percentages. %F equals (pregnant heifers/inseminated heifers) by 100, statistically significant increased from 45.35 to 60% ( $p < 0.01$ ) by selecting the inseminated heifers. This increase of about 15% of the percentage of fertilization with the selection closer to the figures obtained in AI heifers estrus can be seen. From our results, we found that the predictive values of a heifer becoming pregnant after receiving sync Ovsynch treatment is almost twice as high if prior to AIFT is gynecological checked to see that the heifer shows obvious estrus or has not had an early ovulation so as to decide whether to inseminate or not.

We aimed at valuing in **the second clinical study** by carrying out two clinical tests, fertility rates (%F) obtained after AI in Friesian heifers using three different induction methods, estrus synchronization, and ovulation and compared these percentages F to those obtained after AI conventional natural estrus between each other.

In the first test 872 Friesian heifers were used (Holstein) from different farms in the AFRIVEPA Cooperative located in the Province of León. The heifers were divided into three groups depending on their productive management- Group 1 (Crestar<sup>®</sup> treatment) was made up of 366 heifers, Group 2 (Ovsynch) 222 heifers and Group 3 (natural estrus) made up of 289 heifers was considered as the control group. All the heifers included in this study had the anatomical and

physiological conditions to be inseminated, being confirmed by clinical examination and a well- developed functional reproductive system. Following our optimization synchronization treatment guidelines (discussed in the previous study), all the heifers in groups 1 and 2 at the time of AI underwent a gynecological examination whether to be discarded or not. Thus, AI was carried out on 305 heifers in in group 1, while in group 2 AI was performed on 167 heifers. In the second test 178 heifers (group 4) underwent the CIDR<sup>®</sup>- Cosynch 56 Option 2 where the same criteria for the selection and optimization previously mentioned was applied, which meant that only AI was carried out on 151 heifers. Pregnancy diagnosis was made 35-40 days after AI by rectal palpation.

The fertility rates (%F) obtained in group 1 (Crestar<sup>®</sup> treatment) and group 2 (Ovsynch) of 61.6% and 61.1% respectively were significantly lower than those obtained in Group 3/Natural Estrus) of 69%. However, a statistically significant difference was round in Group 4 (CIDR<sup>®</sup>-56 Co-Synch Option 2) which showed a percentage similar to the control group, calculated in our study at 72.2% F.

The percentages of estrus (%S) obtained by the protocol and Crestar<sup>®</sup> CIDR<sup>®</sup>- Co-Synch-Option 2 protocol are almost identical (83.35% vs 84.8%), higher than that obtained by the Ovsynch protocol (75.2%). Based on these results, we must admit that the Ovsynch protocol synchronization treatments used in this study are valid for Friesian heifers reproductive control methods as the figures obtained by synchronizing them approaches the detection estrus rate percentage considered as being very favorable at 80%.This allows us to estimate the percentages of acceptable fertility if AIFT is carried out on all the heifers. Fertility rates improved in our study, based on our optimization treatment synchronization criteria, only inseminated heifers which are at the appropriate time and allows us to estimate pregnancy rates (%G) if AI is applied at the right time to the Friesian heifer population in our province of 51.4%, Friesian heifers for the Crestar<sup>®</sup> protocol of 45%, Ovsynch treatment and 59.5% for the CIDR<sup>®</sup>-

Cosynch 56 Option2 protocol. The latter is even higher than %G 55.8% estimated for AI in estrus heifers and even considering a value as favorable as 80% estrus detection.

The aim of the **third clinical study** is to evaluate the use of sexed semen used in artificial insemination (AI) used in Friesian heifers in the Province of León (Spain). In order to carry this out 852 animals were used, all from 14 different farms within the AFRIVEPA farming cooperative. All the farms which were used complying with the standard sanitary conditions and normal feeding conditions. The fertility percentage (%F), sex and offspring viability both overall and taking into account different parameters such as the farm reproductive management to carry out AI (natural estrus as opposed to different inducing treatment and /or synchronization of estrus, number of AI and sire used were evaluated in this study. The results found were compared to other results from previous studies on the same farm but using conventional semen.

Our results show a %F average of  $50.5\% \pm 1,7\%$  when sexed semen was used with no significant differences depending on the farm, breeding method used and the number of AI. However, %F showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ), depending on the sire used. %F varied considerably depending on the sire used, which is probably due to the intrinsic fertility of the sire used and the quality of the semen used.

%F depending on reproductive management (natural estrus, Ovsynch, CIDR<sup>®</sup>-Co-Synch-56-option 2 protocol was between 18 to 20% lower than those obtained using conventional semen in the same group in our Cooperative.

The average percentage of females born with sexed semen was  $92.3 \pm 1,5\%$ , which coincided with those reported by our own semen distributors.

Abortion rates (1.8%) and stillborn (5.0% in the case of females and 8.0% in the case of males) were minimal, within the expected limits.

Sexed semen available at present, despite its limitations with regard to the low %F is a good alternative in order to ensure breeding replacement on dairy cattle farms, estimating in this study that the probability of the first AI heifer with sexed semen is 1.8 times higher compared to that of conventional semen ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:**

Reproductive control. Friesian heifers. Artificial insemination. Synchronization. Ovulation. GnRH. PGF<sub>2α</sub>. Ovsynch. Progesterone implants. Progesterone intravaginal devices. Fertility. Sexed semen. Percentages females.



# **CAPÍTULO 10**

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





## 10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125:759–767.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69:72-80.
- Ahmad N, Beam SW, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, Fortune JE, Griel LC, Jones LS, Milvae RA, Pate JL, Revah I, Schreiber DT, Townson DH, Tsang PCW, Inskip EK. 1996. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J. Anim. Sci.* 74:1943–1952.
- Alvarez Nogal PJ. 2008. Pautas alimenticias durante la cría-recría de novillas. En: *Gestión Técnica de granjas de vacuno lechero: aspectos de manejo*. Alvarez Nogal P.J. Universidad de León. 51-88.
- Anderson LH, McDowell CM, M. Day ML. 1996. Progestin induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. *Biol. Reprod.* 54:1025–1031.
- Araujo RR, Ginther OJ, Ferreira JC, Palhão MM, Beg MA, Wiltbank MC. 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol. Reprod.* 81:426-37.
- Astiz S, Fargas O. 2013 Pregnancy per AI differences between primiparous and multiparous high-yield dairy cows after using Double Ovsynch or G6G synchronization protocols. *Theriogenology*; 79:1065-1070.
- Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.* 64:839–848.
- Bach A, Valls N, Solans A, Torrent T. 2008. Associations between nondietary factors and dairy herd performance. *J. Dairy Sci.* 91: 3259-3267.
- Bao B, Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76:1903-1921.

- Barth AD. 1993. Factors affecting fertility with artificial insemination. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9:275–289.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 89:3413-3424.
- Beg MA, Ginther OJ. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132:365–377.
- Berisha B, Schams D. 2005. Ovarian function in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:305–317.
- Bloss RE, Northam JI, Smith LW, Zimbelman RG. 1966. Effects of oral melengestrol acetate on the performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 25:1048–1053.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim Reprod.* 10:137-142.
- Bodmer M, Janett F, Hassig M, den Daas N, Reichert P, Thun R. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64:1647–1655.
- Bousfield GR, Perry WM, Ward DN. 1994. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. In *the Physiology of reproduction*, pp. 1749-1920, E. Knobil and J. D. Neil, (Eds). New York: Raven Press, Ltd.
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Day ML. 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF<sub>2α</sub> from 7 to 5 d and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69:843–851.
- Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117: 208-15.
- Broers P. 1999. *Compendium de reproducción animal*. Laboratorios Intervet SA. España.
- Brusveen DJ, Cunha AP, Silva CD, Cunha PM, Sterry RA, Silva EPB, Guenther JN, Wiltbank MC. 2008. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:1044–1052.

- Bryan MA, Bó GA, Heuer C, Emslie FR. 2010. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronised AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev*; 22:1-6.
- Burke JM, de la Sota RL, Risco CA, Staples CR, Schmitt EJP, Thatcher WW. 1996. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:1385-1393.
- Caballero Rodriguez GJ. 1992. Neumosur: Revista de la Asociación de Neumólogos del Sur. Vol 4. 1:
- Cabrera VE. 2013. Semen sexado: grandes ganancias en vaquillas bien manejadas. *Repro Connections Insider* 1:5.
- Cannon MJ, Pate JL. 2003. The role of major histocompatibility complex molecules in luteal function. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:93.
- Caraviello DZ, Wiegel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB, Nordlund KV, Zwald NR, Rawson CL. 2006. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J. Dairy Sci.* 89:4723–4735.
- Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA. 2005. Synchronising oestrus with oestradiol benzoate after using a two-dose prostaglandin treatment to synchronise luteolysis in dairy heifers. *Aust. Vet. J.* 83:91-96.
- Cerchiaro I, Cassandro M, Dal Zotto R, Carnier P, Gallo L. 2007. A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. *J. Dairy Sci.* 90:2538–2542.
- Chebel RC, Guagnini FS, Santos JE, Fetrow JP, Lima JR. 2010. Sex-sorted semen for dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. *J Dairy sci* 93: 2496-2507.
- Chenault JR, Thatcher WW, Kalra PS, Abrams RM, Wilcox CJ. 1975. Transitory changes in plasma progesterone, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. *J Dairy Sci.* 58: 709-717.
- Colazo MG, Davis H, Rutledge MD, Kastelic JP, Martinez MF, Small JA, Mapletoft RJ. 2008. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Domest Anim Endocrinol* 2008. 34:109-117.
- Colazo MG, Ree T T, Emmanuel DGV, Ambrose DJ. 2009a Plasma luteinizing hormone concentrations and luteal function in cows given repeated treatments or various doses of gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology.* 71:984-992.

- Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. 2009b. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with gonadotropin releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology*. 72: 262-270.
- Colazo MG, Ambrose DJ. 2011. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affect pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology*. 76:578-588.
- Colazo MG, Dourey A, Rajamahendran R, Ambrose DJ. 2013a. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 79:833-841.
- Colazo MG, Ponce-Barajas P P, Ambrose DJ. 2013b. Pregnancy per AI in lactating dairy cows subjected to two different intervals from presynchronization to initiation of Ovsynch protocol. *J Dairy Sci*. 96:7640-7648.
- Colazo MG, Ambrose DJ. 2013. Pregnancy per AI in Holstein heifers inseminated with sexed semen after detected estrus or timed-AI. *WCDS Advances in Dairy Technology*. 25:367.
- Colazo MG, Ambrose DJ. 2014. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J* 2014;55:772–780
- Cooke RF, Bohnert DW, Cappellozza BI, Marques RS, Del Curto T, Mueller CJ. 2014. Incorporation of sexed semen into reproductive management of cow-calf operations. *Livest Sci* 163: 165-171.
- Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Nebel RL, Saacke RG. 2001. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 84:2413–2418.
- Dalton JC, Ahmadzadeh A, Shafii B, Price WJ, DeJarnette JM. 2004. Effect of simultaneous thawing of multiple 0.5-ml straws of semen and sequence of insemination on conception rate in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 87:972-975.
- Davis JS, Weakland LL, Weiland DA, Farese RV, West LA. 1987. Prostaglandin F2a stimulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in bovine luteal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3728–3732.
- De La Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. 1993. Effects of recombinant bovine somatotrophin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci*. 76:1002-1013.

- De La Sota RL, Risco CA, Moreira F, Burke JM, Thatcher WW. 1998. Evaluation of timed insemination during summer-heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology*. 49:761-770.
- De Vries AM, Overton M, Fetrow J, Leslie K, Eicker S, Rogers G. 2008. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *J. Dairy Sci.* 91:847–856.
- DeJarnette JM, Marshall CE. 2005. Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:3868-3875.
- DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71:49–58.
- DeJarnette JM, McCleary CR, Leach MA, Moreno JF, Nebel RL, Marshall CE. 2010. Effects of 2.1 and 3.5× 10<sup>6</sup> sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci* 93: 4079-4085.
- DeJarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, McCleary CR, Moreno JF. 2011. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *J Dairy sci* 94: 3477-3483.
- Demmers KJ, Derecka K, Flint A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 121: 41–49.
- Den Daas JH, DeJong G, Lansbergen LAM., Van Wagendonk-DeLeeuw AM. 1998. The relationship between the number of sperm inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 81:1714–1723.
- Doblas Aguilar A., Ruiz Castillo, J.L. 2015a.Consideraciones en la recría de novillas lecheras (I). *Albeitar*. 188: 18-20.
- Doblas Aguilar A., Ruiz Castillo, J.L. 2015b.Consideraciones en la recría de novillas lecheras (II). *Albeitar*. 189: 24-26
- Domínguez Fernández de Tejerina JC, 2008. El puerperio: control reproductivo y patología. En: *Gestión Técnica de granjas de vacuno lechero: aspectos de manejo*. Alvarez Nogal P.J. Universidad de León. 183-215.

- Domínguez C, Tejero J, Alegre B, González R, García JC, Alvarez F, Iglesias R. 2008. Inducción y sincronización del celo en novillas: el CIDR<sup>®</sup>, una nueva oportunidad en el control reproductivo del ganado vacuno de leche. *Frisona Española* 28: 104-106.
- Dominguez JHE, Costa DS, Jojot Centurion V, Faria FJC. 2011. Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed semen. *Anim Reprod Sci*, 129:127-131.
- Donovan AG, Bennett FL, Springer FS. 2003. Factors associated with first service conception in artificially inseminated nulliparous Holstein heifers. *Theriogenology* 60:67-75.
- Durr JW, Monardes HG, Cue RI, Philpot JC. 1997. Culling in Quebec Holstein herds. 1. Study of phenotypic trends in herd life. *Can. J. Anim. Sci.* 77: 593-600.
- Elli M. 2009. Manual de reproducción en ganado vacuno. Manual Fatro. Editorial Servet. 2ª Ed. Zaragoza (España)
- El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS. 2004. Presynchronization of estrous cycles before Ovsynch and progesterone in dairy cows: Ovulation, pregnancy rates, and embryo survival. *J Dairy Sci.* 87:1024-1037.
- Ericsson RJ, Glass RH. 1982. Functional differences between sperm bearing the X- or Y-chromosome. In: Amann RP, Seidel GE, editors. *Prospects for sexing mammalian sperm*. Boulder, CO: Colorado Associated University Press.
- Ettema JF, Santos JEP. 2004. Impact of age at calving on lactation, reproduction, health and income in first-parity Holsteins on commercial farms. *J Dairy Sci.* 84:2730-2742.
- Evans G, Hollinshead FK, Maxwell WM. 2004. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16:455-64.
- Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. 1990. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 43:210-218.
- Fernández Sánchez M. 2008. El ciclo estral de la vaca. Diagnóstico fotográfico. Editorial Servet. Zaragoza (España)
- Ferguson JD, Galligan DT. 1993. Prostaglandin synchronization programs in dairy herds – Part 1. *Comp. Cont. Educ. Food Anim. Pract.* 15:646-655.

- Fields MJ, Fields PA. 1996. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology* 45:1295–1325.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47:1489–1505.
- Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J. Anim. Sci.* 66(Suppl. 2):1-8.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65: 648–654.
- Fricke PM, Wiltbank MC. 1999. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 52:1133–1143.
- Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML. 2003. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals after first timed insemination. *J. Dairy Sci.* 86:3941-3950.
- Frijters ACJ, Mullaart E, Roelofs RMG, van Hoorne RP, Moreno JF, Moreno O, Merton JS. 2009. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71:64–67.
- Gallagher GR, Senger PL. 1989. Concentrations of spermatozoa in the vagina of heifers after deposition of semen in the uterine horns, uterine body or cervix. *J. Reprod. Fertil.* 86:19.
- Galvao KN, Sa´ Filho MF, Santos JEP. 2007. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:4212–4218.
- Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome- bearing sperm of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 28:312–321.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65:943–957.
- Garner DL, Seidel GE. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69:886–895.
- Geary TW, Whittier JC. 1998. Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or COSynch protocol in beef cows. *Prof. Anim. Sci.* 14:217–220.

- Geary TW, Whittier JC, Hallford DM, MacNeil MD. 2001. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *J. Anim. Sci.* 79:1-4.
- Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20:187-200.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87:223-230.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55:1871-1194.
- Ginther OJ, Silva LA, Araújo RR, Beg MA. 2007. Temporal associations among pulses of 13,14- dihydro-15-keto-PGF<sub>2α</sub>, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 76:506–513.
- Giraldo JJ. 2008. Sincronización y resincronización de celos y ovulaciones en ganado de leche y carne. *Rev Lasallista Investig* 5: 90-99.
- Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA, Meidan R. 1996. Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F2a. *Endocrinology* 137:5191–5196.
- Gordon I. 2004. Tecnología de la reproducción de los animales de granja. Editorial Acribia SA. Zaragoza.
- Guilbault LA, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK. 1987. Influence of a physiological infusion of prostaglandin F2a into postpartum cows with partially suppressed endogenous production of prostaglandins. 1. Uterine and ovarian morphological responses. *Theriogenology* 27:931-946.
- Graves MW, McLean AK. 2008. Improving dairy heifer reproductive management. *Cooperative Extension Bulletin.* 1235. Univesity of Georgia.
- Guzeloglu A, Erdem H, Saribay MK, Thatcher WW, Tekeli T. 2007. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. *Vet. Rec.*160:404-406.
- Hadley ME. 2000. *Endocrinology. Hormones and female reproductive physiology.* 5th ed. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproducción e Inseminación artificial en animals.* 7ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Mexico.



- Hansel W, Malven PV, Black DL. 1961. Estrous cycle regulation in the bovine. *J. Anim. Sci.* 20:621–625.
- Hansen PJ. 2007. Effects of environment on bovine reproduction. Pages 431-441 in *Current therapy in large animal theriogenology*. R. S. Youngquist and W. R. Threlfall, ed. Saunders Elsevier, St Louis, MO
- Head HH. 1992. Heifers performance standards: rearing systems, growth rates and lactation. Pages 422-433 in *Large Dairy Herd Health Management*. C. J. Wilcox and H. H. VanHorn, ed. University of Florida Press, Gainesville, FL.
- Healy AA, House JK, Thomson PC. 2013. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *J Dairy Sci* 96(3): 1905-1914.
- Hidalgo CO, Tamargo C C, Díez C C. 2005. Análisis del semen bovino. *Tecnología agroalimentaria: Boletín Informativo del SERIDA* 2: 39-43.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. 1994. Follicular estrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 100:51-54.
- Hodgen GD. 1982. The dominant ovarian follicle. *Fertil. Steril.* 38:281-300.
- Hoffman P, 2014. Nuevos criterios para empezar a inseminar a nuestras novillas. *Noticias Semex.* 40: 6-7.
- Hossein-Zadeha NG, Nejati-Javaremib A, Miraei-Ashtianib SR, Kohramb H. 2010. Bio-economic evaluation of the use of sexed semen at different conception rates and herd sizes in Holstein populations. *Anim Reprod Sci* 121(1): 17-23.
- Hunter RHF. 2003. Reflections upon sperm-endosalpingeal and sperm-zona pellucid interactions in vivo and in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* 38:147–154.
- Hurtado A. (2014). Expresión y función de la proteína quinasa activada por AMP, AMPK, en la célula germinal masculina del cerdo. Cáceres: Univeridad de Extremadura.
- Inbar G, Wolfenson D, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw- Tal R. 2001. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. 1):465. (Abstr.)

- Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Haard MG, Haard MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52:641–658.
- Jimenez A., 2013. PRID-Delta usos de la progesterona. 2. Sincronización para inseminación a tiempo fijo en novillas de leche. En [ReprodAction.www.ceva.es./Articulos](http://ReprodAction.www.ceva.es./Articulos) Técnicos.
- Jochle W, Kuzmanov D, Vujosevic J. 1982. Estrus cycle synchronization in dairy heifers with the prostaglandin analog alfaprostol. *Theriogenology* 18: 215-255.
- Johnson LA, Flook JP, Look MV. 1987a. Flow cytometry of X and Y chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.* 17:203–212.
- Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. 1987b. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res.* 16:1–9.
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X- and Y- sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41: 199–203.
- Johnson LA. 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl.2): 8–18.
- Johnson LA, Welch GR. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52:1323–41.
- Johnson LA. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 93–107.
- Juengel JL, Niswender GD. 1999. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl.1):193–205.
- Kasimanickam R, Hall JB, Currin JF, Whittier WD. 2008. Sire effect on the pregnancy outcome in beef cows synchronized with progesterone based Ovsynch and CO-Synch protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 104:1–8.
- Kasimanickam RK, Firth P, Schuenemann GM, Whitlock BK, Gay JM, Moore DA, Hall JB, Whittier WD. 2014. Effect of the first GnRH and two doses of PGF<sub>2α</sub> in a 5-day progesterone-based CO-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology.* 81:797-804.

- Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ. 1990. Effect of day of prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 23:169–180.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ. 1994. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J. Androl.* 15:468–478.
- Kinsel ML, Marsh WE, Ruegg PL, Etherington WG. 1998. Risk factors for twinning in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:989–993.
- Knopf L, Kastelic JP, Schallenberger E, Ginther OJ. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6:111-119.
- Kotwica J, Rekawiecki R, Duras M. 2004. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Bull Vet. Inst. Pulawy.* 48:139-145.
- Kuhn MT, Hutchison JL, Wiggans GR. 2006. Characterization of Holstein heifer fertility in the United States. *J Dairy Sci.* 89:4907-4920.
- Laguado J. 2007. Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Revista MVZ Córdoba* 12(2): 1077-1095.
- Lauderdale JW. 1972. Effects of PGF<sub>2α</sub> injection on pregnancy and estrous cycle of cattle. *J. Anim. Sci.* 35(Suppl. 1):246. (Abstr.)
- Lauderdale JW, Moody EL, Kasson CW. 1977. Dose effect of PGF<sub>2α</sub> on return to estrus and pregnancy in cattle. *J. Anim. Sci.* 45(Suppl. 1):181. (Abstr.)
- Lauderdale JW, McAllister JF, Kratzer DD, Moody EL. 1981. Use of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) in cattle breeding. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 77:181-191.
- Lauderdale JW. 2009. ASAS Centennial Paper: Contributions in the *Journal of Animal Science* to the development of protocols for breeding management of cattle through synchronization of estrus and ovulation. *J. Anim. Sci.* 87:801-812.
- Lee AJ. 1997. The interplay of feeding and genetics on heifer rearing and first lactation milk yield: A review. *J. Anim. Sci.* 75:846-851.
- Liehr RA, Marion GB, Olson HH. 1972. Effects of prostaglandin on cattle estrous cycles. *J. Anim. Sci.* 35:247. (Abstr.)

- Lima FS, Ribeiro ES, Bisinotto RS, Greco LF, Martinez N, Amstalden M, Thatcher WW, Santos JE. 2013. Hormonal manipulations in the 5-day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 96:7054-7065
- Liszewska E, Rekawiecki R, Kotwica J. 2005. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 78: 67-81.
- Logue DN, Salaheddine M, Renton JP. 1991. A comparison of two techniques for the synchronisation of oestrus in dairy heifers. *Vet Rec.* 129 : 171-173.
- Lopes G Jr, Johnson CR, Mendonça LG, Silva PR, Moraes JG, Ahmadzadeh A, Dalton JC, Chebel RC. 2013. Evaluation of reproductive and economic outcomes of dairy heifers inseminated at induced estrus or at fixed time after a 5-day or 7-day progesterone insert-based ovulation synchronization protocol. *J Dairy Sci.* 96:1612-1622.
- Losinger WC, Heinrichs AJ. 1996. Dairy operation management practices and herd milk production. *J. Dairy Sci.* 79:505-514.
- Lucena JA, Kenyon AG, Reynolds JP, Moreno JF, Lenz RW, Carroll D. 2014. Comparison between low-dose, high-sort and high-dose, low-sort semen on conception and calf sex ratio in Jersey heifers and cows. *J Dairy Sci* 97(3): 1782-1789.
- Lucy, M. C., J. D. Savio, L. Badinga, R. L. De La Sota, and W. W. Thatcher. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70:3615-3626.
- Lucy MC, Collier RJ, Kitchell ML, Dibner JJ, Hauser SD, Krivi GG. 1993. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 48:1219–1227.
- Lucy MC, Billings HJ, Butler WR, Ehnis LR, Fields MJ, Kesler DJ, Kinder JE, Mattos RC, Short RE, Thatcher WW, Wettemann RP, Yelich JV, Hafs HD. 2001. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF<sub>2α</sub> for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 79:982–995.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 81:301–307.

- Macmillan KL, Peterson AJ. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR<sup>®</sup>-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates, and the treatment of postpartum anestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33:1–25.
- Mallory DA, Lock SL, Woods DC, Pooch SE, Patterson DJ. 2013. Hot topic: Comparison of sex-sorted and conventional semen within a fixed-time artificial insemination protocol designed for dairy heifers. *J Dairy Sci* 96(2): 854-856.
- Martínez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci.* 57: 23-33.
- Mayer et al., 1988;
- Mellado M, Sepulveda E, Macias-Cruz U, Avendaño L, García JE, Veliz FG, Rodríguez A. 2014. Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. *Trop Animal Health Prod* 46: 265-269.
- Mellieon HI Jr, Pulley SL, Lamb GC, Larson JE, Stevenson JS. 2012. Evaluation of the 5-day versus a modified 7-day CIDR<sup>®</sup> breeding program in dairy heifers. *Theriogenology.* 78:1997-2006.
- Milvae RA. 2000. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2 $\alpha$  in corpus luteum function. *Reviews of reproduction. J. Reprod. Fertil.* 5:1–5.
- Miyamoto A, Kobayashi S, Arata S, Ohtani M, Fukui Y, Schams D. 1997. Prostaglandin F2 $\alpha$  promotes the inhibitory action of endothelin-1 on the bovine luteal function in vitro. *J. Endocrinol.* 152:R7–11.
- Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MP, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, Matsui M, Acosta TJ. 2005. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:329-339.
- Moreira F, de la Sota RL, Diaz T, Thatcher WW. 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.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1646–1659.

- Moreira F, Flores R, Boucher J. 2004. Use of CIDR<sup>®</sup> with a timed insemination protocol in lactating dairy cows during summer in Mexico. *J. Dairy Sci.* 87:373 (Abstr.)
- Moreira F. 2009. Economics of reproductive interventions. In attending the dairy wellness summit makes a difference Proc. Pfizer Animal Health conference. Dallas, TX.
- Moreno J. 2015. Pasado, presente y futuro del semen sexado. *Albaitaritz.* 67: 4-14.
- Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large- scale IVF program using reverse- sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus- taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81(5): 696-701.
- Moruzzi JF. 1979. Selecting a mamalian species for the separation of X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 57, 319–323.
- Mussard ML, Burke CR, Day ML. 2003. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. Pages 179-185 In Annual Conference of the Society for Theriogenology Proc. Columbus, OH.
- Mussard ML, Burke CR, Behlke EJ, Gasser CL, Day ML. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 937–943.
- Nebel RL, Jobst SM, Dransfield MBG, Pansolfi SM, Bailey TL. 1997. Use of a radio frequency data communication system, HeatWatch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 80(Suppl. 1):179. (Abstr.)
- Nebel RL. 2007. Techniques for artificial insemination of cattle with frozen-thawed semen. Pages 253-258 in *Current therapy in large animal theriogenology*. R. S. Youngquist and W. R. Threlfall. 2nd ed. Saunders Elsevier, St Louis, MO.
- Niswender GD, Schwall RH, Fitz TA, Farin CE, Sawyer HR. 1985. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. *Recent Prog. Horm. Res.* 41:101–151.
- Niswender GD, Nett TM. 1988. The corpus luteum and its control. Pages 489-525 in *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. Neill, ed. Raven Press, New York, NY.

- Niswender GD, Juengel JL, Mcguire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. 1994. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 50:239–247.
- Norman and Litwack. 1998. *Hormones*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Norman HD, Hutchison JL, Miller RH. 2010. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *J Dairy Sci* 93(8): 3880-3890.
- Odensvik K. 1995. Pharmacokinetic of flunixin meglumine and its effect on prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolite concentrations after oral and intravenous administration in heifers. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18:254-259.
- Okuda K, Uenoyama Y, Berisha B, Lange IG, Taniguchi H, Kobayashi S, Miyamoto A, Schams D. 2001. Estradiol-17β is produced in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 65:1634-1639.
- Olynk NJ, Wolf CA. 2008. Economic analysis of reproductive management strategies on US commercial dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91:4082–4091.
- Orr WN, Cowan RT, Davison TM. 1993. Factors affecting pregnancy rate in Holstein-Friesian cattle mated during summer in a tropical upland environment. *Aust. Vet. J.* 70:251-256.
- Overton MW, Sisco WM. 2005. Comparison of reproductive performance by artificial insemination versus natural service sires in California dairies. *Theriogenology.* 64:603-613.
- Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR. 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *J. Anim. Sci.* 70:4018–4035.
- Peeler ID, Nebel RL, Pearson RE, Swecker WS, Garcia A. 2004. Pregnancy rates after timed AI of heifers following removal of intravaginal progesterone inserts. *J. Dairy Sci.* 87:2868–2873.
- Pfeifer LF, Siquiera LG, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Adams GP, Colazo MG, Singh J. 2009. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology.* 72:1054-64.
- Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE. 2014. Determination of anti-Mullerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Dom Anim End* 46:58-64.

- Pérez-Marín CC. 2009. Impacto de la utilización del semen sexado. *Mundo Ganadero* 20(217): 34-37.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TM. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:5268–5273.
- Peters JL, Senger PL, Rosenberger JL, O'Connor ML. 1984. Radiographic evaluation of bovine artificial insemination technique among professional and herdsman- inseminators using 0.5 and 0.25-ml French straws. *J. Anim. Sci.* 59:1671–1683.
- Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21:495-504.
- Pieterse MC, Szenci O, Willemse AH, Bajcsy CS, Dieleman SJ, Taverne MA. 1990. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology.* 33:697-707.
- Portaluppi MA, Stevenson JS. 2005. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.* 88:914–921.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. *Theriogenology* 44:915-923.
- Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80:295-300.
- Pursley JR, Silcox RW, Wiltbank MC. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 81:2139-2144.
- Rabaglino MB, Risco CA, Thatcher MJ, Kim IH, Santos JE, Thatcher WW. 2010. Application of one injection of prostaglandin F(2alpha) in the five-day Co-Synch+CIDR<sup>®</sup> protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *J Dairy Sci.* 93:1050-1058.



- Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson LA. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71(1): 22-29.
- Rekawiecki R, Nowik M, Kotwica J. 2005. Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 78:169-184.
- Rekawiecki R, Kowalik MK, Slonina D, Kotwica J. 2008. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 (Suppl 9):75-89.
- Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106:39–47.
- Ribeiro ES, Cerri RL, Bisinotto RS, Lima FS, Silvestre FT, Greco LF, Thatcher WW, Santos JE. 2011. Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. *J Dairy Sci.* 94:4984-4996.
- Ribeiro ES, Cerri RL, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW, Santos JE. 2013. Associations between plasma anti-Mullerian hormone (AMH) and fertility responses of seasonally calving grazing dairy cows. ADSA annual meeting.
- Richards JS. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60:51-89.
- Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev.* 15:725–751.
- Risco CA, Moreira F, DeLorenzo M, Thatcher WW. 1998. Timed artificial insemination in dairy cattle - Part II. *Compendium on Continuing Education.* 20:11.
- Risco CA, Adams AL, Seebohm S, Thatcher MJ, Staples CR, Van Horn HH, McDowell LR, Calhoun MC, Thatcher WW. 2002. Effects of gossypol from cottonseed on hematological responses and plasma alpha-tocopherol concentration of dairy cows. *J Dairy Sci.* 85:3395-402.
- Rivera H, Lopez H, Fricke PM. 2004. Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed AI or AI after removed tail chalk. *J. Dairy Sci.* 87:2051–2061.

- Rivera H, Lopez H, Fricke PM. 2005. Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed AI and for synchronizing return to estrus in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 88:957-968.
- Rivera H, Sterry RA, Fricke PM. 2006. Presynchronization with gonadotropin-releasing hormone does not improve fertility in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 89:3810-3816.
- Roche JF. 1976. Calving rate of cows following insemination after a 12-day treatment with silastic coils impregnated with progesterone. *J. Anim. Sci.* 43:164-169.
- Rowson LEA, Tervit R, Brand A. 1972. The use of prostaglandin for synchronization of oestrus in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 29:145. (Abstr.)
- Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:663-77.
- Saacke RG. 2008a. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70:473-478.
- Saacke RG. 2008b. Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology* 70:479-484.
- Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Nichi M, Fosado M, Campos Filho EP, Baruselli PS. 2010. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* 74: 1636-1642.
- Sales Noguerras B, 2014. Gestión Técnica de la cría: Parámetros y Criterios. *Noticias Semex.* 40: 2-5.
- Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Wiltbank MC. 2002. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:2831-2842.
- Santos JEP, Rutigiano HM, Sá Filho MF. 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 110:207-221
- Santos JEP. 2013. Programas de reproducción para el vacuno adulto. En Conferencia de consenso sobre los programas de reproducción. Les Editions du Point Vétérinaire. Newsmed. Courbevoie Cedex. Francia. 40-50.

- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85:2803–2812.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87:905–920.
- Savio D, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83:663–71.
- Schams D, Berisha B. 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. *Reprod. Dom. Anim.* 39:241–251.
- Schenk JL, Suh TK, Jr Seidel GE. 1999. Cryopreservation of bovine spermatozoa sexed by flow cytometry/cell sorting. *Theriogenology.* 52: 1375–1391.
- Schmitt EJ, Diaz PT, Drost M, Thatcher WW. 1996. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.* 74:1084-1091.
- Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407-1420.
- Seidel Jr GE, Garner DL. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction.* 124:733–743.
- Seidel Jr GE. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585–598.
- Seidel Jr GE, Schenk JL. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim. Reprod. Sci.* 105:129–38.
- Sejrsen K. 2005. Mammary development and milk yield potential. En *Calf and Heifer Rearing* (Ed. Garnsworthy P.C.) Nottingham University Press, UK. 237-251.
- Senger PL. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. *Current Conceptions.* Pullman, WA.

- Shibaya M, Murakami S, Tatsukawa Y, Skarzynski DJ, Acosta TJ, Okuda K.. 2007. Bovine corpus luteum is an extrapituitary site of prolactin production. *Mol. Reprod. Dev.* 74:131.
- Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68:799–816.
- Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson JR. 1991. Review: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45:655–663.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39:308–317.
- Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71:698-706.
- Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Erickson NE, Mapletoft RJ. 2010. Effects of presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, fixed-time artificial insemination in beef heifers. *Can J Anim Sci* 2010; 90:23-34.
- Smith RD, Pomerantz AJ, Beal WE, McCann JP, Pilbeam TE, Hansel W. 1984. Insemination of Holstein heifers at a preset time after estrous cycle synchronization using progesterone and prostaglandin. *J. Anim. Sci.* 58:792–800.
- Smyth CD, Miro F, Whitelaw PF, Howles CM, Hillier SG. 1993. Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism. *Endocrinology* 133:1532–1538.
- Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 70:208-215.
- Stevenson JL, Rodrigues JA, Braga FA, Bitente S, Dalton JC, Santos JE, Chebel RC. 2008. Effect of breeding protocols and reproductive tract score on reproductive performance of dairy heifers and economic outcome of breeding programs. *J. Dairy Sci.* 91:3424-3438.
- Stevenson JS. 2011. Alternative programs to presynchronize estrous cycles in dairy cattle before timed artificial insemination program. *J Dairy Sci.* 94: 205-217.

- Summer AT, Robinson JA. 1976. A difference in dry mass between heads of X- and Y-bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 48:9–15.
- Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31:149-164.
- Thatcher WW, de la Sota RL, Schmitt EJ, Diaz TC, Badinga L, Simmen FA, Staples CR, Drost M. 1996. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod Fertil Dev.* 8:203-17.
- Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56:1435-1450.
- Thorban D. 2008. Sexed semen: is it finally a reality? Page 20 in Proc. Florida dairy production conference, Univ. of Florida, Gainesville, FL.
- Thorburn GD, Cox RI, Currie WB, Restall BJ, Schneider W. 1973. Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the estrus cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 18:151-158.
- Townson DH, Liptak AR. 2003. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:94.
- Tubman LM, Brink Z, Suh TK, Seidel Jr GE. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J Anim Sci* 82: 1029-1036.
- Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A Review. *J Anim Sci.* 73:3141-3151.
- Ulberg LC, Christian RE, Casida LE. 1951. Ovarian response in heifers to progesterone injections. *J. Anim. Sci.* 10:752–759.
- Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WM, Evans G. 2010. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Sci* 118(1): 7-12.
- Van Cleeff J, Macmillan M, Drost M, Lucy MC, Thatcher WW. 1996. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. *Theriogenology* 46:1117-1130.

- Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52:1067-1078.
- Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307–314.
- Vishwanath R. 2003. Artificial insemination: the state of art. *Theriogenology* 59: 571-584.
- Weigel KA. 2004. Exploring the impact of sexed semen in dairy production systems. *J. Dairy Sci.* 87(E. Suppl.):E120–E130.
- Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DJ. 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 65: 219–227.
- Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65: 17-29.
- Wiltbank MC, Salih SM, Atli MO, Luo W, Bormann CL, Ottobre, J.S., Vezina, C.M., Mehta, V., Diaz, F.J., Tsai, S.J., and Sartori R. 2012. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim Reprod.* 9:242-259.
- Vishwanath, R. 2003. Artificial insemination: The state of the art. *Theriogenology.* 59:571–584
- Wolfenson D, Bartol FF, Badinga L, Barros CM, Marple DN, Cummins K, Wolfe D, Lucy MC, Spencer TE, Thatcher WW. 1993. Secretion of PGF<sub>2α</sub> and oxytocin during hyperthermia in cyclic and pregnant heifers. *Theriogenology* 39:1129-1141.
- Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:535-547.
- Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal. 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 62:1042-1055.

- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53:951-957.
- Xu ZZ. 2014. Application of liquid semen technology improves conception rate of sex-sorted semen in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 97: 7298-7304.
- Zavy MT, Geisert RD. 1994. Pages 3, 5, 109–110 in *Embryonic Mortality in Domestic Species*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Zimbelman RG. 1963. Determination of the minimal effective dose of 6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxyprogesterone for control of the estrual cycle of cattle. *J. Anim. Sci.* 22:1051–1058.
- Zimbelman RG, Smith LW. 1966a. Control of ovulation in cattle with melengestrol. I. Effect of dosage and route of administration. *J. Reprod. Fertil.* 11:185–191.
- Zimbelman RG, Smith LW. 1966b. Control of ovulation in cattle with melengestrol. II. Effects on follicular size and activity. *J. Reprod. Fertil.* 11:193–201.