

## **Caracterización de la Muerte Embrionaria Temprana y Prevención de la Pérdida de Gestaciones**

*WW. Thatcher \*, y J.E.P. Santos\*\**

*\* Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Florida, Gainesville, FL 32611-0910 y*

*\*\* Centro de Investigación y Enseñanza en Medicina Veterinaria, Universidad de California-Davis, Tulare, CA 93274, U.S.A.*

*Traducción: MVZ. Fernando Cavazos García  
Veterinario de Servicio Técnico  
ABS MEXICO S.A. DE C.V.*

### **Introducción.**

En vacas lecheras de alta producción, las tasas de preñez del hato se ven reducidas por la pobre expresión y/o detección de los celos, el anestro, bajas tasas de concepción y una mayor mortalidad embrionaria. Además, estos impedimentos para un desempeño reproductivo óptimo son exacerbados bajo condiciones ambientales estresantes tales como el estrés calórico, el cuál es aún más perjudicial en vacas de muy alta producción de leche. El desempeño reproductivo ha disminuido en Norteamérica, Europa, Israel y Australia. Las razones para ese decremento son multifactoriales y no enteramente asociadas con un incremento en la producción de leche (1). Los estudios epidemiológicos indican que otros factores, tales como las enfermedades reproductivas (es decir, retención de placenta, metritis y quistes ováricos) o la estación en que ha parido la vaca, eran relativamente más importantes que la producción de leche, en el desempeño reproductivo (1,2). De hecho, los hatos con producciones más altas quizá tengan mejor desempeño reproductivo debido a una mejor nutrición, mejor manejo reproductivo o a que tienen vacas más sanas. Sin embargo, el estado fisiológico de la lactación sí está asociado a tasas reproductivas más bajas si se compara con las novillas (3). El reto para caracterizar los factores que comprometen el desarrollo embrionario y desarrollar estrategias para mejorar la sobrevivencia del embrión, es complejo, ya que involucra la esteroidogénesis, la proliferación celular, el desarrollo folicular, la ovulación, la fertilización, el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo, las funciones del oviducto y del útero, el desarrollo y funcionamiento del embrión, la implantación y el subsiguiente crecimiento fetal. De hecho, nuestros actuales sistemas de manejo productivo y reproductivo impactan sobre todos estos eventos coordinados, que requieran ser optimizados si se desea incrementar la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras lactantes. Los objetivos de este trabajo son, caracterizar el desarrollo y las pérdidas embrionarias, identificar las ventanas fisiológicas que estén siendo alteradas y estén asociadas con la pérdida embrionaria, así como identificar estrategias para mejorar las tasas de preñez.

### **Desarrollo y pérdidas embrionarias**

Las estimaciones sobre la tasa de fertilización en novillas lecheras rondan en un rango de 97 a 100%. Las estimaciones en vacas lecheras son más variables, andan en un rango de 85 a 100%, pero esas estimaciones fueron hechas hace más de 25 años, y no siempre se aclaró si las vacas estaban en producción o no, y si lo estaban, cuál era su nivel de producción (4). Durante los primeros estadios de división celular, desde una célula hasta el blastocisto temprano, al día 8º, el embrión se encuentra encerrado en la zona pelúcida (4). Entre el 3º y 4º día después de la fertilización, el embrión migra del oviducto hacia el cuerno uterino, en la fase de 8 a 16 células. A los 5 o 6 días de vida (fase de 16 a 32 células), se lleva a cabo la compactación de las células del embrión formándose contactos célula-célula, de desarrollan uniones firmes entre ellas y comienza a funcionar como un organismo llamado mórula. A los 8 días de vida, el blastocisto desarrolla la cavidad llamada blastocele y las células (aprox. 120) asociadas con la masa celular interna (25%) y el trofocotodermo (75%). Aproximadamente al 9º o 10º día de vida (aprox. 160 células) el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida y comienza a expandirse hasta que inicia su alargamiento como a los 13 días de edad. Ese estiramiento representa una transición en su apariencia, desde esférica a ovoide y posteriormente a forma de filamento, incrementándose la longitud del embrión desde 5.25 mm en el día 13, hasta 52 mm en el día 16. Ya para el día 17 puede haber embriones que, junto con sus membranas, llegan a medir 30 a 40 cm de longitud y ocupan la mayor parte del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Sin embargo, hay considerable variación en el tamaño de los embriones. La adhesión temprana del producto ocurre para el día 19 con puntos visibles de adhesión entre carúnculas y cotiledones para el día 21. Para el día 42 de vida, termina el período embrionario al completarse la

diferenciación. El producto es llamado entonces feto, en el cuál, la mayoría de los tejidos, sistemas y órganos se encuentran ya formados.

Sreenan y col., (4) resumieron los resultados de la literatura de hace más de 21 años, referente a las estimaciones de pérdidas embrionarias en las diversas fases. Se estimó que las tasas de fertilización eran de 90% y que había tasas de parición promedio de 55%. Esto sugiere una tasa de muerte embrionaria y fetal como de 39%. Se pierden muy pocos embriones inmediatamente después de la fertilización y hasta el día 8 de gestación. Ocurrió un incremento significativo en las pérdidas totales (27 - 31%) entre los días 8 y 16 post-inseminación, 3.8% del total ocurrió entre los días 16 a 42 y otro 1.9 a 3.1% adicional se presentó entre el día 42 y la parición. Una pregunta relevante es si los patrones temporales de pérdida embrionaria y fetal han cambiado en las poblaciones actuales de vacas Holstein de alta producción de leche.

Varios reportes recientes han evaluado las tasas de fertilización en vacas modernas de alta producción, cuya fertilidad global en más bien baja. En estudios en los que se utilizó como biomonitor al embrión bovino de 6 días (o sea, la mórula), se demostró que en vacas no lactantes, las tasas de fertilización eran 66, 74 y 82%, cuando las inseminaciones se practicaban a las 0, 12 y 24 horas después del inicio del celo, respectivamente (5). Los porcentajes de embriones de calidad excelente a buena, eran 77, 52 y 47% para los mismos períodos de 0, 12 y 24 horas respectivamente. En consecuencia, el tiempo recomendado para la inseminación es 12 horas después del inicio del celo, lo cuál representa un compromiso entre una tasa de fertilización potencialmente más baja al inseminar a las 0 horas y una calidad embrionaria inferior al inseminar a las 24 horas. Un reporte reciente (6) demuestra claramente el impacto negativo de la lactación sobre el desarrollo embrionario temprano, comparado con el de vacas lecheras no lactantes. En un ambiente templado, las tasas de fertilización, estimadas al día 5º día post-ovulación, fueron 87.8 y 89.5 % para vacas lactantes y no lactantes, respectivamente. Sin embargo, la calidad de los embriones en las vacas lactantes era notoriamente inferior (una puntuación más baja en la calificación de calidad embrionaria y un porcentaje más bajo de embriones excelentes-buenos-regulares [52.8%] comparados con los embriones de las vacas no lactantes [82.3%]).

Las pérdidas embrionarias, más allá del período de eclosión de la zona pelúcida, son mucho más difíciles de determinar, en relación al porcentaje de embriones recuperados y en la determinación del bienestar del embrión. Desde una perspectiva práctica, podemos clasificar las muertes embrionarias (ME) como Muertes Embrionarias Tempranas (METe.) y Muertes Embrionarias Tardías (METa.), que pueden ser monitoreadas con técnicas tales como Progesterona en Leche (P4), Proteína B Específica de la Preñez (PBEP, que es una proteína secretada por las células binucleadas del trofotodermo), el Ultrasonido (US) y la palpación rectal. La remoción del embrión en el día 17 ocasiona una extensión del cuerpo lúteo y la infusión intrauterina de Interferón tau bovino recombinante (IFN-t) en vacas que se encuentran ciclando, extiende la vida del cuerpo lúteo hasta el día 28 y el intervalo entre estro y estro hasta el día 31 (7), (el interferón tau es una proteína secretada por el trofotodermo que inhibe la secreción luteolítica de Prostaglandina F2 alfa.). Humbolt (8) propuso que la luteolisis en los primeros 24 días post inseminación puede ser asociada, ya sea con una falta de fertilización o bien con una muerte embrionaria temprana que no permitió que se mantuviera el cuerpo lúteo. En contraste, el mantenimiento extendido del cuerpo lúteo y el retorno a celo después de 24 días, podía ser asociado con muerte embrionaria tardía que sucede después del día 16 de vida embrionaria. De acuerdo a este razonamiento, se clasificó a las vacas de la siguiente manera:

- **Preñadas:** Progesterona en leche (**P4**): < 3.5 ng/ml al día 0 y > 5 ng/ml en los días 21 a 24; Proteína B Específica de la Preñez (**PBEP**) detectable al día 35; ausencia de un 2º servicio y/o preñada a la palpación posterior.
- **Sin fertilización o Muerte emb. temprana:** **P4** < 5 ng/ml en los días 21 a 24, repitieron a un 2º servicio y/o vacías a la palpación rectal posterior.
- **Muerte emb. tardía:** **P4** < 3.5 ng/ml al día 0 y > 5 ng/ml en los días 21 a 24; vacía de acuerdo a la prueba de **PBEP** al día 35 o en la palpación rectal posterior.

En un estudio en una zona templada de Francia, que involucró a 44 hatos de baja fertilidad (1395 vacas Holstein), los resultados fueron como sigue: Tasa de Preñez: 42.9% (599/1395); METe y METa después del 1er servicio: 31.6% (441/1395) y 14.7% (209/1395) respectivamente (8). Varios factores se encontraron asociados a la Tasa de Preñez:

- **Intervalo a primer servicio:** > 90 días, 46.6% vs. <90 días, 41.5%
- **No. de partos:** Primíparas, 47.5% vs. Lactancia 2 y 3, 42.7% vs. > 4 Lactancias, 34.6%
- **Producción de leche:** > 39 kg/día, 34.9% vs. < 39 kg/día, 45.5%

Un dato interesante fue que la METa fue mayor en vacas de alta producción con Condición Corporal igual o superior a 2.5 pero no se encontró asociación con la Condición Corporal en vacas de menor producción.

La tabla 1 muestra varios estudios que han utilizado el Ultrasonido para el diagnóstico temprano de gestación, seguido de una confirmación subsiguiente, de tal forma que las pérdidas de gestaciones pudieron ser estimadas entre aproximadamente el día 28 y el día 45 post-inseminación. Se estima que las pérdidas de gestaciones entre esos dos puntos son de 10 a 20% (Tabla 1). Hay quien ha sugerido que la utilización de programas de Inseminación Artif. a Tiempo Fijo (**IA TF**), quizá han incrementado las METa (1, 23). Chebel y col. estudiaron los factores involucrados en las pérdidas de gestaciones entre los días 31 y 45 en tres lecherías comerciales de California. Las vacas inseminadas a celo detectado y las que se inseminaron a tiempo fijo con el uso del programa OvSynch tuvieron pérdidas embrionarias similares (13.7% vs. 11.7%). Estimaciones hechas en otros dos estudios (13, 15) que involucraron vacas inseminadas a celo detectado y vacas con IA TF tanto por medio de HeatSynch como de OvSynch, reportaron que las pérdidas embrionarias entre los días 31 y 45 no fueron diferentes.

Los programas de reproducción controlada, cuando son implementados correctamente, no parecen afectar, por lo tanto, las pérdidas de gestaciones; comparados con la inseminación a celo detectado. Esto no significa que, la inducción de la ovulación en folículos que son demasiado pequeños no reduce las tasas de preñez o bien que los sistemas actuales no puedan ser mejorados. Sin embargo, no se puede afirmar que haya pérdidas desproporcionadas atribuidas a la IA TF.

En un estudio en Irlanda (17), las pérdidas embrionarias entre el día 28 y el 84 post-inseminación, fueron similares para las vacas en producción con 7247 Kg. de leche / año que para las novillas (7.2% vs. 6.1%, respectivamente). De las pérdidas detectadas, el 47.5% ocurrieron entre los días 28 y 42 de gestación. Es interesante que, en estos sistemas de producción en pastoreo, y con producción absoluta de leche más baja, las pérdidas embrionarias sean considerablemente más bajas que las reportadas arriba en hatos manejados de manera intensiva. El grado de pérdida embrionaria fue superior en las vacas que perdieron condición corporal entre el día 28 y 56 de gestación comparado con el de las vacas que mantuvieron su condición o que la mejoraron.

**Tabla 1. Tasa de Pérdida Embrionaria Tardía entre los días 27 y 45 de gestación.**

| Referencia | No. de Vacas | Días al 1er. diag<br>nóstico | Días al 2º. diag<br>nóstico | Pérdida de<br>Gestaciones % |
|------------|--------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 9          | 195          | 28                           | 42                          | 17.9                        |
| 10         | 139          | 27                           | 45                          | 20.7                        |
| 11         | 1503         | 31                           | 45                          | 13.2                        |
| 12         | 253          | 28                           | 38 - 58                     | 25.7                        |
| 13         | 360          | 31                           | 45                          | 11.1                        |
| 14         | 220          | 27                           | 41                          | 10.0                        |
| 15         | 176          | 31                           | 45                          | 9.7                         |
| 16         | 167          | 28                           | 39                          | 11.4                        |

### **Ventanas Fisiológicas Que Pueden Ser Dañadas y Contribuir a la Pérdida de Gestaciones**

En los actuales sistemas de producción es imperativo reconocer la multiplicidad de factores que pueden influenciar el desempeño reproductivo.

**Ciclo anterior a la Inseminación y período periovulatorio:** Varios reportes indican que concentraciones plasmáticas bajas de progesterona, durante la fase luteal del ciclo estral que ha precedido a la inseminación, están asociadas con baja fertilidad, comparadas con vacas con concentraciones plasmáticas altas de progesterona. Las concentraciones de progesterona pueden influenciar varios eventos fisiológicos tales como la dinámica folicular ovárica y la subsiguiente función uterina. Sangsritavong y col. (18) demostraron en experimentos clásicos que el flujo sanguíneo en el hígado se elevaba después de la alimentación de vacas lecheras lactantes y secas. Tanto el metabolismo de la Progesterona como el del Estradiol se elevaron en forma aguda con el consumo de alimento. Las Tasas más elevadas de flujo sanguíneo en el hígado y de metabolismo de los esteroides en vacas lactantes seguramente reflejan los efectos crónicos de los elevados consumos de

materia seca que conducen a concentraciones más bajas de esteroides. Las concentraciones más bajas de progesterona y de estradiol en las vacas lactantes, comparadas con las de vacas no lactantes, parecen influenciar la dinámica folicular del ovario. Las evidencias a través de tres reportes, soportan el concepto de que las vacas lecheras lactantes tienen un mayor número de folículos grandes, un folículo ovulatorio más grande, concentraciones más bajas de estradiol y un intervalo más largo a la ovulación. Es de importancia crítica la subsiguiente habilidad que tenga el oocito liberado por ese tipo de folículos de formar embriones normales. Sartori (6) demostró que en las vacas lactantes, los embriones de 5 días veían reducida su calidad. En las vacas de alta producción, al haber una mayor remoción del estradiol, esto puede resultar en una menor inhibición de la secreción de FSH (Hormona foliculo- estimulante) que alteraría la desviación folicular, conduciendo a una mayor ocurrencia de ovulaciones dobles (21). Más aún, concentraciones más bajas de progesterona pueden influenciar la pulsatilidad de la LH (Hormona Luteinizante) y provocar una persistencia más prolongada del folículo dominante.

Investigadores de Israel (22) establecieron un modelo experimental para inducir cuerpos lúteos que generaran concentraciones ascendentes de progesterona pero que fueran substancialmente más bajas que las de vacas control. Durante el siguiente ciclo, cuando las concentraciones de progesterona eran ya normales, ambos grupos de vacas fueron retadas con oxitocina para evaluar la secreción de Prostaglandina F2 alfa (evaluaron el metabolito de la prostaglandina, es decir, la 13,14 dihidro, 15ceto,PGF2 alfa, [PGFM]) en el día 15 del ciclo. La respuesta al metabolito PGFM en el grupo de progesterona baja fue mucho más elevada. Una interpretación de estos resultados puede ser que, concentraciones bajas de progesterona durante un ciclo estral quizá tengan un efecto estimulador retardado sobre la capacidad de respuesta del útero a la oxitocina durante la fase luteal del ciclo subsiguiente cuando ya se aproxima el tiempo en que el embrión inicia el mantenimiento del cuerpo lúteo. Una serie de experimentos en ganado de carne indican que, un cuerpo lúteo de vida más corta, que se presenta luego de la primera ovulación, está asociado con una secreción uterina prematura de Prostaglandina F2alfa que es también embriotóxica para el embrión en desarrollo, cuando este se encuentra en el útero entre el día 5 y 8 (23). La oxitocina secretada en el cuerpo lúteo puede estar contribuyendo a este fenómeno. Sin embargo, el tratamiento de estas vacas con progestágenos durante la sincronización, elimina este tipo de problema. Vale la pena investigar si un fenómeno similar está contribuyendo a la muerte embrionaria temprana en vacas lecheras lactantes que presentan un folículo anovulatorio antes de la inducción de la primera ovulación. Está claro que los cambios preovulatorios / periovulatorios en los esteroides regulan las subsiguientes concentraciones de receptores para progesterona y estradiol, que tienen influencia sobre la función subsiguiente del oviducto, útero y ovario.

Un factor adicional asociado con el período preovulatorio y que reduce la fertilidad, es el desarrollo de folículos persistentes. Nuevamente, esto está asociado con las concentraciones más bajas de progesterona, que predisponen a la vaca a una mayor frecuencia de pulsos de hormona Luteinizante (LH) y mantenimiento del folículo dominante. Cuando un folículo persistente llega a ovular, el oocito está en una fase de maduración mayor (24). El oocito sí es fertilizado pero ocurre muerte embrionaria temprana. Es importante reconocer este fenómeno cuando estamos tratando con sistemas de sincronización. Necesitamos utilizar sistemas de sincronización o de control ovulatorio que no impliquen largos períodos de exposición a bajos niveles de progesterona y que promuevan la inducción de un nuevo folículo dominante que sea inducido a ovular antes de que haya expresado dominancia por un período mayor a 5 días. Un período de dominancia folicular mayor a 8 días está asociado a fertilidad reducida (25). Normalmente, las vacas tienen ciclos de dos o de tres ondas foliculares. Un reporte reciente (26) mostró que la fertilidad era mejor en vacas lactantes inseminadas en la ovulación de un folículo perteneciente a una tercera onda, que se había desarrollado durante menos días en el ciclo estral (tasa de preñez de 81%); comparadas con vacas de dos ondas foliculares (tasa de preñez de 63%). El folículo de una segunda onda folicular, con más días de desarrollo, no debe sin embargo considerarse un folículo persistente, pero esto sí enfatiza la importancia potencial de reclutar un folículo fresco como parte del sistema de sincronización o de inseminación a tiempo fijo.

**Ciclo post-ovulatorio:** Una rápida elevación de los niveles de progesterona después de la ovulación puede promover la maduración del endometrio uterino y acelerar el crecimiento del embrión en desarrollo (27). De hecho, el tamaño del folículo ovulatorio en becerras lecheras tiene una relación positiva con los incrementos subsiguientes en las concentraciones de progesterona (28). Se ha encontrado una asociación muy interesante en varios estadios de la lactancia, entre el volumen del folículo ovulatorio, el volumen subsiguiente del cuerpo lúteo en el día 7 del ciclo y las concentraciones plasmáticas de progesterona al día 7 (20). Básicamente, se encontró que existía una asociación positiva entre el folículo ovulatorio y el volumen del cuerpo lúteo, que

parecía ser similar entre becerras, vacas secas y vacas en producción. Sin embargo, debido al estado de lactancia, el incremento en concentración de progesterona, (medido en ng/ml por cada mm cúbico de volumen del cuerpo lúteo), era dos veces mayor en el día 7 para las becerras, y era 1.38 veces mayor para las vacas secas, comparado con el de las vacas en producción. Queda claro, pues, que la lactación reduce las concentraciones de progesterona durante la fase lútea del ciclo. Esas concentraciones postovulatorias reducidas de progesterona en las vacas en producción pueden estar reduciendo el desarrollo del embrión (29) y de ese modo reducir a su vez la producción del interferón tau por parte del embrión en estado ya alargado y eso puede contribuir a la muerte embrionaria temprana y tardía.

En ganado de carne se encontró que un número similar de hembras tuvieron dos o tres ondas de desarrollo folicular durante un período equivalente a un ciclo estral luego de la inseminación (30). Sin embargo, la fertilidad fue mayor para las vacas con 3 ondas foliculares (96% vs. 70%,  $P < 0.05$ ). En el momento del reconocimiento materno de la preñez (es decir, al día 17 después del celo), las vacas que estaban en su tercera onda folicular, tendrían un folículo dominante (ya en atresia) de la segunda onda, así como un nuevo folículo reclutado en la 3ª onda, que sería de aproximadamente 7 mm y no sería aún capaz de secretar mucho estradiol. En contraste, las vacas con un ciclo de dos ondas foliculares, tendrían en ese momento un folículo dominante de la segunda onda, de 10 a 12 mm de diámetro, que sería capaz de producir más estradiol. No se encontraron diferencias en las concentraciones de estradiol en la circulación periférica. Sin embargo, eso no excluye la posibilidad de que haya diferencias en la concentración de estradiol entre esos dos estados foliculares, a nivel local de los tejidos ováricos y uterinos cerca del sitio de su producción y que podrían tener efectos diferenciales sobre el mecanismo luteolítico dentro del útero. Hernández-Cerón y Morales (31) reportaron que vacas en producción con un folículo inferior a 15mm, entre los días 12 y 14 post-inseminación tuvieron tasas de concepción más altas (49.7%, 106 / 211), que las vacas con folículos de más de 15mm (37.1%, 78 / 124).

Un factor adicional que influye tanto en la muerte embrionaria temprana como en la tardía, es la ocurrencia de mastitis. Las vacas que padecieron una mastitis clínica en los primeros 45 días de gestación tuvieron 2.7 veces más riesgo de tener un aborto dentro de los siguientes 90 días (32). Tanto los días abiertos como los servicios por preñez se incrementaron en vacas que tuvieron mastitis clínica entre el primer servicio y el establecimiento de la preñez.

### Estrategias para mejorar las Tasas de Preñez

**Desarrollo y Optimización de los Programas de Inseminación a Tiempo Fijo:** Programas eficientes de sincronización de celos proporcionan varias ventajas: las becerras o vacas estarán en celo dentro del tiempo predicho, lo cuál facilita la inseminación o la transferencia embrionaria; el tiempo y el gasto de mano de obra para la detección de celos se reduce. Se hace más práctica la inseminación si se está en condiciones extensivas; por otro lado, el control preciso de la ovulación permite la inseminación a tiempo fijo sin la necesidad de detectar el celo.

La habilidad de controlar el tiempo de ovulación en forma precisa permite la inseminación a tiempo fijo, en seguida de un período en el que se ha programado en forma secuencial el desarrollo del folículo y la regresión del cuerpo lúteo. Con la implementación de inseminaciones a tiempo fijo, se pueden llevar a cabo en forma efectiva tratamientos programados específicamente para mejorar la sobrevivencia embrionaria, así como estrategias encaminadas a programar lo antes posible la re-sincronización de las vacas que resultan vacías para re-inseminarlas. Estos programas resultan esenciales en vacas lecheras de alta producción que experimentan reducción en la intensidad de sus celos que contribuye a que pasen desapercibidos; recurrencia de fases luteales sin la expresión de celo y recurrencia de ondas de folículos que no logran ovular. El desarrollo de programas de inseminación a tiempo fijo se ha basado en una comprensión profunda de los factores que controlan el crecimiento folicular en el ovario.

**OvSynch:** Un programa que ha sido muy exitoso para dar primera inseminación a las vacas a tiempo fijo, sin necesidad de la detección del celo, es el programa OvSynch, en el cuál inyecciones de GnRH son administradas 7 días antes y 48 horas después de una inyección de Prostaglandina F2alfa y las vacas son inseminadas de 12 a 16 horas después de la segunda inyección de GnRH. Este sistema sincroniza la maduración del folículo con la regresión del cuerpo lúteo antes de la ovulación inducida por el GnRH y de la inseminación. Numerosos estudios indican que las Tasas de Preñez (proporción de las vacas tratadas que

resultan gestantes) logradas con el programa OvSynch eran comparables, y en algunos estudios superiores, a las de los grupos control respectivos (ver revisión 34).

Si el programa OvSynch es iniciado en ciertas fases del ciclo estral se obtendrán tasas de preñez reducidas. La iniciación del programa entre los días 13 y 17 del ciclo estral coincide con el tiempo en el que la regresión espontánea del cuerpo lúteo ocurre antes del momento en que se inyecta la Prostaglandina F2alfa (7 días después de la inyección del GnRH). Estas vacas mostrarán asincronía en el sentido de que quizá ovulen antes del momento de la inseminación, la cuál será muy tardía para lograr la concepción. Durante las fases tempranas del ciclo estral (días 2 a 4 del ciclo), el folículo dominante que ha sido reclutado no tiene aún suficiente desarrollo para ovular en respuesta al GnRH. Como consecuencia, el folículo dominante al momento de la segunda inyección de GnRH es un folículo viejo y a ejercido dominancia por 5 días o más. Los folículos con períodos de dominancia de más de 5 días son menos fértiles y algunos de esos folículos envejecidos no logran ovular en respuesta al GnRH (2ª. inyección). Un punto adicional a considerar es que, la inducción de una nueva onda folicular por medio de GnRH, es más eficiente si se logra inducir la ovulación con la primera inyección de GnRH. Colectivamente, estos hallazgos indican que la pre-sincronización de las vacas antes de la implementación del programa OvSynch, mejorará las tasas de preñez, ya que las vacas iniciarán el programa OvSynch en la fase más apropiada del ciclo estral (días 5 a 12 del ciclo).

**Presynch – OvSynch:** Se desarrolló un programa conocido como Presynch – OvSynch en el que la pre-sincronización se logra a través de un programa estándar de sincronización de celo (dos inyecciones de prostaglandina F2alfa, aplicadas con un intervalo de 14 días), iniciando el programa OvSynch 12 días después de la segunda de esas inyecciones de prostaglandina (10). Este programa incrementó en 18 puntos porcentuales la Tasa de Preñez (de 25% a 43%) en vacas lactantes que estaban ciclando. Esta mejora en las tasas de preñez se atribuyó a la manipulación del ciclo estral de tal forma que el programa OvSynch fue iniciado en la fase más favorable del ciclo estral. Futuros programas para una adicional optimización de la fertilidad, de seguro considerarán programas que manipulen la función ovárica de tal forma que en todas las vacas se logre el cambio folicular vía la ovulación o a través de la atresia folicular inducida y que la fase luteal, así como las concentraciones de progesterona se mantengan hasta el momento de la regresión inducida del cuerpo lúteo. Estos futuros sistemas para vacas lecheras en producción quizá incluyan la inserción de dispositivos intravaginales conteniendo progesterona así como inyecciones agudas de estrógenos. El éxito del programa OvSynch depende de si las vacas se encuentran ciclando o en anestro. Las tasas de preñez fueron inferiores en las vacas que no se encontraban ciclando al momento de iniciar el programa (es decir, 22% vs. 42%). En general, este programa para inseminación a tiempo fijo fue capaz de inducir la ciclicidad en el 75% de las vacas en anestro, basándose en el número de vacas que fueron clasificadas como ovulando ya sea en la primera y/o en la segunda inyección de GnRH. Si las vacas en anestro logran ovular en la primera y en la segunda inyección de GnRH del programa OvSynch, entonces las tasas de preñez parecen ser normales (de 39%).

**HeatSynch:** Una estrategia alternativa para controlar el tiempo de ovulación, es la habilidad que tiene el estradiol exógeno de inducir un “pico” de LH (hormona luteinizante) por medio de la estimulación de la secreción hipotalámica de GnRH; cuando es administrado en un ambiente de baja concentración de progesterona durante el diestro tardío o el proestro. Un pico de LH inducido por el estradiol, dura unas 10 horas, que es comparable a un pico de LH espontáneo y más prolongado que el pico de LH inducido por GnRH. El cipionato de estradiol (ECP), una forma esterificada de 17 beta estradiol, que está comercialmente disponible para su uso en ganado, ha sido utilizado como parte de un programa de inseminación a tiempo fijo en vacas lactantes. El ECP es utilizado para reemplazar a la 2ª inyección de GnRH del programa OvSynch y este programa es llamado HeatSynch (34, 35). Las vacas son pre-sincronizadas con dos inyecciones de prostaglandina F2alfa administradas con un intervalo de 14 días, iniciando el programa HeatSynch 14 días después de la segunda inyección de prostaglandina. Para ello, se inyectan con GnRH, 7 días después reciben prostaglandina F2alfa y luego, el ECP (1 mg intramuscular) es inyectado 24 horas después de la prostaglandina, inseminando 48 horas más tarde. Las tasas de preñez no fueron diferentes entre los programas OvSynch y HeatSynch.

En vacas lactantes, las frecuencias de celos detectados y de ovulación después del ECP fueron 75,7 % y 86.5% respectivamente (35). El estro ocurrió a las 29.0 +- 1.8 horas (n=28) después del ECP. Los intervalos promedios a la ovulación fueron 55.4 +-2.7 horas después del ECP y 27.5 +- 1.1 horas después del inicio del celo. Como el 75% de las ovulaciones ocurrieron entre 48 y 72 horas después del ECP, se recomienda que cualquier vaca que sea detectada en celo hasta un día y medio después del ECP, sea inseminada de acuerdo al inicio de su celo, y todo el resto de las vacas sean inseminadas a las 48 horas. Basados en la sincronización de la ovulación

y en las tasas de preñez, el ECP puede ser utilizado como una alternativa para inducir la ovulación en lugar del GnRH para la inseminación a tiempo fijo. Ya que las vacas en producción tienen concentraciones plasmáticas reducidas de estradiol en el período preovulatorio y una intensidad reducida del celo, la elevación del estradiol causada por la inyección de ECP contrarresta a la deficiencia inducida por la lactancia y la experiencia indica que vacas que muestran celo son fértiles. La secreción de LH está regulada directamente por el GnRH mientras que el estradiol induce indirectamente la secreción de LH a través de una retroalimentación positiva sobre la secreción hipotalámica de GnRH que estimula luego a su vez la secreción de LH. Si las vacas están en estado anovulatorio (es decir en anestro o no han desarrollado la retroalimentación positiva del estradiol) entonces el HeatSynch quizá no sea tan efectivo como el programa OvSynch basado en GnRH, en el que éste último causa la secreción directa de la LH. Los inseminadores siempre aprecian el mayor tono uterino, la facilidad de inseminación y la presencia de celo que acompañan al HeatSynch. Por otro lado, en instalaciones con pisos de concreto, quizá sea preferida la menor expresión de celo que acompaña al OvSynch. Ya que la fertilidad de los dos programas parece ser muy comparable, los productores pueden elegir entre ambos, lo cuál incluye también el costo relativo de las hormonas (ECP más barato que GnRH).

**Somatotropina Bovina (bST) para mejorar el Desarrollo Embrionario y la Tasa de Preñez:** En vacas lactantes que estaban ciclando, la inyección de bST (500 mg Posilac [Lactotropina], Monsanto Co, St. Louis, Missouri) simultáneamente con la primera inyección de GnRH o bien al momento de la inseminación, en vacas dentro del programa PreSynch – OvSynch, mejoró las tasas de preñez (57% vs. 42.6%). Como la bST fue igualmente efectiva al momento de la inseminación, es muy probable que la bST haya estimulado el desarrollo y la sobrevivencia embrionaria después de la inseminación en las vacas en producción. No hubo evidencia de que la administración de bST a la 9ª semana de lactancia perjudique la fertilidad, al ser utilizada dentro de un protocolo de inseminación a tiempo fijo como el OvSynch. Un estudio en México ha reportado (36) que, en vacas identificadas con tres o más servicios previos, la administración de bST en el celo y a los 10 días de la inseminación, mejoró las tasas de preñez. La habilidad para detectar este efecto benéfico de la bST, quizá se pueda atribuir al hecho de que la bSt fue administrada dentro de una ventana fisiológicamente importante en la cuál la ocurrencia de celo o la ovulación estaba siendo controlada. Varios estudios demostraron que la bST estimulaba la maduración *in vitro* de oocitos bovinos y el desarrollo embrionario. Más aún, la administración de bST en el momento de la inseminación de vacas donadoras superovuladas, redujo el número de óvulos no fertilizados, incrementó el porcentaje de embriones transferibles y estimuló el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto. Además, la bST afectó tanto al desarrollo embrionario como a los componentes de la receptora para mejorar las tasas de preñez luego de la transferencia embrionaria (37). Tanto la bST como la IGF-1 (Factor de Crecimiento similar a Insulina) estimularon el desarrollo embrionario *in vitro* (38). Nuestros estudios recientes indican que el efecto benéfico de la bST seguramente está limitado a las vacas en producción en comparación con las vacas secas. Diferencias metabólicas y fisiológicas entre esos dos estados fisiológicos parece que hacen a las vacas lactantes más sensibles y con mayor respuesta a la bSt y al IGF-1 para mejorar el desarrollo y sobrevivencia embrionaria.

**Inducción de Cuerpos Lúteos accesorios con hCG, Ciclos de tres ondas y Tasa de Preñez:** La oportunidad de regular la función ovárica después de la inseminación para mejorar la tasa de preñez, es una estrategia adicional de manejo de producción. La habilidad de inducir la ovulación en el folículo sano de la primera onda folicular al día 5º del ciclo (después de la inseminación) da como resultado la alteración de dos estados endocrinos. La administración de hCG (Gonadotropina Coriónica) induce la ovulación con la consecuente formación de un cuerpo lúteo funcional. La mayor parte del incremento en la progesterona plasmática luego de la aplicación de hCG se debió a ese cuerpo lúteo accesorio. El tamaño del cuerpo lúteo, la producción *in vitro* de progesterona y las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron más grandes con los cuerpos lúteos accesorios inducidos por hCG que en los inducidos por GnRH (39). Debido a la inducción de ovulación al 5º día, esas vacas van a experimentar un ciclo de tres ondas foliculares, debido a una más temprana emergencia de la segunda onda (40). Además, la tercera onda folicular será retardada. El desarrollo del embrión está relacionado con concentraciones más altas de progesterona y con la habilidad del mismo para generar Interferón tau (IFN- t). Por ende, la inducción de un cuerpo lúteo accesorio por medio de hCG, con el consecuente incremento de progesterona mejorará la sobrevivencia embrionaria. Dado que también se ha encontrado que más vacas con tres ondas foliculares conciben que las de dos ondas foliculares, la inducción de tres ondas foliculares por medio de la hCG contribuirá a una mayor tasa de preñez.

Se diseñó un estudio para determinar los efectos de la hCG (3,300 UI de Chorulon, intramuscular, Intervet Inc., Millsboro, DE) administrada 5 días después de la inseminación, sobre la formación de cuerpo lúteo accesorio,

concentración de progesterona en plasma, tasa de concepción y pérdida de gestación en vacas Holstein de alta producción (41). Después de la sincronización del celo (GnRH seguido 7 días después por Prostaglandina F2alfa) y de la inseminación a celo detectado, 406 vacas Holstein de alta producción (43.0 +/- 0.45 Kg. de leche / día al tiempo de la IA) se inyectaron ya fuese con hCG o con solución salina, al 5º día después de la inseminación (203 por tratamiento). Se tomó muestra de sangre y se observaron los ovarios con ultrasonido una vez, entre los días 11 y 16 después de la inseminación. El diagnóstico de gestación se hizo con ultrasonido al día 28 y luego por palpación rectal al día 45 y 90. El estudio fue dividido en dos períodos: Período 1, de Mayo 14 a Sep 16 de 1999, cuando las temperaturas máximas ambientales oscilaban entre 22 y 38° C. (Período caluroso) y el Período 2, de Oct 5 de 1999 a Mar 2 del 2000, cuando las temperaturas máximas oscilaban entre 9 y 29° C (Período fresco). El tratamiento con hCG al 5º día del ciclo indujo la formación de uno o más cuerpos lúteos accesorios en el 86.2% de las vacas tratadas comparado con el 23.2% de las vacas control. Las diferencias en las concentraciones plasmáticas de progesterona para vacas tratadas y vacas control fueron: +6.3 ng/ml para vacas primíparas y +3.1 ng/ml para vacas múltíparas (tratamiento por no. de partos;  $P < 0.02$ ). El cuerpo lúteo accesorio incrementó la concentración plasmática de progesterona en vacas tratadas con hCG más no en las controles. El tratamiento con hCG incrementó ( $P < 0.01$ ) las tasas de concepción al día 28 (45.8 vs. 38.7%), al día 45 (40.4 vs. 36.3%) y al día 90 (38.4 vs. 31.9%) después de la inseminación. Las pérdidas de gestaciones entre los días 28 y 45, 45 y 90, así como entre el 28 y 90 fueron similares para los dos grupos. La concentración de progesterona y el número de cuerpos lúteos después de la inseminación afectaron la tasa de concepción ( $P < 0.01$ ) de tal forma que las vacas preñadas tuvieron concentraciones más altas de progesterona y una mayor frecuencia de cuerpos lúteos accesorios. Las tasas de concepción al día 28 fueron 34.4% y 48.7% para vacas con una baja y una moderada condición corporal (BCS) respectivamente ( $P < 0.01$ ) y este efecto fue similar tanto para vacas tratadas como para las control. Al igual que los resultados observados para la condición corporal al día del servicio, los cambios en la condición corporal del día del servicio al día 28, se vieron asociados a cambios en la tasa de concepción. Las vacas que ganaron condición en este período, tuvieron más preñeces que las que solo se mantuvieron o que perdieron condición (47% vs. 42.7% vs. 37.4%;  $P < 0.03$ ). Resulta interesante que se determinó una interacción entre el tratamiento y el cambio en condición corporal para la preñez al día 28. Las vacas que perdían condición corporal y que eran tratadas con hCG, tuvieron una tasa de concepción de 57.1% comparada con solo 24.2% para aquéllas del grupo control ( $P < 0.05$ ). Cuando se consideró el diagnóstico de preñez al día 45 y al día 90 post-servicio, los efectos del tratamiento, número de cuerpos lúteos, concentración plasmática de progesterona, condición corporal al día de servicio y cambio de condición corporal; fueron similares a aquéllos observados para la tasa de concepción al día 28 post-servicio. Este estudio apoya el concepto de que mayores cantidades de progesterona durante la fase luteal, aumentan la sobrevivencia embrionaria. Sin embargo, este efecto no fue evidente durante la época de estrés calórico donde seguramente, la muerte embrionaria temprana anuló cualquier incremento subsiguiente en la sobrevivencia embrionaria. El efecto de la hCG para mejorar las tasas de preñez a través de posibles incrementos en el desarrollo temprano y sobrevivencia embrionaria, en la época en que no hay estrés calórico, fue muy esperanzador.

La administración de un agonista de GnRH, el implante de Deslorelin, al día 27 de gestación incrementó la formación de cuerpos lúteos accesorios y elevó las concentraciones de progesterona pero fracasó para reducir la ocurrencia de muerte embrionaria tardía (42). Entonces, la muerte embrionaria temprana sí parece ser sensible a los incrementos de progesterona inducidos por el tratamiento con hCG (41), pero los procesos de desarrollo y de implantación después del día 27 no parecen ser afectados por un implante de un agonista de GnRH (42).

**Efecto de los Lípidos en el Desempeño Reproductivo:** Varios experimentos realizados tanto en vivo (43, 45) como *in vitro* (43, 44) indican que los Ácidos Grasos Omega 3 son capaces de disminuir la secreción de Prostaglandina F2alfa. Al administrar harina de pescado (en la que el 8% de la materia seca es aceite que contiene dos ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3: el Eicosapentaenoico [EPA, C20:5] y el Docosahexaenoico [DHA, C22:6]), se incrementó la fertilidad de las vacas lactantes. Bonnette y col., (46) alimentaron 82 vacas de carne primíparas y lactantes con una dieta basada en ensilaje de maíz que contenía ya fuese 5% de harina de pescado o bien 8.7% de gluten de maíz (en base seca). La suplementación fue iniciada 25 días antes de la temporada de empadre y se continuó por los 90 días que duró la misma. Las vacas recibieron inseminación artificial y la preñez se diagnosticó entre 25 y 30 días post-servicio con ultrasonido. La concepción a primer servicio tendió a ser más alta en las vacas que recibían la harina de pescado (75.6% vs. 61.5%,  $P = 0.14$ ). Las concentraciones de progesterona sérica después de la Inseminación fueron similares entre los dos grupos. En un estudio con vacas Holstein (n=141), las vacas fueron asignadas a uno de tres tratamientos dietéticos iniciados al parto (47). Las dietas eran iso-nitrogenadas, iso-energéticas e iso-lípicas.

Las dietas contenían semilla entera de linaza, o Megalac (Ácidos grasos protegidos con sales de calcio), o soya micronizada. La semilla de linaza es ~32% aceite en el que 57% son ácidos grasos C18:3, 14% ac. grasos C18:2, y 18% ac. grasos C18:1. El diámetro del cuerpo lúteo de las vacas alimentadas con semilla de linaza fue mayor que el de las vacas alimentadas con soya (19.7 vs. 16.9 mm ) pero no mayor que el de las vacas alimentadas con Megalac (17.5 mm) . La mortalidad embrionaria entre el día 30 y 50 post-servicio tendió a ser menor ( $P < 0.11$ ) cuando las vacas recibían semilla de linaza (0%), comparada con Megalac (15.4%) o con la soya (13.6%). Más recientemente, Ambrose y col., (48) asignaron vacas Holstein lactantes ( $n=121$ ) a dietas suplementadas ya fuese con semilla de linaza rolada (en donde el 55% de su contenido de lípidos es ácido alfa linolénico) o bien con semilla de girasol rolada (en donde menos del 1% de sus lípidos es Ác. alfa linolénico) para proporcionar aproximadamente unos 750 gramos de aceite por vaca/día. Las dietas eran similares en cuanto a proteína metabolizable y energía neta de lactancia. Las dietas del tratamiento se iniciaron 4 semanas antes de la inseminación que siguió a un protocolo PreSynch – OvSynch. El diagnóstico de preñez se realizó a los 32 días post-inseminación. La tasa de preñez a primer servicio fue más alta en las vacas alimentadas con la semilla de linaza que en que recibieron semilla de girasol (48.4% vs. 32.2%). En forma colectiva, estos resultados son estimulantes en cuanto a que ciertos nutrientes selectivos (los ácidos grasos Omega 3 como el EPA y DHA y el ácido alfa linolénico), parecen mejorar las tasas de preñez. Estos ácidos grasos son capaces de disminuir la secreción de prostaglandina F2alfa y complementan la acción anti-luteolítica del Interferon tau. Es bien sabido que el EPA y el DHA tienen efectos anti-inflamatorios y también inmunosupresores que complementan los efectos normales anti-inflamatorios e inmunosupresores de la progesterona y del interferón tau en la gestación temprana. Sería también muy interesante determinar si en las vacas que reciben dietas con estos lípidos de efecto anti-inflamatorio podría reducirse la incidencia de muerte embrionaria temprana y tardía asociada a la ocurrencia de mastitis.