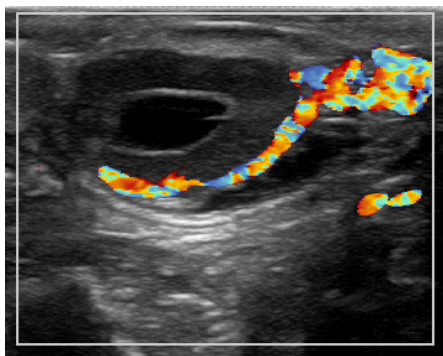




Universitat de Lleida

Treball Fi de Grau de Ciència i Producció Animal:  
Tècnica de punció fol·licular per a prevenir les  
gestacions dobles en vaques de llet d'alta  
producció



Ester Vidal Roselló

DOBLE GRAU DE VETERINÀRIA I CIÈNCIA PRODUCCIÓ  
ANIMAL PROMOCIÓ 2013-2019

Irina Garcia Ispuerto

Lleida, Febrer del 2020

# ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES .....	2
LLISTAT D'ABREVIATURES .....	3
RESUM .....	4
1. INTRODUCCIÓ.....	7
1.1 Situació actual del sector del boví de llet.....	7
1.2 Gestacions dobles.....	7
1.3 Eines de monitoreig al camp: Ecografia i Doppler.....	10
2. OBJECTIUS .....	12
3. MATERIAL I MÈTODES .....	13
3.1 Animals experimentals .....	13
3.2 Drenatge fol·licular i disseny experimental .....	15
3.3 Mesures de l'activitat luteal a partir d'ecografia Doppler .....	18
3.4 Mesures de l'activitat luteal a partir de progesterona en sang.....	19
3.5 Anàlisi estadístic i recollida de dades.....	19
4. RESULTATS.....	21
4.1 Formació de cossos lutis.....	22
4.2 Progesterona plasmàtica .....	27
4.3 Fertilitat post-drenatge .....	28
5. DISCUSSIÓ .....	29
6. CONCLUSIONS .....	32
7. BIBLIOGRAFIA .....	33
8. ANNEX .....	38
8.1 Cicle reproductiu .....	38
8.1.1 Cicle estral .....	38
8.1.2 Desenvolupament fol·licular i del cos luti .....	39
8.1.3 Pèrdues embrionàries .....	40
8.1.4 Progesterona .....	41
8.2 Cicle productiu.....	41

## ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

FIGURA 1: Protocol reproductiu utilitzat a l'estudi.....	13
FIGURA 2: Disseny experimental aplicat en vaques amb presència de fol·licles preovulatoris bilaterals a dia d'inseminació artificial (IA).....	14
FIGURA 3: Esquema anatòmic del tracte reproductiu de la vaca de llet aplicant la tècnica d'ovum pick up (OPU).....	15
FIGURA 4: Els dos dispositius metàl·lics utilitzats en la tècnica de drenatge fol·licular per separat.....	15
FIGURA 5: Els dos dispositius metàl·lics utilitzats en la tècnica de drenatge fol·licular complementats.....	16
FIGURA 6: Vascularització dels cossos luti (CL) a dia 21 post-IA.....	17
FIGURA 7: Evolució de la progesterona plasmàtica (p4) a dia 7 i dia 21, pel grup Control i grup Drenatge en funció del diagnòstic de gestació a dia 28.....	25
FIGURA 8: Canvis ovàrics i hormonal durant el cicle estral de la vaca.....	31
TAULA 1: Localització dels fol·licles a dia de la inseminació artificial (IA), pel grup Control i pel grup Drenatge.....	19
TAULA 2: THI (Índex de temperatura i humitat) dia de la inseminació artificial (IA), pel grup Control i grup Drenatge.....	19
TAULA 3: Paràmetres analitzats a dia 7 pel grup Control i grup Drenatge.....	21
TAULA 4: Paràmetres analitzats a dia 21 pel grup Control i grup Drenatge.....	21
TAULA 5: Mida del cos luti (CL) funcional del grup Control i del grup Drenatge: CL del fol·licle drenat i CL del fol·licle dominant no drenat a dia 7 i 21 post-inseminació artificial (IA).....	22
TAULA 6: Mida del cos luti (CL) funcional del grup Control i del grup Drenatge: CL del fol·licle drenat i CL del fol·licle dominant no drenat a dia 7 en situació de no estrès tèrmic (0 - < 72) i d'estrès tèrmic (1 - ≥ 72) a dia de la inseminació artificial (IA).....	22
TAULA 7: Descripció de la vascularització de les vaques bilaterals del grup Drenatge respecte al cos luti (CL) del fol·licle drenat i el CL del fol·licle dominant no drenat.....	23
TAULA 8: Descripció de la vascularització del cos luti (CL) funcional del grup Control i el CL del fol·licle dominant no drenat de les vaques bilaterals del grup Drenatge.....	23
TAULA 9: Resultats reproductius: diagnòstics de gestació a dia 28, fertilitat, pèrdues gestacionals fins a dia 60 i taxa de concepció pel grup Control i grup Drenatge.....	25

## LLISTAT D'ABREVIATURES

Aspiració Transvaginal Ecoguiada	TUGA
Cos Luti	CL
Inseminació Artificial	IA
Flux sanguini luteal (luteal blood flow)	LBF
Mida luteal (luteal size)	LS
Ovum pick up	OPU
Progesterona	P4
Prostaglandina	PGF2 $\alpha$
Índex de temperatura i humitat (Temperature-Humidity Index)	THI

## RESUM

Les gestacions dobles són un problema important a les explotacions de vaques de llet d'alta producció, i cada cop la seva incidència és major. El principal objectiu del present estudi va ser comprovar la funcionalitat del cos luti (CL), format pel drenatge del fol·licle subordinat a dia de la inseminació artificial (IA), en vaques de llet d'alta producció amb mínim dos fol·licles. La funcionalitat del CL es va valorar a partir de la mida del CL (dia 7 i 21 post-IA), vascularització del CL (dia 21 post-IA) i les concentracions plasmàtiques de progesterona (p4)(dia 7 i 21 post-IA). Un segon objectiu va ser analitzar la fertilitat posterior a la tècnica. La població final de l'estudi va estar formada per 54 vaques: 29 del grup Control i 20 del grup Drenatge (13 bilaterals i 7 unilaterals). La duració de l'estudi va estar repartida en l'estació freda i en l'estació càlida. A dia 7 post-IA totes les vaques de l'estudi van presentar com a mínim una estructura luteal. En el grup Drenatge, a dia 7 post-IA, un 76,9% de les vaques bilaterals drenades van desenvolupar CL a l'ovari drenat. Respecte a les característiques dels CL formats, a dia 7 la mida del CL del grup Control ( $19\pm 4,53$  mm) era significativament major (p-valor= 0,00 i 0,02 respectivament) que els CL del grup Drenatge (CL del fol·licle no drenat:  $15\pm 4,24$ mm i CL del fol·licle drenat:  $10,11\pm 5,95$ mm). En canvi, a dia 21 no es van trobar diferències significatives entre la mida del CL del grup Control ( $19,41\pm 6,69$ mm) i el CL del fol·licle no drenat ( $22\pm 6$ mm) del grup Drenatge. El CL del fol·licle drenat presentava una mida de  $12,33\pm 4,51$ mm a dia 21, la qual era significativament menor que la mida del CL del fol·licle no drenat (p-valor= 0,05) i sense diferències respecte el grup Control. Per tant, el CL del fol·licle no drenat tenia una mida significativament menor que la resta a dia 7, i menor que el CL del fol·licle drenat a dia 21. Pel que fa a la vascularització, no es varen trobar diferències significatives entre els CL formats en el grup Drenatge (CL del fol·licle no drenat i CL del fol·licle drenat), ni entre el CL del grup Control i el CL del fol·licle no drenat del grup Drenatge. Les concentracions de p4 plasmàtica no van presentar diferències significatives entre el grup Control ( $2,52\pm 1,95$  i  $3,80\pm 3,52$ ng/ml) i el grup Drenatge ( $2,07\pm 1,21$  i  $2,66\pm 2,69$ ng/ml) ni a dia 7 ni a dia 21. A més a més, en ambdós grups hi havia concentracions plasmàtiques de p4 a dia 21 significativament majors quan el diagnòstic de gestació era positiu que quan era negatiu (p-valor=0,00 per ambdós grups). La fertilitat va ser d'un 34,4% en el Control i un 40% en el grup Drenatge, sense diferències significatives entre ambdós grups en els paràmetres reproductius. En cap dels dos grups es van registrar gestacions dobles. Els resultats del present estudi porten a concloure que el CL format pel drenatge és funcional, pel que la tècnica de drenatge fol·licular sembla ser una bona tècnica per a reduir les gestacions dobles sense perjudicar els paràmetres reproductius a les explotacions de vaques de llet actuals.

## RESUMEN

Las gestaciones dobles son un problema importante en las explotaciones de vacas de leche de alta producción y cada vez la incidencia es mayor. El principal objetivo del presente estudio fue comprobar la funcionalidad del cuerpo lúteo (CL) formado del drenaje del folículo subordinado a día de la inseminación artificial (IA) en vacas de leche de alta producción con mínimo dos folículos. La funcionalidad del CL se valoró a partir del tamaño del CL (día 7 y 21 post-IA), vascularización del CL (día 21 post-IA) y las concentraciones plasmáticas de progesterona (p4)(día 7 y 21 post-IA). Un segundo objetivo fue analizar la fertilidad posterior a la técnica. La población final del estudio estuvo formada por 54 vacas: 29 del grupo Control y 20 del grupo Drenaje (13 bilaterales y 7 unilaterales). El estudio se realizó de manera repartida en la estación fría y en la estación cálida. A día 7 post-IA todas las vacas del estudio presentaron al menos una estructura luteal. En el grupo Drenaje, a día 7 post-IA, un 76,9% de las vacas bilaterales drenadas desarrolló CL en el ovario drenado. Respecto a las características de los CL formados, a día 7 el tamaño del CL del grupo Control ( $19\pm 4,53\text{mm}$ ) era significativamente mayor ( $p\text{-valor}=0,00$  y  $0,02$  respectivamente) que los CL del grupo Drenaje (CL del folículo no drenado:  $15\pm 4,24\text{mm}$  y CL del folículo drenado:  $10,11\pm 5,95\text{mm}$ ). En cambio, a día 21 no se encontraron diferencias significativas entre el tamaño del CL del grupo Control ( $19,41\pm 6,69\text{mm}$ ) y el CL del folículo no drenado ( $22\pm 6\text{mm}$ ) en el grupo Drenaje. El CL del folículo drenado presentaba un tamaño de  $12,33\pm 4,51\text{mm}$  a día 21, el cual era significativamente menor que el CL del folículo no drenado ( $p\text{-valor}=0,05$ ) y sin diferencias con el grupo Control. Por tanto, el CL del folículo no drenado tenía un tamaño significativamente menor que el resto a día 7 y menor que el CL del folículo drenado a día 21. En cuanto a la vascularización, no se encontraron diferencias significativas entre los CL formados en el grupo Drenaje (CL del folículo no drenado y CL del folículo drenado), ni entre el CL del grupo Control y el CL del folículo no drenado del grupo Drenaje. Las concentraciones de p4 plasmática no presentaron diferencias significativas entre el grupo Control ( $2,52\pm 1,95$  y  $3,80\pm 3,52\text{ng/ml}$ ) y el grupo Drenaje ( $2,07\pm 1,21$  y  $2,66\pm 2,69\text{ng/ml}$ ) ni a día 7 ni a día 21. Además, en ambos grupos había concentraciones plasmáticas de p4 a día 21 significativamente mayores cuando el diagnóstico de gestación era positivo que cuando era negativo ( $p\text{-valor}=0,00$  para ambos). La fertilidad fue de un 34,4% en el Control y un 40% en el grupo Drenaje, sin diferencias significativas entre los grupos en los parámetros reproductivos. En ninguno de los dos grupos se registraron gestaciones dobles. Los resultados del presente estudio llevan a concluir que los CL formados por el drenaje son funcionales, por lo que la técnica de drenaje folicular parece ser una buena técnica para reducir las gestaciones dobles sin perjudicar los parámetros reproductivos en las explotaciones de vacas de leche actuales.

## ABSTRACT

Twin pregnancy is an important problem in dairy cattle and the incidence is increasing. This study main goal was to examine luteal activity to corpus luteum (CL) following drainage of the smaller pre-ovulatory follicle at time of artificial insemination (IA) in dairy cattle with a minimum two follicles. Luteal activity was determined regarding the CL size (days 7 and 21 post-IA), CL vascularization (day 21 post-IA) and plasma progesterone concentrations (p4) (days 7 and 21 post-IA). Additionally, a secondary objective was to analyze fertility post-technique. The study population consisted of 54 cows: 29 Control and 20 Drainage cows (13 bilateral and 7 unilateral). The study timespan was divided into cold and hot season. At day 7 post-IA, all cows developed at least one luteal structure. Within the drainage group, at day 7 post-IA, 76.9% of bilateral drained cows developed a CL in the drained ovary. Regarding the luteal activity of the formed CLs, at day 7, the CL size in control group ( $19 \pm 4.53$  mm) was significantly larger ( $p$ -value=0.00 and 0.02 respectively) than the CLs in drainage group (CL of the non-drained follicle:  $15 \pm 4.24$  mm and CL of the drained follicle:  $10.11 \pm 5.95$  mm). In contrast, on day 21 no significant differences were found between CLs size in control group ( $19.41 \pm 6.69$  mm) and CL in non-drained follicle ( $22 \pm 6$  mm) in drainage group. The CL size of drained follicle was  $12.33 \pm 4.51$  mm in day 21, which was significantly smaller than CL of non-drained follicle ( $p$ -value=0.05) and did not differ with control group. Therefore, CL of drained follicle was significantly smaller than the others at day 7 and smaller than CL of drained follicle at day 21. In respect of vascularity, no significant differences were found between the different CLs formed in drainage group (CL of non-drained follicle and CL of drained follicle), neither between control CL and non-drained follicle CL of drainage group. P4 concentrations did not show significant differences between control ( $2.52 \pm 1.95$  and  $3.80 \pm 3.52$  ng/ml) and drainage group ( $2.07 \pm 1.21$  and  $2.66 \pm 2.69$  ng/ml) neither at day 7 nor at day 21. In addition, in both groups there were significantly higher p4 concentrations on day 21, when the gestation diagnosis was positive rather than when negative diagnosis happened, in control and drainage group ( $p$ -value=0.00 for both groups). Fertility rate were 34.4% and 40% respectively in control and drainage group, with no significant differences between the groups regarding the reproductive parameters. None twin pregnancy was recorded. The results of the present study indicate that luteal structures following follicular drainage were functional, so the follicular drainage seems to be a good technique to reduce twin pregnancy without affecting reproductive parameters on current dairy farms.

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 Situació actual del sector del boví de llet

El rendiment lleter de les vaques de llet ha augmentat ràpidament en els darrers 40 anys, en alguns països europeus fins i tot més del doble, com és el cas d'Espanya. La necessitat històrica d'augmentar la productivitat per vaca deriva de l'augment dels costos de producció. En l'actualitat, els rendiments de llet superiors a 10.000 kg/any són habituals en la producció moderna, com a resultat de millores en l'alimentació, genètica, sanitat i instal·lacions. Per contra, a les vaques d'alta producció les característiques associades a l'eficiència biològica com són la reproducció i la longevitat, s'han anat deteriorant, tot i també ser claus per a la viabilitat. Particularment això ha passat a la raça Holstein, a causa d'una relació genètica desfavorable. Per exemple, la fertilitat ha disminuït amb l'augment del rendiment lleter de les últimes dècades (Rodríguez-Martínez et al., 2009; Camargo, 2012). La pèrdua fetal precoç ha sigut una altra de les conseqüències i probablement és el factor més important que afecta la rendibilitat de les explotacions lleteres. Però també l'afecten altres factors importants com són l'edat, el semen, l'estrès per calor i les gestacions dobles. Per intentar contrarestar tot aquest deteriorament, la combinació d'un millor control de la reproducció i una millora de la genètica pot afectar positivament la reproducció a la granja. En l'àmbit reproductiu cal fer seguiments intensos amb l'objectiu d'identificar precoçment les no gestants, anèstriques i poder millorar l'eficàcia reproductiva amb resincronitzacions immediates (López-Gatiús and García-Ispuerto, 2010 ; Lucy, 2019).

## 1.2 Gestacions dobles

Els bovins són una espècie monotoca, és a dir que en la majoria de les circumstàncies, una gestació amb èxit té com a resultat el naixement d'un sol vedell. Tot i això, a vegades es produeix el naixement de dos individus, que seria més propi d'espècies politoques. Els fetus resultants poden ser monozigots, si es desenvolupen de la fertilització d'un ovòcit que posteriorment se separa en dos embrions a l'úter, o dizigots, que resulten de la fertilització de dos ovòcits durant el mateix cicle estral. La majoria de gestacions dobles són dizigòtiques, pel que són conseqüència d'ovulacions múltiples. En el boví de carn aquestes gestacions poden ser desitjables econòmicament, però en canvi en el boví de llet no ho són, ja que disminueixen la rendibilitat global de l'explotació (Fricke, 2001). La realitat és que aquest tipus de gestacions en els bovins estan incrementant amb el temps i, si la tendència continua, les explotacions lleteres han d'estar



preparades per enfrontar-se als efectes negatius associats. Actualment, les estimacions de ràtio de gestacions dobles poden ser superior al 18% (Andreu-Vázquez et al., 2012c), i s'han registrat pèrdues de gestació fins a un 50%, especialment en condicions d'estrès per calor (López-Gatius et al., 2004 ; Andreu-Vázquez et al., 2011). Les taxes de gestacions dobles han augmentat considerablement en les últimes tres dècades i segurament ho continuaran fent juntament amb la producció de llet. El motiu més probable d'aquest augment és que hagi augmentat la doble taxa d'ovulació relacionada amb l'alta producció de llet (Del Río et al., 2007 ; López-Gatius and Hunter, 2017a ; López-Gatius et al., 2018). Així i tot, molts altres factors s'hi associen com són la genètica, número de lactacions, la raça, l'estació, l'ús d'antibiòtics o hormones reproductives, els quists ovàrics, etc. (Wiltbank et al., 2000). Se sospita que tant el progrés genètic, com les millores en la nutrició i les pràctiques de maneig han disminuït probablement el risc de pèrdua de gestació doble, i han augmentat la ràtio de gestacions dobles (Andreu-Vázquez et al., 2011).

Les conseqüències negatives d'aquest tipus de gestacions són tant per la vaca com pels vedells. A la vaca provoquen majors incidències de pèrdues de gestació (Silva-del-Río et al., 2009), distòcies, avortaments i malalties del peripart, com retenció de placenta i metritis. A més a més, incrementen el risc de patir desordres metabòlics, redueixen el rendiment reproductiu, produeixen freemartinisme i una major taxa d'eliminació. En conseqüència, les vaques acaben tenint intervals part-concepció més prolongats, majors taxes de sacrifici i una vida útil mitjana de producció més curta (Andreu-Vázquez et al., 2012a). La importància de les pèrdues de gestació ha fet que es realitzin molts estudis relacionats, ja que les gestacions dobles tenen el risc de pèrdua 3,1-6,9 cops major que les simples. Sembla que la causa pot ser l'espai insuficient a l'úter pel creixement dels fetus, en les quals els ipsilaterals tenen majors ràtio de pèrdues especialment als primers 60 dies, abans que la placentació es completi (Silva-del-Río et al., 2009). El risc de pèrdua de gestació durant el primer trimestre per les vaques amb gestació doble pot ser de 3 a 7 cops major que els únics, i de 5 a 9 cops major pels unilaterals que pels bilaterals (López-Gatius and García-Ispierto, 2010). A més a més, s'ha conclòs que les gestacions dobles són un dels factors principals no infecciosos que comprometen el manteniment de la gestació després d'un diagnòstic positiu (López-Gatius et al., 2004 ; Silva-del-Río et al., 2009). Les repercussions sobre els vedells són una major incidència de mortalitat fetal, neonatal i pes reduït al néixer a causa de la reducció de la duració de la gestació i a l'augment de la incidència de distòcia (Fricke, 2001). Tot això fa que l'impacte econòmic negatiu d'aquest tipus de gestacions oscil·li entre 97 i 225 dòlars, depenent si és unilateral o bilateral, paritat i DEL de quan es va produir la gestació (Mur-Novales et al., 2017).

La regulació d'aquest tipus de gestacions ha passat a tenir un gran interès, ja sigui mitjançant selecció genètica, tractaments hormonals, transferència d'embrions o supressió immunològica d'hormones. La possibilitat de tenir una pèrdua de gestació o que es produeixi una altra gestació doble, fa que sigui preferible monitoritzar i manejar-la, que no sacrificar la vaca o provocar l'avortament al primer trimestre de gestació (Silva-del-Río et al., 2010 ; Risco and Melendelez, 2011). El maneig d'aquest tipus de gestacions pot incloure exàmens addicionals per identificar pèrdues de gestació, eixugat precoç de la vaca per a compensar la menor duració de gestació, alimentació amb racions més energètiques i proporcionar major monitoratge i assistència al part i peripart. S'han posat en pràctica diverses tècniques per intentar aconseguir la reducció embrionària induïda a nivell de camp sense que hi hagi una pèrdua total de gestació. Les primeres tècniques utilitzades varen ser la ruptura amniòtica manual amb suplementació de progesterona (p4) (Andreu-Vázquez et al., 2011) o l'aspiració transvaginal ecoguiada (TUGA) (Andreu-Vázquez et al., 2012b) entre el dia 28-41 de gestació, amb les quals es van reportar resultats semblants; la tècnica era exitosa per les dobles bilaterals però no ho era tant amb les unilaterals (Andreu-Vázquez et al., 2011). La instil·lació de prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) en un dels dos cossos lútics (CL) era una tècnica menys traumàtica, per intentar aconseguir una reducció espontània de les gestacions dobles (López-Gatius et al., 2017), la qual estaria relacionada amb la regressió del CL ipsilateral i a la inversa (López-Gatius and Hunter, 2016). Tot i així, cap de les tècniques va tenir molt èxit a nivell de camp, i conseqüentment s'ha desenvolupat recentment una nova tècnica. Totes les estratègies per a reduir les gestacions dobles s'han relacionat en intentar augmentar les concentracions de p4, com passaria en el cas de tenir CL addicionals (Bech-Sàbat et al., 2010). La tècnica més recent és la punció i drenatge del fol·licle subordinat a dia d'inseminació artificial (IA), amb la qual tots els fol·licles drenats van desenvolupar estructures luteals conseqüents del drenatge a dia 7. Aquesta tècnica supera el risc de pèrdua de gestació relacionada amb els processos de reducció induïda de bessons esmentats anteriorment, elimina el risc de gestacions dobles i augmenta la incidència de CL addicionals (López-Gatius and Hunter, 2017b). Sembla ser una tècnica realment eficient per a reduir les gestacions dobles sense provocar una disminució de la fertilitat, pel que el present estudi aprofundeix en les característiques d'aquest CL format de la punció i analitza la seva funcionalitat, ja que s'ha reportat que la presència de CL addicionals és un factor fort per a mantenir la gestació (López-Gatius et al., 2019).

### 1.3 Eines de monitoreig al camp: Ecografia i Doppler

L'arribada de l'ecografia en mode B a la reproducció bovina a la dècada de 1980, va anunciar grans avenços en la investigació i la pràctica clínica, ja que va permetre la visualització no invasiva dels òrgans reproductors interns (Herzog and Bollwein, 2007). L'adopció d'aquesta eina per part dels professionals ha anat augmentant molt, pel que actualment és una eina clau per a les visites de reproducció que es fan a les granges d'alta producció. Els aparells d'ecografia mode B proporcionen imatges amb escala de grisos (visualització en dues dimensions en temps real de punts) amb una freqüència superior a 5 MHz, d'aquesta manera s'identifiquen amb precisió les estructures uterines i ovàriques de més de 2 mm de diàmetre. La detecció de l'embrió amb ultrasons es pot fer amb menor precisió fins al dia 30 en el cas de gestacions dobles, a partir d'aquest moment, els embrions solen estar completament envoltats de líquid, el qual facilita el diagnòstic i l'excés de membranes pot ser un bon indicador. De totes maneres, l'objectiu ha de ser que el dos embrions s'han de poder veure en claredat i si són dizigots, com la majoria de casos, es trobaran dos, o, ocasionalment més CL. (López-Gatius and García-Ispierto, 2010).

Per a poder avançar més amb el diagnòstic per imatge es va començar a utilitzar l'ecografia amb color Doppler. Aquest és un mètode no invasiu que s'utilitza per a l'observació visual de la perfusió genital durant diverses etapes del cicle estral, gestació i puerperi (Kaya et al. 2016). El Doppler detecta el nombre de vermells que es mouen pels vasos i els mostra com píxels de color a la imatge en mode B del CL. Per tant, el flux de sang es pot visualitzar en temps real, proporcionant informació anatòmica i sobre l'estat del qual s'ha examinat (López-Gatius and García-Ispierto, 2010). La importància d'aquesta eina és que permet aportar informació sobre la funcionalitat del CL i per tant, es pot utilitzar per avaluar-la dels CL formats. El CL té una vida útil de 17-18 dies i és una estructura endocrina que participa en l'establiment i el manteniment de la gestació produint p4, almenys durant els primers 200 dies de gestació (Bech-Sàbat et al., 2010). Com el CL és necessari, pràcticament durant tota la gestació, analitzar el seu estat podria ser una bona estratègia per controlar el manteniment/pèrdua de gestació. Es desconeix si el CL desapareix a causa de la mort de l'embrió, o bé si és a la inversa, la regressió del CL provoca la mort dels embrions. Aquesta estructura rep el màxim nivell de flux sanguini proporcional a la seva mida. Per consegüent, els seus vasos sanguinis i les cèl·lules endotelials tenen un paper important, i per aquesta raó la mesura del flux sanguini luteal (LBF) es va començar a utilitzar per a determinar el seu estat funcional. La valoració de LBF és més informativa sobre la funció luteal durant el cicle estral que no la mida luteal (LS) (Herzog et al., 2011). Alguns investigadors suggerien que el LBF augmentava paral·lelament a l'augment LS i el nivell de p4, durant el desenvolupament del CL, i que LBF estava fortament correlacionat amb la producció de p4

(Herzog and Bollwein, 2007 ; Viana et al., 2013). Tot i això, altres estudis diferenciaven aquestes relacions en funció del moment en el cicle estral (fase de luteogènesis o de luteòlisis) (Lüttgenau et al., 2011 ; Heinrich et al., 2016 ; Bollwein et al., 2016). Recentment, en un estudi amb vaques receptores d'embrions, s'ha reportat que el LS és tant eficaç com LBF (Pugliesi et al., 2019). De totes maneres, realment la funció luteal només es pot avaluar de manera fiable mitjançant la determinació de la concentració plasmàtica de P4, però és un procediment relativament car i laboriós a nivell laboratorial (Skenandore et al., 2017). Per aquesta raó han triomfat els mètodes no invasius i que en temps real donen informació sobre l'ovari i el CL (Siqueira et al., 2009).

Amb l'objectiu d'obtenir una avaluació de la funcionalitat del CL i estructures luteals, l'eina més òptima possible a nivell de camp és la utilització del Doppler per a mesurar LBF i LS (Herzog and Bollwein, 2007 ; López-Gatius and García-Ispuerto, 2010 ; Kaya, S., et al. 2016).

S'ha comentat que la tècnica de punció del fol·licle subordinat al moment de la IA sol portar a l'aparició d'estructures luteals associades, pel que a partir de les tècniques disponibles es vol conèixer la seva funcionalitat i així comprovar la seva viabilitat. Això s'explica ja que el drenatge sense aspiració sembla deixar un nombre suficient de cèl·lules de granulosa al fol·licle, i que posteriorment donen lloc a teixit luteal. Si aquestes estructures luteals addicionals són funcionals, poden reduir el risc posterior de pèrdua de gestació (López-Gatius et al., 2019). La importància dels CL addicionals ja s'ha vist en alguns estudis, la presència de més CL que embrions està fortament relacionat amb la reducció de la pèrdua fetal. Un 1,7% de 363 vaques amb CL addicionals van patir pèrdua fetal, en comparació amb un 9,9% de pèrdues registrades en 3643 animals gestants sense CL addicionals (Bech-Sàbat et al., 2010).

Per totes les raons explicades anteriorment, l'objectiu del present estudi va ser comprovar la funcionalitat del CL format del drenatge fol·licular a dia de la IA.

## 2. OBJECTIUS

L'objectiu principal del present estudi va ser comprovar la funcionalitat dels CL formats del drenatge fol·licular a dia de la IA en vaques de llet d'alta producció. Aquest objectiu es va aconseguir determinant:

- Mida del CL amb ecografia transrectal (dia 7 i 21)
- Vascularització del CL amb ecografia Doppler (dia 21)
- Concentracions de p4 plasmàtica (dia 7 i 21)

A més a més, un segon objectiu va ser avaluar la fertilitat resultant post-drenatge fol·licular.

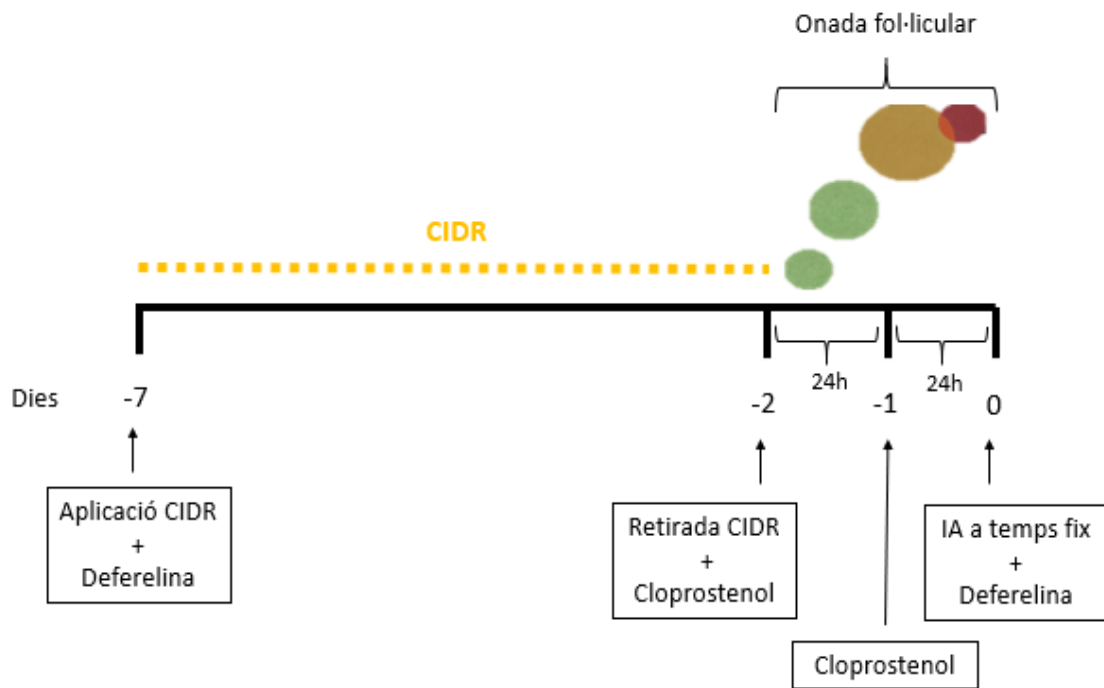
## 3. MATERIAL I MÈTODES

### 3.1 Animals experimentals

L'estudi realitzat es va dur a terme amb la població d'una granja comercial de 240 animals en lactació de vaques lleteres Holstein-Frisona, situada a la província del Segrià. L'estudi es va realitzar en el període comprés entre el novembre del 2017 i l'abril del 2018. En aquest període el nombre mitjà de vaques en lactació del ramat era de 240 animals, amb una mitjana anual de producció de llet de 10.190 kg per vaca present. Les vaques de l'explotació ramadera estaven alimentades amb una ració completa i la freqüència de munyida era de dos cops al dia. Les vaques sanes varen ser les úniques a incloure's a l'estudi, lliures de desordres reproductius detectables i de malalties clíniques durant el període de l'estudi (dels 5 dies abans de la IA fins als 28 dies posteriors a la IA). Els criteris d'exclusió que es varen tenir en compte van ser els següents: mastitis, laminitis, desordres digestius i del tracte reproductiu. Els desordres uterins i ovàrics van ser detectats mitjançant ecografia, com ara metritis, endometritis, piòmetra i fol·licles ovàrics quístics.

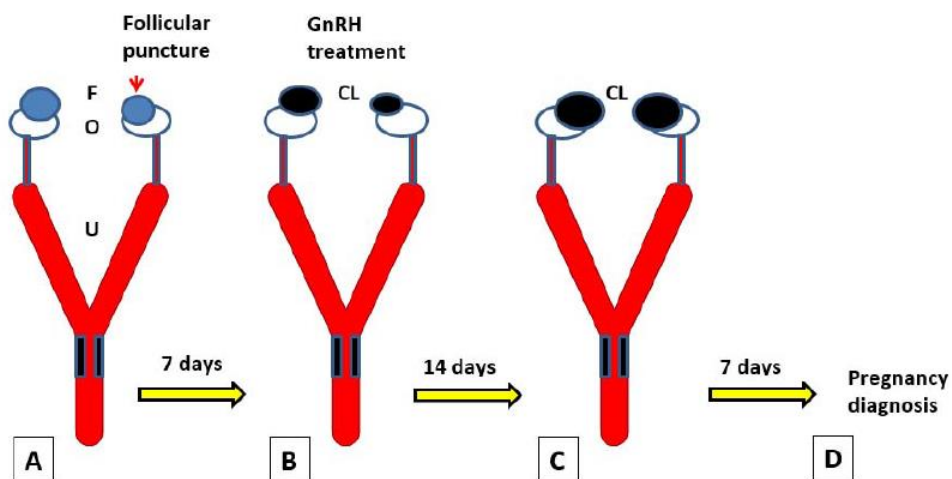
Respecte al protocol reproductiu que es va dur a terme, les vaques que havien passat el període d'espera voluntari (50 dies) i/o que no havien quedat gestants d'inseminacions posteriors es van tractar amb un dispositiu de p4 intravaginal (CIDR, 1.38 g de p4; Zoetis, Nova York, USA) i un agonista de la GnRH (Deferelina, 100 µg d'acetat de gonadorelina [6-D-Phe] i.m.; Gonavet Veyx, Ecuphar, Barcelona, Espanya), a dia -7 com es pot observar a la figura 1. Al cap de 5 dies, dia -2, el CIDR es retirava i seguidament es subministrava cloprostenol (500 µg i.m.; PGF Veyx Forte, Ecuphar, Barcelona, Espanya). A les 24 hores posteriors, dia -1, les vaques rebien la segona dosi de cloprostenol. La inseminació artificial considerada dia 0, es realitzava 50-56h després d'haver retirat el CIDR i s'aplicava la segona dosi d'agonista de la GnRH. Al cap de 7 dies se subministrava una tercera dosi d'agonista de la GnRH a les vaques del grup Drenatge. El diagnòstic de gestació es feia als dies 28-34 post IA per ecografia transrectal i es confirmava als dies 50-56 i 90 post IA.

La presència de gestació doble es va establir a través de l'observació de dos embrions en posicions diferents dins de les banyes uterines en dues exploracions amb l'ecògraf: dos embrions simultàniament presents a la pantalla (gestació doble unilateral) o un embrió en cada banya uterina (gestació doble bilateral). La presència i localització de fol·licles també es va establir per l'observació amb l'ecògraf, els quals es podien localitzar al mateix ovari (vaques unilaterals) o en ambdós ovaris (vaques bilaterals).



**FIGURA 1:** Protocol reproductiu utilitzat a l'estudi. IA: Inseminació Artificial

Les vaques amb una condició corporal amb puntuació entre 2,5 i 3,5 dins de l'escala de l'1 al 5 que produïen més de 30 kg de llet/dia van ser seleccionades per l'estudi. Combinant l'ecografia amb la palpació manual rectal es va confirmar l'estre de les vaques i el moment de la IA. Només es varen incloure en l'estudi vaques que tinguessin com a mínim dues estructures fol·liculars iguals o majors a 12 mm de diàmetre amb absència de CL, localitzades en el mateix ovari o una estructura fol·licular en cada ovari, unilateral i bilateral respectivament, el dia de la IA.



**FIGURA 2:** Disseny experimental aplicat en vaques amb presència de fol·licles preovulatoris bilaterals a dia d'inseminació artificial (IA). El drenatge del fol·licle més petit (subordinat) es va realitzar el dia de la IA en el grup Drenatge (A). A dia 7 després de la IA se subministrava una dosi de GenRH i s'avaluava l'ovulació i l'activitat luteal al grup Drenatge i grup Control. Es va determinar l'activitat luteal amb mesures del CL i progesterona plasmàtica (B). A dia 21 després de la IA es va tornar a avaluar l'activitat luteal i la vascularització dels CL (C). El diagnòstic de gestació es va realitzar el dia 28 després de la IA (D).

F: Fol·licles; CL: Cos luti; O: Ovaris; U: Úter. Font: López-Gatius et al., 2019.

### 3.2 Drenatge fol·licular i disseny experimental

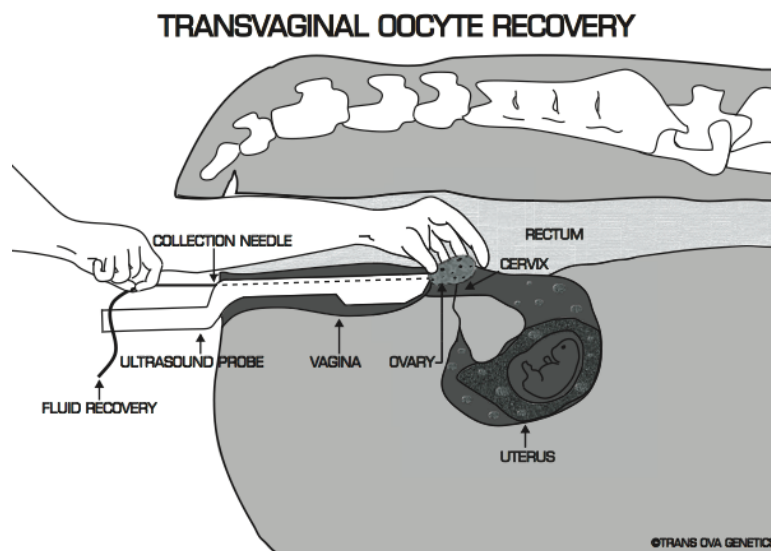
Tots els procediments varen ser aprovats pel Comitè Ètic d'Animals d'Experimentació de la Universitat de Lleida (llicència número CEEA.06-01/12).

Les vaques es varen assignar aleatòriament al grup Control (n=29) o al grup Drenatge (n=20), figura 2. La punció fol·licular i el drenatge del fol·licle subordinat realitzat a les vaques del grup Drenatge es va realitzar per procediments semblants a la punció de fol·licles ovàrics quístics, la qual s'explica a continuació.

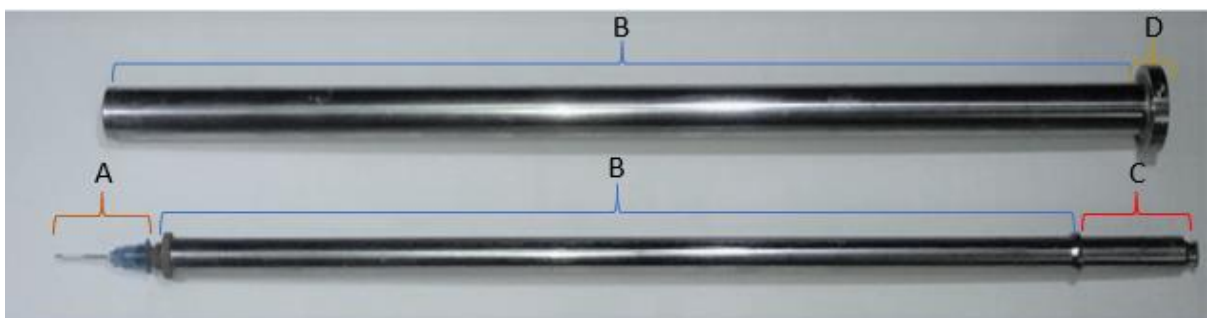
La tècnica es va realitzar mitjançant palpació transrectal i via vaginal, la qual és molt similar a la tècnica d'*ovum pick up* (OPU) (figura 3) i a la descrita per López-Gatius i Hunter (2017), però sense ser ecoguiada. El material que es va utilitzar per a realitzar la tècnica consistia en dos aparells metàl·lics: una guia metàl·lica rígida i un suport metàl·lic rígid complementaris (figura 4), ja que el suport s'introduïa a l'interior de la guia i discorria interiorment a aquesta (figura 5).



La guia metàl·lica rígida tenia una longitud de 30 cm i un diàmetre de 2 cm, a través de la qual s'establí una comunicació entre el fol·licle a drenar i l'exterior. Al seu interior, s'hi introduïa el suport metàl·lic rígid, el qual tenia una longitud de 35 cm i un diàmetre de 1 cm; a l'extrem del qual es col·locava una agulla estèril de 19 G i 25 mm de llargada, per tal de poder realitzar el drenatge fol·licular en contactar i punxionar el fol·licle. Per tant, el suport s'introduïa a l'interior de la guia metàl·lica i permetia realitzar moviments cranials i caudals, amb l'objectiu de poder avançar a l'interior de la guia i acaba exterioritzant o no l'agulla, més enllà de l'extrem de la guia. D'aquesta manera la tècnica permetia fer arribar l'agulla fins al lloc on es volia punxionar i drenar, sense danyar la resta d'estructures que hi havia fins a arribar al lloc d'interès.



**FIGURA 3:** Esquema anatòmic del tracte reproductiu de la vaca de llet aplicant la tècnica d'*ovum pick up* (OPU) Font: Trans Ova Genetics.



**FIGURA 4.** Els dos dispositius metàl·lics utilitzats en la tècnica de drenatge fol·licular per separat. A la part superior hi ha la guia metàl·lica i a la part inferior el suport metàl·lic. L'agulla (A), l'eix principal (B), la base (C), gatell (D). Font: Cedida per Doctora Irina Garcia Ispierto, 2020.



**FIGURA 5.** Els dos dispositius metàl·lics utilitzats en la tècnica de drenatge fol·licular complementats. El suport amb l'agulla es troba a l'interior de la guia metàl·lica. Posició amb introducció total del suport i exteriorització de l'agulla per l'extrem, simulant la situació de drenatge fol·licular. Font: Cedida per Doctora Irina Garcia Isperto, 2020.

Immediatament abans del drenatge, la vulva, la regió perianal i els aparells es rentaven amb solució iodada. Via rectal primer es contava i s'anotava el nombre de fol·licles que hi havia a cada ovari, seguidament es localitzava l'ovari amb més fol·licles (en el cas de les vaques bilaterals) o l'ovari amb fol·licles (en el cas de les vaques unilaterals) i s'apropava al fòrnix vaginal. D'aquest ovari es seleccionava el fol·licle més petit per a drenar, el qual correspondria al subordinat, mentre que el fol·licle més gran, que correspondria normalment al dominant es deixava per tal que ovulés. Amb l'altra mà, avançant dorsal al fòrnix vaginal i cap a l'esquerra o la dreta del coll i cos uterí, en funció d'on es localitzés l'ovari a drenar, s'anava introduint la guia metàl·lica amb el suport al seu interior per la vagina, sense que l'agulla sobresortís per l'extrem de la guia. Un cop l'ovari entrava en contacte amb l'extrem de la guia, separats únicament per les capes uterines i el recte, es feia desplaçar cranialment el suport amb l'agulla per l'interior de la guia, per tal que sobresortís l'agulla. D'aquesta manera es punccionava el fol·licle desitjat sense aspiració i es retirava l'aparell de la vagina, un cop s'havia assegurat amb la mà que el fol·licle punccionat quedava buit i havent enretirat el suport per tal d'amagar l'agulla a l'interior de la guia. El procés durava aproximadament 1 minut en funció de la facilitat d'aconseguir posicionar l'ovari al fòrnix. Les vaques no varen mostrar cap mena de desconfort durant la punxada intra-fol·licular. Entre animals, es canviava l'agulla i es desinfectaven els aparells amb aigua amb iode.

Immediatament, després del drenatge fol·licular, les vaques es varen inseminar amb semen congelat d'un sol mascle. Les vaques del grup Control es varen inseminar amb semen congelat com es fa de manera rutinària. En el disseny experimental el dia de la IA es va prendre com a dia 0 de l'estudi.

La presència d'un CL del fol·licle dominant en el grup Drenatge i la presència d'un o més CL en el grup Control van ser els indicadors d'ovulació que es van avaluar 7 dies post-IA. A més a més, a dia 0, dia 7 i 21 post-IA es va enregistrar la mida dels fol·licles amb ecografia, del CL en l'ovari que havia ovulat i del CL del fol·licle que s'havia drenat fent la mitja entre les dues mesures amb major longitud i amplada. Concretament, en el cas de CL cavitaris, es va enregistrar el valor mitjà

de la paret luteal. Es va valorar l'activitat luteal mitjançant concentracions plasmàtiques P4 els dies 7 i 21 post-IA i mitjançant ultrasonografia Doppler el dia 21 després de la IA.

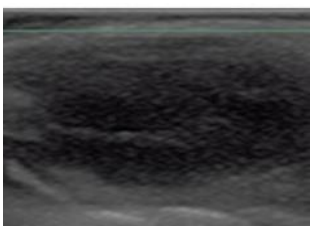
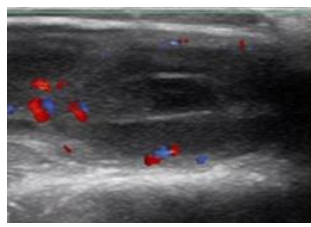
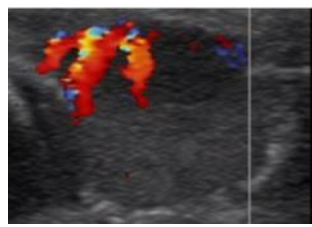
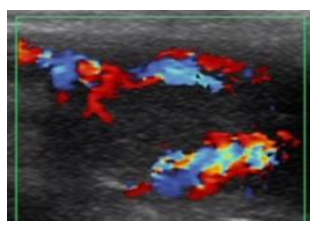
El diagnòstic de gestació es va realitzar amb l'aparell d'ecografia als 28 dies post-IA. Tots els exàmens ginecològics i les inseminacions van ser realitzats per la mateixa persona.

### 3.3 Mesures de l'activitat luteal a partir d'ecografia Doppler

Els dos ovaris es van examinar amb un equip d'ecografia Doppler color el dia 21 post-IA (Zonare Medical Systems Inc., USA equipat amb un transductor de 7.5 MHz) i les superfícies dels CL es varen escanejar i digitalitzar en vídeo.

Les imatges de la secció transversal de cada CL es varen enregistrar. El diàmetre (mitjana de dues mesures) i l'àrea es van obtenir a partir de les imatges d'ecografia en les quals la secció presentava major mida del CL. En el cas dels CL cavitaris, aquest es va mesurar i restar l'àrea cavitària per tal d'obtenir l'àrea del teixit luteal. Finalment, es van enregistrar de cada CL les tres imatges de secció transversal de major àrea i la imatge amb major vascularització.

Les imatges amb Doppler de color s'han utilitzat per avaluar les àrees vascularitzades de les estructures luteals (figura 6). L'àrea vascularitzada s'ha calculat per a cada imatge seleccionada de cadascun dels CL, utilitzant Image J® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). El percentatge de vascularització dels CL (àrea amb color Doppler/àrea total CL x 100) va ser determinada per a cada avaluació. Tots els CL es van digitalitzar en mode B, power i mode color Doppler. A més, totes es varen digitalitzar amb format DICOM i tots els controls fixos preinstal·lats del sistema Doppler es van utilitzar per excloure variacions en les gravacions. Totes les investigacions d'ecografia van ser realitzades pel mateix operador.

1	2	3	4
			
0 %	< 25 %	25-50 %	> 50 %

**FIGURA 6:** Vascularització amb percentatge (%) dels cossos luti (CL) a dia 21 post-IA. Classificats en quatre classes: (0) sense vascularització; (1) <25%; (2) entre 25 i 50%; (3) > 50% de parènquima vascularitzat. Font: López-Gatius et al., 2019.

### 3.4 Mesures de l'activitat luteal a partir de progesterona en sang

Es varen recollir mostres de sang el dia 7 i 21 post-IA mitjançant un tub vacutainer (BD Vacutainer™; Becton-Dickenson and Company, Plymouth, UK) amb heparina de la vena coccígia, es varen centrifugar 20 min (10 min, 1600 g) i emmagatzemar el plasma a 20°C fins a ser analitzats.

Es va utilitzar un kit comercial d'avaluar per assaig d'immunoabsorció lligat a enzims (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (Ridgeway Scientific, Alvington, Gloucestershire, UK) per a determinar les concentracions de p4. La sensibilitat de la prova era de 0,15 ng/ml. Les mostres es van avaluar per duplicat i totes les mostres van ser analitzades pel mateix avaluador (el coeficient de variació intra-avaluació, 6%).

### 3.5 Anàlisi estadístic i recollida de dades

De cadascun dels animals de l'estudi es van enregistrar les següents dades: estació de la IA (freda- octubre a maig; vs. càlida-maig a octubre); THI (Índex de temperatura i humitat) a dia de la IA (0 - < 72 vs. 1 - ≥ 72); localització dels fol·licles (unilaterals vs. bilaterals); nombre de fol·licles a dia de la IA (mínim 2 fol·licles); drenatge fol·licular (control vs. drenatge); mida fol·licular a dia de la IA, dia 7 i 21 post-IA (diàmetre dels fol·licles ≥9 mm); fracàs ovulatori a dia 7; presència de CL cavitaris a dia 7 post-IA; localització de les estructures luteals a dia 7 i dia 21 post-IA (dret vs. esquerra); mida i nombre de CL i estructures luteals conseqüents del drenatge a dia 7 i 21 post-IA; presència de 2 CL a dia 7 i dia 21 post-IA; vascularització a dia 21 post-IA (quatre classes: (0) sense vascularització; (1) <25%; (2) entre 25 i 50%; (3) >50% de parènquima vascularitzat); concentració de p4 plasmàtica (ng/ml) a dies 7 i 21 post-IA; diagnòstics de gestació i taxa de concepció a dia 28 i pèrdues de gestació (embrionàries/fetals) fins a dia 60.

El THI es va calcular a partir de la fórmula de:  $THI = (1,8 \times Ta) - ((1 - HR) \times (Ta - 14,3)) + 32$ . En la qual Ta: temperatura ambient i HR: humitat relativa, en tant per 1.

El fracàs ovulatori es va definir per l'absència de CL del fol·licle dominant en el grup Drenatge i per l'absència de CL en el grup Control a dia 7. La fertilitat es va definir com el percentatge de vaques amb diagnòstic de gestació positiu a dia 28 sobre el total de vaques inseminades. Les pèrdues de gestació fins a dia 60 es van definir com el percentatge de vaques que es van convertir en vaques buides respecte a les que eren positives al diagnòstic de gestació a dia 28. La taxa de concepció es va definir com el percentatge de vaques que es van convertir en gestants del corresponent grup, sense tenir en compte les vaques que havien tingut fracàs ovulatori a dia 7 i/o no havien desenvolupat cap estructura luteal a dia 21.

Les dades es van tractar estadísticament amb el programa IBM SPSS statistics 22. Per una banda es va dur a terme el test ANOVA per a comparar mitjanes (p4 plasmàtica i mides luteals). Per altra banda, es va realitzar la prova de Chi-quadrat per a comparar variables ordinals (vascularització i resultats reproductius). La significació es va establir amb p-valor  $\leq 0,05$ . Els valors es van expressar com la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard.

## 4. RESULTATS

Finalment la població va estar formada per a 49 vaques: 29 vaques van pertànyer al grup Control (sense drenar) i 20 vaques (13 bilaterals i 7 unilaterals) al grup Drenatge (Taula 1).

A l'estació freda es varen inseminar 18 vaques (62%) del grup Control i 10 vaques (50%) del grup Drenatge. En l'estació càlida es varen inseminar 11 vaques (38%) del grup Control i 10 vaques (50%) del grup Drenatge. Respecte a l'absència d'estrès tèrmic a dia de la IA va correspondre a 11 vaques (38%) del grup Control i 8 (40%) vaques del grup Drenatge. La presència d'estrès tèrmic a dia de la IA va correspondre a 18 vaques (62%) del grup Control i 12 vaques (60%) del grup Drenatge (Taula 2).

**TAULA 1:** Localització dels fol·licles a dia de la inseminació artificial (IA), pel grup Control i grup Drenatge.

		Grup Control (n=29)	Grup Drenatge (n=20)
<b>Localització dels fol·licles dia de la IA</b>	Bilaterals	17 (58,6%)	13 (65%)
	Unilaterals	12 (21,4%)	7 (35%)
	<i>Dreta</i>	9 (31%)	6 (30%)
	<i>Esquerra</i>	3 (10,3%)	1 (5%)

**TAULA 2:** THI (Índex de temperatura i humitat) dia de la inseminació artificial (IA), pel grup Control i grup Drenatge

		Grup Control (n=29)	Grup Drenatge (n=20)
<b>THI dia de la IA</b>	No estrès tèrmic (0 - ≤ 72)	11 (38%)	8 (40%)
	Estrès tèrmic (1 - ≥ 72)	18 (62%)	12 (60%)

Totes les vaques incloses a l'estudi tenien com a mínim 2 fol·licles al dia de la IA, els quals presentaven una mida mínima de 9mm.

#### 4.1 Formació de cossos lútics (CL)

A dia 7 post-IA totes les vaques de l'estudi presentaven com a mínim una estructura luteal en els ovaris, mentre que a dia 21 post-IA en presentaven un 80%.

Al grup Control totes les vaques van desenvolupar com a mínim 1 CL a dia 7, pel que en aquest grup no es va enregistrar cap fracàs ovulatori. A dia 21, 3 vaques (10,3%) no presentaven cap estructura luteal, 19 vaques (65,5%) presentaven 1 CL, 6 vaques (20,7%) presentaven 2 CL i 1 vaca presentava 3 CL (3,4%) (Taula 3 i 4). De les vaques que formaven aquest grup es comptava amb la mida (Taula 5 i 6) i vascularització del CL funcional (Taula 7 i 8), el que es va crear de l'ovulació, i la p4 plasmàtica.

Al grup Drenatge, de les 13 vaques bilaterals drenades, 10 vaques bilaterals (76,9%) van desenvolupar mínim un CL a dia 7 del fol·licle drenat. Mentre que pel que fa a la formació de CL a l'ovari contralateral al drenatge a dia 7 (CL del fol·licle dominant no drenat) en varen desenvolupar 8 vaques bilaterals (80% de les bilaterals drenades amb CL del fol·licle drenat). Per tant, en 2 vaques el fol·licle dominant corresponent no va ovular, van patir fracàs ovulatori i no van desenvolupar gestació. Les 3 vaques bilaterals restants (23,1 %) no van desenvolupar cap estructura del fol·licle drenat a dia 7, però totes van desenvolupar CL del fol·licle contralateral al drenatge a dia 7; van mantenir el CL fins a dia 21 i amb diagnòstic de gestació positiu a dia 28. Per tant, del total de vaques bilaterals puncionades (n=13) en 11 vaques el fol·licle dominant no drenat va ovular (84,6%). A dia 21 l'evolució de les 8 vaques bilaterals drenades amb dos CL a dia 7 post-IA va ser:

- Una vaca va mantenir els 2 CL a dia 21. Va quedar gestant.
- Tres vaques van perdre el CL del fol·licle drenat i van mantenir el CL del fol·licle dominant no drenat. Una d'elles amb la presència de dos CL i amb diagnòstic gestació positiu.
- Una vaca va mantenir el CL del fol·licle drenat a dia 21 i va perdre el CL del fol·licle dominant no drenat.
- Tres vaques van perdre els 2 CL a dia 21.

Per tant, de les vaques bilaterals drenades només 4 vaques (31 %) mantenien el CL del fol·licle drenat a dia 21 (Taula 3 i 4).

Respecte a les vaques unilaterals del grup Drenatge (n=7), totes varen desenvolupar CL a dia 7 de l'ovari del qual s'havia fet el drenatge fol·licular i en un cas com a CL cavitari. Dues de les vaques unilaterals drenades (28,6%), a més a més, presentaven CL a l'ovari contra lateral al drenatge, és a dir a partir de fol·licles menors a 9 mm no enregistrats a dia 0, però només una

vaca el va mantenir a dia 21. Una vaca unilateral drenada va patir fracàs ovulatori (Taula 3).  
L'evolució de les unilaterals a dia 21 va ser:

- 2 vaques van perdre el CL a dia 21 de l'ovari del drenatge.
- 2 vaques van mantenir dos CL a dia 21 de l'ovari del drenatge.
- 3 vaques van mantenir un CL a dia 21 de l'ovari del drenatge.

De les vaques del grup Drenatge, només es van utilitzar les mides (Taula 5 i 6) i vascularització (Taula 7 i 8) dels CL de les vaques bilaterals drenades, tenint la informació sobre el CL del fol·licle drenat i CL del fol·licle dominant contralateral al drenatge. Mentre que la p4 plasmàtica es va analitzar tant de les vaques bilaterals drenades com unilaterals drenades.

**TAULA 3:** Paràmetres analitzats a dia 7 pel grup Control i grup Drenatge.

<b>DIA 7</b>	<b>Grup Control (n=29)</b>	<b>Grup Drenatge (n=20)</b>
<b>CL de fol·licle drenat</b> (bilaterals n=13)	-	10 (76,9%)
<b>CL del fol·licle dominant no drenat</b> (bilaterals n=13)	29 (100%)	11 (84,6%)
<b>CL cavitari</b>	4 (13,7%)	2 (10%)
<b>Fracàs ovulatori</b>	0 (0%)	2 (10%)

CL: Cos Luti.

**TAULA 4:** Paràmetres analitzats a dia 21 pel grup Control i grup Drenatge.

<b>DIA 21</b>	<b>Grup Control (n=29)</b>	<b>Grup Drenatge Bilaterals (n=13)</b>
<b>CL del fol·licle drenat</b>	-	4 (30,7%)
<b>CL del fol·licle dominant no drenat</b>	26 (89,6%)	5 (38,4%)

CL : Cos Luti



Analitzant estadísticament la mida mitjana dels CL a dia 7 i 21 (Taula 5), es va reportar que la mida mitjana del CL el dia 7 post- IA obtingut per l'ovulació en el grup Control ( $19 \pm 4,53$ mm, oscil·lant entre 5-23mm) va ser significativament superior ( $p$ -valor=0,00 i 0,02, respectivament) que la mida dels CL presents en el grup Drenatge, tant dels CL resultants dels fol·licles drenats ( $10,11 \pm 5,95$ mm oscil·lant entre 4-16mm) com dels CL dels fol·licles dominants no drenats ( $15 \pm 4,24$  mm oscil·lant entre 11-19mm). Dins del grup Drenatge, la mida dels CL dels fol·licles dominants no drenats va ser significativament major que la mida dels CL dels fol·licles drenats ( $p$ -valor=0,04).

A dia 21 post-IA, la mida del CL del grup Control no va presentar diferències significatives amb la resta de CL. La mida dels CL dels fol·licles dominants no drenats va ser significativament major que la mida dels CL del fol·licle drenat ( $p$ -valor=0,05).

**TAULA 5:** Mida del cos luti (CL) funcional del grup Control i del grup Drenatge: CL del fol·licle drenat i CL del fol·licle dominant no drenat a dia 7 i 21 post-inseminació artificial (IA).

MIDA CL (Mitjana $\pm$ desviació estàndard) (mm)	Grup Control <b>CL funcional</b> (n= 28/22)	Grup Drenatge Bilaterals	
		<b>CL del fol·licle drenat</b> (n= 9/3)	<b>CL del fol·licle dominant no drenat</b> (n=11/6)
Dia 7	$19 \pm 4,53^a$	$10,11 \pm 5,95^c$	$15 \pm 4,24^b$
Dia 21	$19,41 \pm 6,69^{ab}$	$12,33 \pm 4,51^b$	$22 \pm 6^a$

Els valors amb diferents lletres dins de les files denoten diferències significatives detectades pel test ANOVA ( $P$ -valor  $\leq 0,05$ ).

Pel que fa a l'efecte de l'estrès tèrmic a dia de la IA sobre la mida dels CL es va reportar que en cap dels casos van aparèixer diferències significatives en situació de no estrès tèrmic i d'estrès tèrmic dia a de la IA (Taula 6).

**TAULA 6:** Mida del cos luti (CL) funcional del grup Control i del grup Drenatge: CL del fol·licle drenat i CL del fol·licle dominant no drenat a dia 7 en situació de no estrès tèrmic (0 - < 72) i d'estrès tèrmic (1 - ≥ 72) a dia de la inseminació artificial (IA).

MIDA CL dia 7 (Mitjana ± desviació estàndard)(mm)		No estrès tèrmic dia de la IA (0)	Estrès tèrmic dia de la IA (1)
<b>Grup Control: CL funcional</b> (n= 11/18)		19,5 ± 3,86	18,72 ± 4,94
Grup Drenatge (bilaterals)	<b>CL del fol·licle drenat</b> (n=3/6)	6,66 ± 0,57	11,83 ± 6,76
	<b>CL del fol·licle dominant no drenat</b> (n=5/6)	13 ± 5,51	14,75 ± 4,62

Respecte a la valoració de la vascularització amb ecografia Doppler a dia 21 post-IA, malgrat les quatre classes de vascularització, finalment es van agrupar en poca vascularització, format per la classe 0 i 1, i en molta vascularització format per la classe 2 i 3. Dins del grup Drenatge la vascularització a dia 21 del CL del fol·licle drenat no va presentar diferències significatives amb la vascularització del CL del fol·licle dominant no drenat, ni pel que fa a poca ni molta vascularització (Taula 7). Comparant els CL del grup Drenatge, tot i tenir una mida poblacional molt petita en aquest estudi, el bloc de poca vascularització estava compost un 60% pel CL del fol·licle drenat i un 40% pel fol·licle dominant no drenat. Mentre que el bloc de molta vascularització estava format principalment pel CL del fol·licle dominant no drenat (83,3%) i el 16,7% restant pel CL del fol·licle drenat.

Comparant la vascularització del grup Control i grup Drenat, no es van trobar diferències significatives entre la vascularització d'ambdós grups (CL funcional del grup Control i CL del fol·licle no drenat del grup Drenatge) (Taula 8).

**TAULA 7:** Descripció de la vascularització de les vaques bilaterals del grup Drenatge respecte al cos luti (CL) del fol·licle drenat i el CL del fol·licle dominant no drenat.

<b>VASCULARITZACIÓ</b> del grup Drenatge	CL del fol·licle drenat (n=4)	CL del fol·licle dominant no drenat (n=7)
<b>Poca vascularització</b> (0 i 1)	3 (75%)	2 (28,6%)
<b>Molta vascularització</b> (2 i 3)	1 (25%)	5 (71,4%)

**TAULA 8:** Descripció de la vascularització del cos luti (CL) funcional del grup Control i el CL del fol·licle dominant no drenat de les vaques bilaterals del grup Drenatge.

<b>VASCULARITZACIÓ</b>	Grup Control CL funcional (n= 26)	Grup Drenatge CL del fol·licle dominant no drenat (n= 7)
<b>Poca vascularització</b> (0 i 1)	10 (38,5%)	2 (28,6%)
<b>Molta vascularització</b> (2 i 3)	16 (61,5%)	5 (71,4%)

Tenint en compte els resultats sobre la mida dels CL del grup Drenatge: CL del fol·licle drenat i CL del fol·licle dominant no drenat, tant a dia 7 com a dia 21, hi van haver diferències significatives entre ells, la mida del CL del fol·licle dominant no drenat va ser significativament major que la mida del CL del fol·licle drenat. Pel que fa a la vascularització, no hi van haver diferències significatives entre els CL.

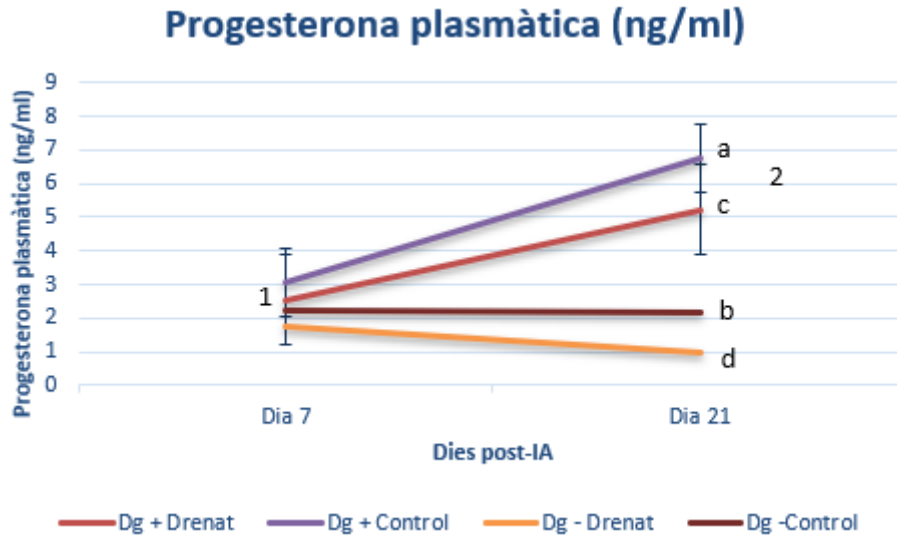
## 4.2 Progesterona plasmàtica

La p4 plasmàtica va ser analitzada a dia 7 i dia 21 post-IA pels dos grups de l'estudi (grup Control i grup Drenatge). La mitjana de p4 plasmàtica pel grup Control va ser de  $2,52 \pm 1,95$  i  $3,80 \pm 3,52$  ng/ml a dia 7 i dia 21 post-IA respectivament, pel grup Drenatge les concentracions van ser de  $2,07 \pm 1,21$  i  $2,66 \pm 2,69$  ng/ml, respectivament. Els resultats obtinguts van reportar que no hi havia diferències significatives entre les concentracions de p4 del grup Control i el grup Drenatge ni a dia 7 ni a dia 21 post-IA. Respecte a l'evolució de la concentració de p4 al llarg de l'estudi de cadascun dels grups, de dia 7 a dia 21 post-IA, no es van reportar diferències significatives en el grup Drenatge, mentre que en el grup Control es va trobar una tendència (p-valor=0,09) a l'augment de p4 plasmàtica de dia 7 a dia 21.

Per una banda, pel que fa a les concentracions de p4 plasmàtica entre el grup Control i grup Drenatge davant dels possibles resultats del diagnòstic de gestació a dia 28 (positiu o negatiu) no es varen trobar diferències significatives entre grup Control i Drenatge ni quan el diagnòstic de gestació va ser positiu, ni quan va ser negatiu.

Per altra banda, es va analitzar les concentracions de p4 del grup Control i grup Drenatge entre si el resultat del diagnòstic de gestació havia sigut positiu o negatiu. A dia 7 les concentracions de p4 no presentaven diferències significatives entre el diagnòstic de gestació positiu i el negatiu en cap dels dos grups. A dia 21 hi havia diferències significatives (p-valor=0,000 per ambdós grups) tant en el grup Control com en el grup Drenatge, segons si el diagnòstic de gestació havia sigut positiu o negatiu. En ambdós grups, a dia 21 post-IA, quan el diagnòstic de gestació positiu les concentracions de p4 eren significativament majors que quan era negatiu.

Pel que fa a l'evolució de les concentracions de p4 de dia 7 a dia 21 post-IA en funció del resultat del diagnòstic de gestació, quan el diagnòstic de gestació havia sigut negatiu no hi havia diferències significatives entre els dies, ni al grup Control ni al grup Drenatge. Però, quan el diagnòstic de gestació havia sigut positiu, en ambdós grups es va reportar un increment significatiu (p-valor=0,018 grup control)(p-valor=0,003 grup drenat) entre la p4 de dia 7 a dia 21 (Figura 7).



**FIGURA 7:** Evolució de la progesterona plasmàtica (p4) a dia 7 i dia 21, pel grup Control i grup Drenatge en funció del diagnòstic de gestació a dia 28. Les diferents lletres dins del dia 21 denoten diferències significatives entre el diagnòstic de gestació positiu (+) i negatiu (-) en el grup Control i Drenatge, test ANOVA (p-valor= 0,00). Els diferents números denoten diferències significatives detectades entre el dia 7 i dia 21 pel test ANOVA (p-valor= 0,018 i 0,003 respectivament) en diagnòstics de gestació positius pel grup Control i Drenatge.

### 4.3 Fertilitat post-drenatge

Al llarg de l'estudi, 18 vaques (36,7%) de les 49 vaques que formaven la població total inseminada de l'estudi van quedar gestants: 10 vaques del grup Control i 8 del grup Drenatge. La gestació doble no es va registrar en cap vaca del grup Control ni del grup Drenatge.

Pel que fa als paràmetres reproductius analitzats, la fertilitat, les diagnòstics de gestació positius a dia 28, les pèrdues gestacionals fins a dia 60 i la taxa de concepció no van presentar diferències significatives entre el grup Control i el grup Drenatge (Taula 9).

**TAULA 9:** Resultats reproductius: diagnòstics de gestació positius a dia 28, fertilitat, pèrdues gestacionals fins a dia 60 i taxa de concepció pel grup Control i grup Drenatge.

RESULTATS REPRODUCTIUS	Grup Control (n=29)	Grup Drenatge (n=20)
<b>Diagnòstics de gestació + (dia 28)</b>	10	8
<b>Fertilitat</b>	34,4%	40%
<b>Pèrdues gestacionals fins a dia 60</b>	7 (24,1%)	0
<b>Taxa de concepció</b>	10/26 = 38,4%	8/13= 61,5%

## 5. DISCUSSIÓ

La tècnica de drenatge del fol·licle subordinat amb vaques amb mínim 2 fol·licles a dia de la IA va ser una eina útil per a prevenir les gestacions dobles en el present estudi, d'acord amb els resultats d'anteriors estudis que havien utilitzat aquesta tècnica o similars (López-Gatius and Hunter, 2017b ; López-Gatius et al., 2019). Un 76,9% de les vaques bilaterals drenades van desenvolupar estructura luteal del fol·licle drenat a dia 7 post-IA, seguint la tendència dels altres estudis. Tot i tenir una mida poblacional petita i haver-hi moltes variacions entre els individus, la p4, la vascularització i la mida van ser molt semblants entre grup Control i grup Drenatge.

La tècnica utilitzada en el present estudi, pels procediments que la caracteritzen, sembla ser menys traumàtica que la resta de tècniques realitzades fins al moment per a intentar reduir les gestacions dobles en la vaca gestant. A més a més, cal tenir en compte que la resta de tècniques incrementen el risc de pèrdua de gestació en vaques amb gestació doble, a diferència de la tècnica present. La tècnica de punció fol·licular sembla ser aplicable tant a vaques dobles bilaterals com unilaterals. El drenatge en lloc de la succió simplifiquen la realització de la tècnica i possibiliten poder fer la tècnica sol i a ritme de visita veterinària normal (López-Gatius and Hunter, 2017b).

El fet que l'estudi es realitzi tan en estació freda com en estació càlida, fa que els resultats obtinguts ens aportin una visió general de la tècnica i les seves repercussions a nivell reproductiu, minimitzant l'efecte ambiental. Tenint en compte que a l'estació càlida i amb situacions d'estrès tèrmic la fertilitat, entre d'altres paràmetres productius i reproductius, es veu afectada negativament (López-Gatius 2012). Respecte a l'efecte del THI, en el present estudi no es va trobar diferències significatives en la mida dels CL. Aquest resultat podria deures a la reduïda mida poblacional de l'estudi, ja que diversos estudis reporten que el THI per sobre 72 sol provocar disminucions de mida tan a nivell fol·licular com luteal (Schüller et al., 2017 ; Jakree et al., 2020).

A nivell reproductiu, aquest procediment no afectava significativament la fertilitat augmentant la incidència d'estructures luteals. Però, l'elevat risc de fallada de l'ovulació del fol·licle dominant que provocava suggereix que el procediment de drenatge podria perjudicar els resultats reproductius els primers 7 dies post-IA. Aquest risc es deu al fet que a l'hora de punccionar a dia de la IA és difícil saber amb certesa quin dels fol·licles serà el que ovularà. Tot i que per afavorir la possibilitat de la doble ovulació només es van incloure a l'estudi vaques amb mínim dues estructures fol·liculars iguals o majors a 12 mm, en quals el risc de fallada de l'ovulació disminueix

clarament (Vasconcelos et al. 2010 ; Pandey et al., 2018), el 15,4% (2/13) de les vaques drenades no van ovular. A més a més, en el present estudi es va complementar la tècnica amb un pla hormonal tenint en compte que alguns estudis afirmen que el tractament amb GnRH o hCG en el moment de la IA millora el procés d'ovulació del fol·licle dominant (López-Gatius et al. 2019), per a poder compensar el risc de la tècnica i fer-la viable a nivell de camp. La resposta del tractament hormonal es reflecteix clarament en les vaques unilaterals drenades de l'estudi (28,6%) (2/7) en les quals se'ls va desenvolupar nous fol·licles a l'ovari contralateral al drenatge a dia 7, no presents a dia 0.

Seguidament es tracta la funcionalitat dels CL formats pel que fa la mida i la vascularització. Respecte a la mida luteal, la major mida mitjana del CL del grup Control respecte al CL del grup Drenatge a dia 7 post-IA es deu al fet que la presència de més nombre de CL a un ovari fa que la mida d'aquests sigui menor. Aquest fet és el que passa en el grup Drenatge, en el qual la majoria dels animals tenen dues estructures luteals en un ovari i conseqüentment la mida del CL del fol·licle dominant no drenat és menor. En canvi, a dia 21 post-IA, no es van trobar diferències significatives entre el CL del grup Control i el CL del fol·licle dominant no drenat del grup Drenatge, el que reflecteix que la tècnica de drenatge no acaba penalitzant la mida i per tant la seva funcionalitat. El CL del fol·licle drenat sempre va presentar una mida menor que la resta, degut a que es forma a partir d'una proporció de cèl·lules de granulosa que es queden al fol·licle i acaben desenvolupant posteriorment teixit luteal (López-Gatius et al., 2019).

A nivell de vascularització, l'ecografia en Doppler va resultar ser una eina valuosa per avaluar la funció luteal del CL induït per drenatge. No es van trobar diferències significatives entre la vascularització dels CL del grup Control i el CL del fol·licle dominant no drenat del grup Drenatge, el que indicaria que la tècnica no penalitza la funcionalitat del CL ovulatori a nivell de vascularització. Pel que fa la vascularització del CL del fol·licle no puncionat, malgrat i que no va presentar diferències significatives amb el CL del fol·licle puncionat, semblaria que presenta en general poca vascularització. Aquest fet es esperable com a conseqüència de que aquest CL és resultat d'una proporció de cèl·lules, com s'ha comentat anteriorment. De totes maneres es necessarien més estudis per a poder treure conclusions respecte a aquest paràmetre, ja que la població drenada amb CL valorable amb Doppler a dia 21 va ser molt petita.

Les concentracions de p4 plasmàtica van ser iguals pels dos grups, per tant la tècnica de drenatge no provoca nivells subòptims que es relacionen amb majors pèrdues embrionàries (Lamming et al., 1989 ; Karen et al., 2014 ; Gábor et al., 2016). La importància dels nivells de p4 recau en que cal tenir nivells suficients de p4 plasmàtica per a convertir l'úter a un entorn adequat per afavorir el desenvolupament embrionari (Spencer et al., 2004). Davant d'un mateix resultat del diagnòstic de gestació a dia 28 no es van trobar diferències significatives entre ambdós grups, el que reafirma que el drenatge no perjudica el manteniment de la gestació. A més a més, encara que no fos l'objectiu de l'estudi, es va reportar que les concentracions de p4 a dia 21 post-IA podrien ser una eina encarada a fer un diagnòstic de gestació més precoç d'acord amb resultats d'estudis anteriors (López-Gatius et al., 2019).

Com a conclusió general, la punció i el drenatge dels fol·licles subordinats a dia de la IA donen lloc a uns CL funcionals pel que fa la mida, vascularització i concentracions de p4 plasmàtica; sense afecta negativament a la fertilitat del ramat, tot i tenir major fracàs ovulatori. Per tant, les estructures luteals funcionals del fol·licle drenat poden reduir el risc posterior de pèrdua de gestació durant el primer trimestre de gestació, d'acord amb estudis anteriors que reportaven que la presència d'un major nombre de CL que de nombre d'embrions actuaven com a factor per a promoure el manteniment de la gestació (López-Gatius, 2012; López-Gatius and Hunter, 2017b).



## 6. CONCLUSIONS

Respecte als CL formats durant l'estudi, a dia 7 post-IA la mida mitjana del CL del grup Control va ser significativament major que la mida dels CL de les vaques bilaterals del grup Drenatge (CL dels fol·licles drenats i CL dels fol·licles dominants no drenats). Dins del grup Drenatge la mida del CL dels fol·licles dominants no drenats va ser significativament major que la dels CL dels fol·licles drenats.

A dia 21 no van haver-hi diferències significatives entre la mida mitjana del CL del grup Control i els CL de les vaques bilaterals del grup Drenatge (CL dels fol·licles drenats i CL dels fol·licles dominants no drenats). Dins del grup Drenatge, la mida dels CL dels fol·licles dominants no drenats va ser significativament major que la dels CL dels fol·licles dominants drenats.

Pel que fa a la vascularització, no es van reportar diferències significatives entre els CL formats en les vaques bilaterals del grup Drenatge, ni diferències significatives entre la vascularització del CL del grup Control i el CL dels fol·licles dominants no drenats del grup Drenatge.

En les concentracions de p4 plasmàtica no van haver-hi diferències significatives entre ambdós grups ni a dia 7 ni a dia 21 post-IA. Es va trobar una tendència d'augment de les concentracions de p4 de dia 7 a dia 21 en el grup Control. Concretament, no es van trobar diferències significatives entre la p4 d'ambdós grups ni quan el diagnòstic de gestació era positiu ni negatiu. Els diagnòstics de gestació positius a dia 28 tenien nivells de p4 a dia 21 significativament majors que els diagnòstics negatius, en ambdós grups. A més a més, els diagnòstics positius tenien un augment significatiu de p4 de dia 7 a dia 21.

No es varen reportar diferències significatives en els paràmetres reproductius entre ambdós grups i cap dels animals de l'estudi va desenvolupar gestació doble.

Finalment es conclou que la tècnica de drenatge fol·licular, tot i tenir un major risc de fracàs ovulatori, és una bona tècnica per a reduir les gestacions dobles a les explotacions actuals de boví de llet sense perjudicar els paràmetres reproductius (fertilitat, pèrdues de gestació i taxa de concepció). Aconseguir la formació de CL funcionals pel que fa a la mida, vascularització i concentració de p4 plasmàtica. Els tractaments hormonals podrien ser la millor tècnica per contrarestar els punts febles de la tècnica. De totes maneres, caldria realitzar més estudis amb la tècnica del drenatge fol·licular per a poder treure més conclusions.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Andreu-Vázquez, C., Garcia-Ispuerto, I., Lopez-Bejar, M., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., and Lopez-Gatius, F., 2011. Clinical implications of induced twin reduction in dairy cattle. *Theriogenology* 76, 512–521.
- Andreu-Vázquez, C., Garcia-Ispuerto, I., Ganau, S., Fricke, P.M., and López-Gatius, F., 2012a. Effects of twinning on the subsequent reproductive performance and productive lifespan of high-producing dairy cows. *Theriogenology* 78, 2061–2070.
- Andreu-Vázquez, C., Garcia-Ispuerto, I., López-Gatius, F., 2012b. Manual rupture versus transvaginal ultrasound-guided aspiration of allanto-amniotic fluid in multiple pregnancies: a clinical approach to embryo reduction in dairy cattle. *J. Reprod. Dev.* 58, 420–424.
- Andreu-Vázquez, C., Garcia-Ispuerto, I., López-Gatius, F., 2012c. Photoperiod length and the estrus synchronization protocol used before AI affect the twin pregnancy rate in dairy cattle. *Theriogenology* 78, 1209-1216
- Bech-Sàbat, G., García-Ispuerto, I., Yániz, J., and López-Gatius, F., 2010. Therapeutic approaches to pregnancy loss of non-infectious cause during the late embryonic/early foetal period in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 45 (Suppl. 3), e469–e475.
- Bollwein, H., Heppelmann, M., Lüttgenau, J., 2016. Ultrasonographic Doppler: Use for Female Reproduction Management. *Vet Clin Food Anim.* 32 149–164.
- Camargo, O., 2012. La vaca lechera: entre la eficiencia económica y la ineficiencia biológica. *Arch. Zootec.* 61 (R): 13-29.
- Del Río, N.S., Stewart, S., Rapnicki, P., Chang, Y.M., and Fricke, P. M., 2007. An observational analysis of twin births, calf sex ratio, and calf mortality in holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90 101, 1255–1264.
- Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació (DARP) 2019. Dades conjunturals del sector boví lleter a Catalunya. Document tècnic mensual, 23.
- Fricke, P. M., 2001. Twinning in Dairy Cattle. *Animal Science.* 17, 61–67.
- Gábor G., Kastelic J.P., Abonyi-Tóth Z., Gábor P., Endrodi T., and Balogh OG., 2016. Pregnancy loss in dairy cattle: relationship of ultrasound, blood pregnancy-specific protein B, progesterone and production variables. *Reprod Domest Anim.* 51, 467-473.
- Gustavo, B., Eloy, S., Alejandra Arias, C., 2015. Lactancia: Pico y persistencia ¿por qué cuidarlos.

INTA. EEA Rafaela, 1-3.

Hernández Cerón, J., 2006. Manejo reproductivo en bovino en sistemas de producción de leche. Facultad de Medicina y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Capítulo 3.

Herzog, K., Bollwein, H., 2007. Application of doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 51–58.

Herzog, K., Voss, C., Kastelic, J. P., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., and Bollwein, H., 2011. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology* 75, 549–554.

Jakree, J., Moonmaneea, B., Sudwand, P., Rakthan, M., Osathanunkul, M., and Chaikol, W., 2020. Associations among thermal biology, preovulatory follicle diameter, follicular and luteal vascularities, and sex steroid hormone concentrations during preovulatory and postovulatory periods in tropical beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 213, 106281.

Karen A., Bajcsy AC., Minoia R., Kovacs R., de Sousa NM., Beckers JF., Tibold J., Mdl I., and Szenci O., 2014. Relationship of progesterone, bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 and nitric oxide with late embryonic and early fetal mortalities in dairy cows. *J Reprod Dev.* 60, 162–167.

Kaya, S., Kaçar, C., Polat, B., Çolak, A., Kaya, D., Gürçan, S., Bollwein, H., and Aslan, S., 2016. Association of luteal blood flow with follicular size, serum oestrogen and progesterone concentrations, and the inducibility of luteolysis by PGF<sub>2</sub>α in dairy cows. *Theriogenology* 87, 167-172.

Lamming, G.E., Darwash, A.O., Back, H.L., 1989. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J Reprod Fertil Suppl.* 37, 245–52.

López-Gatius, F., 2012. Factors of a nininfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lacting dairy cows. A review. *Theriogenology* 77, 1029–1041.

López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., 2010. Ultrasound and endocrine findings that help to assess the risk of late embryo/early foetal loss by non-infectious cause in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 45 (Suppl. 3), 15–24.

López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., 2005. Spontaneous reduction of advanced twin embryos: its occurrence and clinical relevance in dairy cattle. *Theriogenology* 63, 118–125.

- López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., 2016. Twin reduction by PGF2 $\alpha$  intraluteal instillation in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 940–944.
- López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., 2017a. From pre-ovulatory follicle palpation to the challenge of twin pregnancies: clinical reflections following one million gynaecological examinations in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 52 (Suppl. 4), 4–11.
- López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., 2017b. Puncture and drainage of the subordinate follicles at timed artificial insemination prevents the risk of twin pregnancy in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 213–216.
- Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J., Garbayo, J., and Hunter, R.H.F., 2004. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 429–433.
- López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Hunter, R.H.F., 2010. Factors affecting spontaneous reduction of corpora lutea and twin embryos during the late embryonic/early fetal period in multiple-ovulating dairy cows. *Theriogenology* 73, 293–299.
- López-Gatius, F., Andreu-Vázquez, C., Mur-Novales, R., Cabrera, V.E., and Hunter, R.H.F., 2017. The dilemma of twin pregnancies in dairy cattle. A review of practical prospects. *Liv. Sci.* 197, 121–126.
- López-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Serrano-Pérez, B., and Hunter, R.H.F., 2018. The presence of two ovulatory follicles at timed artificial insemination influences the ovulatory response to GnRH in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 120, 91–97.
- López-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Serrano-Pérez, B., Balogh, O.G., Gábor, G., and Hunter, R.H.F., 2019. Luteal activity following follicular drainage of subordinate follicles for twin pregnancy prevention in bi-ovular dairy cows. *Research in Veterinary Science* 124, 439–443.
- Lüttgenau, J., Ulbrich, S. E., Beindorff, N., Honnens, A., Herzog, K., and Bollwein, H., 2011. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Animal Reprod. Sci.* 125(1–4), 20–29.
- Mur-Novales, R., López-Gatius, F., Fricke, P.M., and Cabrera, V.E., 2017. An economic evaluation of management strategies to mitigate the negative effect of twinning in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 101, 8335–8349.

- Pandey, A.K., Ghuman, S.P., Dhaliwal, G.S., Honparkhe, M., Phogat, J.B., Kumar S., 2018. Effects of preovulatory follicle size on estradiol concentrations, corpus luteum diameter, progesterone concentrations and subsequent pregnancy rate in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 107, 57-62.
- Pugliesi, G., Dalmaso de Melo, G., Silva, J. B., Carvalhêdo, A. S., Lopes, E., de Siqueira Filho, E., and Binelli, M., 2019. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 135, 73–79.
- Risco, C., Melendez, P., 2011. *Dairy Production Medicine*. Wiley-Blackwell. 99-116.
- Rodríguez-Martínez, H., Hultgren, J., Bage, R., Bergqvist, A.S., Svensson, C., Bergsten, C., Lidfors, L., Gunnarsson, S., Algers, B., Emanuelson, U., Berglund, B., Andersson, A., Haard, M., Lindhé, B., Stalhammar, H., and Gustafsson, H., 2009. Reproductive performance in high-producing dairy cows : Can we sustain it under current practice ?. Engormix. Dept of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University.
- Schüller, L.K., Michaelis, I., Heuwieser, W., 2017. Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. *Theriogenology* 102, 48-53.
- Silva-del-Río, N., Colloton, J.D., Fricke, P.M., 2009. Factors affecting pregnancy loss for single and twin pregnancies in a high-producing dairy herd. *Theriogenology* 71, 1462–1471.
- Silva-del-Río, N., Fricke, P. M., Grummer, R. R., 2010. Effects of twin pregnancy and dry period feeding strategy on milk production, energy balance, and metabolic profiles in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 1048–1060.
- Siqueira, L.G.B., Torres, C.A.A., Amorim, L.S., Souza, E.D., Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., and Viana, J.H.M., 2009. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 18-28.
- Skenandore, C.S., Pineda, A., Bahr, J.M., Newell-Fugate, A.E., and Cardoso, F.C., 2017. Evaluation of a commercially available radioimmunoassay and enzyme immunoassay for the analysis of progesterone and estradiol and the comparison of two extraction efficiency methods. *Domest. Anim. Endocrinol.* 60, 61-66.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., and Bazer, F.W., 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod.* 71, 2–10.

Vasconcelos, J.L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G. and Wiltbank, M.C., 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56, 307-314.

Viana, J.H., Arashiro, E.K., Siqueira, L., Ghetti, A.M., Areas, V., Guimarães, C., and Fernandes, C., 2013. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. *Anim. Reprod.*(Vol. 10).

Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Sangsritavong, S., Sartori, R., and Ginther, O. J., 2000. Symposium: Physiology, location, and reproduction mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* (Vol. 83).

## 8. ANNEX

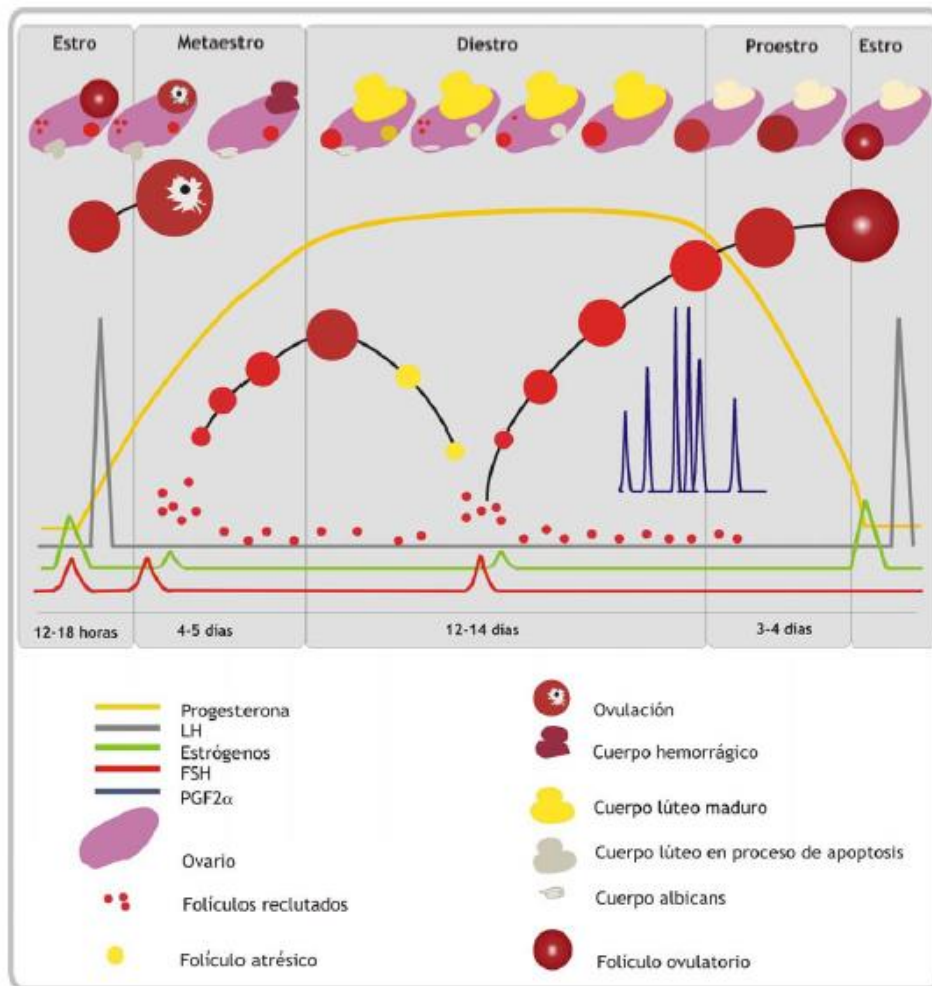
### 8.1 Cicle reproductiu

La vaca és un mamífer d'ovulació espontània que se sotmet al cicle estral uterí-dependent fins que es queda gestant. Quan no es produeix la gestació l'endometri secreta PGF2 $\alpha$  que produirà la regressió del CL de l'ovari (López-Gatius and García-Ispuerto, 2010).

#### 8.1.1 Cicle estral

El cicle estral es divideix en quatre etapes, les quals es troben en la il·lustració de la figura 8, en la qual es veuen els nivells hormonals que hi intervenen i els canvis ovàrics que es produeixen:

- ESTRE: Etapa en què la vaca accepta la monta, a causa de l'increment significatiu de les concentracions d'estradiol produït per un fol·licle preovulatori i per l'absència de CL. La femella està inquieta, té una major activitat, interactua, a més a més presenta turgència de l'úter, edema dels genitals externs i producció de moc cervical. La duració de l'estre és de 12-18 hores. L'inici d'aquesta etapa té una relació temporal amb la secreció ovulatòria de LH (pic de LH), ja que els estrògens el desencadenen. L'inici de l'estre i el pic de LH poden passar simultanis o al cap de 2-6 hores es produeix el pic. L'ovulació es produeix al cap de 28-30 hores del pic LH o 30-36 hores després de l'inici de l'estre.
- METAESTRE: La duració és de 4-5 dies. En aquesta etapa es produeix l'ovulació i es desenvolupa el CL. Després de l'ovulació es produeix l'aparició del cos hemorràgic i la formació del CL posteriorment. Les concentracions de p4 s'incrementen fins a nivells majors de 1 ng/ml, que corresponen a CL madur. A més a més, es presenta un pic postovulatori de FSH que sol provocar un sangrat.
- DIESTRE: Etapa que presenta una major duració, entre 12 i 14 dies. En aquesta etapa el CL està funcional i provoca nivells elevats de p4. També s'observen onades de desenvolupament fol·licular. Als 12-14 dies de l'inici de secreció de p4 l'endometri secreta PGF2 $\alpha$ , aquesta última hormona provoca la destrucció del CL i la fi del diestre. En cas que la femella estigui gestant, l'embrió secretarà interferó-t que bloqueja la secreció de PGF2 $\alpha$  i permet el manteniment del CL.
- PROESTRE: La duració és de 2-3 dies i es caracteritza per l'absència de CL funcional amb el desenvolupament i maduració del fol·licle ovulatori. Incrementa la freqüència de pulsos de LH que provoquen la maduració final del fol·licle ovulatori, el qual produirà un augment d'estradiol. Quan els nivells d'estradiol arriben al màxim es produeix l'estre i el pic de LH preovulatori (Hernández, 2006.).



**FIGURA 8:** Canvis ovàrics i hormonal durant el cicle estral de la vaca. Font: Hernández, 2006.

### 8.1.2 Desenvolupament fol·licular i del cos luti

La femella bovina neix aproximadament amb 200.000 fol·licles primordials, dels quals molt pocs iniciaran el seu creixement en algun moment de la seva vida. El fol·licle és l'estructura que conté l'ovòcit, un cop es produeix l'ovulació allibera l'ovòcit per a ser poder ser fecundat per l'espermatozoide. El creixement dels fol·licles té dues etapes: l'etapa basal i l'etapa tònica. La primera inclou el desenvolupament del fol·licle des de les primeres etapes fins a arribar a 3-4 mm de diàmetre. La segona etapa va partir de 3-4 mm de diàmetre fins que es converteix en pre-ovulatori i es presenta en forma d'onades constituïdes per fases de reclutament, selecció, dominància i atrèsia. Durant el cicle estral la vaca pot presentar 2 o 3 onades fol·liculars.

Les onades fol·liculars comencen gràcies a un augment de FSH, el que promou el creixement de 5-6 fol·licles antrals (3-4 mm de diàmetre), el que seria el reclutament. Seguidament, un fol·licle és el que continua creixent (fol·licle dominant) i es separa del grup, el que correspondria a la selecció i desviació, mentre que la resta que serien els subordinats, s'atresien. El fol·licle



dominant suprimeix la secreció de FSH, que inhibeix el creixement de la resta de fol·licles, mentre ell pot continuar creixent a l'adquirir receptors de LH. Tot i això, alguns fol·licles subordinats segueixen creixent, el que produiria la presència de dos o més fol·licles ovulatoris al moment de la IA. La seva dominància durarà 4-6 dies, si no ovula, s'atresiarà i permetrà un augment de les concentracions de FSH i l'inici d'una nova onda fol·licular. En cas contrari, si continua la seva maduració, produirà nivells suficients d'estrògens que provocaran augment de GnRH, el qual desencadenarà el pic de LH, responsable de l'ovulació i la luteïnitació del fol·licle a CL. El CL als dos dies ja sintetitza p4 i al 5è dia ja té plena funcionalitat (Hernández, 2006).

En vaques i dones amb gestacions dobles hi ha un increment del reclutament fol·licular i el creixement, pel que augmenta la taxa d'agermanament en tenir més fol·licles ovulatoris. Ovulacions dobles naturals resulten de la formació simultània de dos fol·licles codominants (ovulatoris) al mateix ovari o d'un fol·licle a cada ovari dins d'una ona fol·licular, el qual es produeix quan s'altera la selecció fol·licular i dos o més fol·licles dins d'una ona són dominants (Kulick et al., 2001 ; López-Gatius et al., 2018).

### 8.1.3 Pèrdues embrionàries

La pèrdua fetal precoç s'està convertint en la complicació més freqüent en les gestacions de vaques lleteres de gran producció a Espanya, on més del 90% de les pèrdues després del diagnòstic de gestació solen produir-se abans del dia 90 de gestació. Les gestacions dobles en són un dels principals factors relacionats en explotacions de gran producció (López-Gatius et al., 2010).

Tot i que la majoria de pèrdues es donen en el període embrionari precoç, el risc en el període embrionari tardà/fetal precoç està incrementant (Bech-Sàbat et al., 2010). El període embrionari de la gestació s'estén des de la concepció fins al final de l'etapa de diferenciació (aproximadament 42 dies), i el període fetal s'estén des del dia 42 fins al part (López-Gatius and Hunter, 2005). En les vaques el procés de placentació acaba abans del dia 60 de gestació, després la gestació està firmament establerta i els canvis de pèrdues fetals són reduïts. (López-Gatius et al., 2010). Tot i això, en el cas de les gestacions dobles sembla que necessiten un període una mica més llarg per tal d'establir la gestació, el qual arriba fins al dia 90 (Bech-Sàbat et al., 2010). Per tant, des d'una perspectiva pràctica, els diagnòstics addicionals d'embaràs als dies 60 i 90 després de la inseminació han de ser inclosos en programes de gestió rutinària per detectar la pèrdua fetal precoç (Lopez-Gatius et al., 2004).

#### 8.1.4 Progesterona

Les concentracions plasmàtiques de p4 afecten tant la supervivència del concepte com el creixement precoç de l'embrió, en la implantació i la placentació. Per tant, els nivells de p4 a la setmana cinc s'han correlacionat amb el manteniment de la gestació. Fet que porta a pensar que una de les causes de la pèrdua fetal precoç en alta vaques d'elevada producció podria ser una concentració subòptima de p4, per un augment del catabolisme de la p4 o per una funció subluteal. A més a més, durant els períodes en què hi ha més contacte entre concepte i cèl·lules immunes maternes, la p4 actua com un "immunosteroide". Aquest fet és clau per l'èxit de gestació, modula la immunitat de la gestació, ja que la mucosa uterina tolera l'embrió alògic sense comprometre els seus mecanismes immunològics en contra agents microbis (Bech-Sàbat et al., 2010).

#### 8.2 Cicle productiu

Les vaques de llet es comencen a cobrir al voltant dels 15 mesos de vida amb l'objectiu d'aconseguir el primer part als 2 anys de vida. La lactància s'inicia amb el part, pel que la producció de llet depèn exclusivament de la gestació. La vaca es queda gestant mentre està produint i al voltant de dos mesos abans del part, es seca.

La corba de lactància representa la producció de llet al llarg del cicle productiu i sol durar 305 dies, pel que el secat sol ser de 60 dies. El pic de lactància és el nivell més alt de producció de llet, en el qual la vaca arriba dins dels primers 90 dies de lactació. En general, a partir del part la producció incrementa ràpidament fins a arribar al pic, posteriorment descendeix gradualment fins a arribar al final de la lactància. Amb la millora genètica s'ha tendit al fet que la fase de descens sigui més gradual, pel que la vaca té persistència d'una elevada producció durant llargs períodes del cicle, de totes maneres molts factors hi estan relacionats. A més a més, a conseqüència de què l'energia que s'excreta per la llet supera l'energia consumida, la vaca entra en un estat de balanç energètic negatiu fins al pic de lactació. Aquest estat correspon al fet que la vaca no pot menjar suficient per a cobrir les seves necessitats, pel que mobilitzarà reserves. Aquest és un procés inevitable de magnitud variable (Gustavo et al., 2015) .

Les dades reals a Catalunya, recollides de FEFRIC del 2018, l'interval mitjà entre parts va ser de 421 dies amb un interval part-fecundació de 136 dies. La durada mitjana de lactació va ser de 358 dies amb 63 dies d'eixutes. Pel que fa als quilograms de llet per vaca present i dia van ser de 28,8 amb un % de greix del 3,61% i 3,33% de proteïna (DARP, 2019).