

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



TASA DE PREÑEZ EN VACAS HOLSTEIN APLICANDO DOBLE  
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN SEXADO O CONVENCIONAL  
SUJETAS A ESTRÉS POR CALOR

Tesis

Que presenta LUCÍA MONSERRAT TREVIÑO RUIZ  
como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

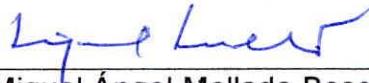
Torreón, Coahuila

Julio 2023

TASA DE PREÑEZ EN VACAS HOLSTEIN APLICANDO DOBLE  
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN SEXADO O CONVENCIONAL  
SUJETAS A ESTRÉS POR CALOR

Tesis

Elaborada por LUCÍA MONSERRAT TREVIÑO RUIZ como requisito parcial  
para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria  
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque  
Director de tesis



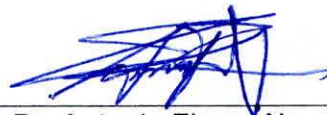
Dr. José Eduardo García Martínez  
Asesor



Dr. Jesús Alberto Mellado Bosque  
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno  
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda  
Subdirector de Postgrado

## **Agradecimientos**

Al personal del establo lechero “La Victoria”, por brindarnos toda la información de su manejo reproductivo en la granja para poder hacer posible este trabajo.

A la revista *Reproduction in Domestic Animals* por publicar el artículo “Fertility of Holstein cows and heifers submitted to timed artificial insemination and receiving one or two doses (12 h apart) of semen” derivado de este trabajo de investigación, así como al Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque y al Dr. José Eduardo García Martínez, por haber hecho posible esta publicación, por aceptarme una vez más como su asesora y haber sido parte de mi formación académica.

A la UAAAN por proporcionar los fondos necesarios para este estudio.

Estos dos años de maestría pasé por momentos muy difíciles que jamás pensé que pasarían así que gracias al Dharma, a mi madre Karla Lucía Ruiz Martínez, a mi hermana Karla Stephanie Treviño Ruiz, a mi abuelita Luz Guadalupe Martínez Gómez, a mis amigos Denisse, Omar, Claudio, Gino y Jara por haber estado ahí conmigo en todos los días de mi proceso, por escucharme una y otra vez, darme su hombro en donde llorar y ofrecerme su ayuda y consejos durante estos años.

## Índice

Lista de figuras.....	v
Lista de cuadros.....	vi
Resumen .....	vii
Abstract .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis.....	2
Objetivo.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Importancia del manejo en la reproducción para la producción de leche .....	3
Inseminación artificial (IA).....	5
Ventajas de la inseminación artificial .....	7
Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).....	7
Hormonas utilizadas para la sincronización de celos.....	9
Protocolo de Ovsynch .....	9
Diferencia entre el uso de semen sexado y convencional .....	12
Efecto del estrés por calor .....	13
Doble inseminación artificial .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
Descripción del área de estudio y manejo de animales.....	16
Manejo reproductivo .....	17
Diseño experimental y registro de la temperatura.....	17
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS.....	20

Análisis de Resultados para vacas multíparas.....	20
Análisis de Resultados para vacas primíparas.....	22
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIÓN.....	28
REFERENCIAS .....	29

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Organización de grupos para diseño experimental.....	17
Cuadro 2. Categorías para indicar el grado de estrés por calor .....	18
Cuadro 3. Tasa de preñez en vacas multíparas con simple o doble IA con diferentes niveles de estrés por calor al momento del primer servicio.....	20
Cuadro 4. Diferencia de fertilidad entre las vacas multíparas con doble IA que recibieron la primera inseminación en la mañana o en la tarde.....	22
Cuadro 5. Efecto de una o doble IA con diferente tipo de semen (convencional o sexado) y su interacción con el nivel de estrés por calor en vacas primíparas.....	22
Cuadro 6. Diferencia de P/IA entre las vacas primíparas con doble IA que recibieron primer servicio por la mañana o en la tarde.....	24

## Lista de figuras

Figura 1. Protocolo de Ovsynch. Fuente: Morales y Cavestany (2012) .....	11
Figura 2. Inseminación siguiendo el protocolo AM-PM. Fuente: Elaboración propia.....	14
Figura 3. Relación entre el ITH y la tasa de preñez usando una o doble inseminación en vacas multíparas.....	21
Figura 4. Relación entre el índice de temperatura- humedad y la tasa de preñez basado en una o doble IA en vacas primíparas; la figura 4A corresponde a la inseminación usando semen sexado y la 4B semen convencional.....	23

## Resumen

Tasa de preñez en vacas Holstein aplicando doble inseminación artificial con semen sexado o convencional sujetas a estrés por calor.

Lucía Monserrat Treviño Ruiz

Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Miguel Ángel Mellado Bosque

-director de tesis-

El objetivo de este estudio retrospectivo fue analizar la tasa de preñez por inseminación artificial (P/IA) en vacas Holstein haciendo una segunda inseminación 12 h después de la primera aplicación para aumentar la fertilidad. Se registraron datos de enero de 2015 a diciembre de 2021, comparando una IA simple ( $n=50,285$ ) contra IA doble ( $n=4,392$ ); vacas primíparas recibieron inseminación con semen sexado o convencional y vacas pluríparas solamente semen convencional. Además, se hizo un análisis de la relación entre el índice de temperatura-humedad (ITH) al momento de la primera IA y la fertilidad de las vacas. Las vacas que recibieron doble inseminación en su zona de confort (ITH  $<68$ ) fue mayor ( $p < 0.05$ ) que las vacas que recibieron una sola IA (42.9% vs. 36.4%). La P/IA en vacas que recibieron doble IA con con estrés por calor severo (ITH  $>82$ ) fue mayor ( $p < 0.05$ ) que las vacas que recibieron una sola IA (21.0% vs. 12.6%). Independientemente del nivel de estrés por calor, aplicar la primera IA en la mañana aumentó ( $p < 0.05$ ) la P/IA en vacas con doble IA en comparación a la primera IA en la tarde (38.4 vs. 33.3%). Con estrés por calor moderado y semen sexado, la P/IA fue mayor (65.0 vs. 51.9%;  $p < 0.05$ ) en vacas que recibieron doble IA que las que recibieron un solo servicio. Se concluyó que la doble IA mejora la fertilidad en vacas en comparación con una sola IA, particularmente cuando las vacas están sujetas a estrés por calor al momento del primer servicio.

Palabras clave: Inseminación artificial, Doble inseminación, Fertilidad, Estrés por calor, Ovsynch



## Abstract

Conception rate in Holstein using two doses of conventional or sexed semen on the cows in a hot environment.

Lucía Monserrat Treviño Ruiz presenta

Master degree in Animal Science

Autonomous Agrarian University Antonio Narro,

Miguel Ángel Mellado Bosque

-Adviser-

The objective of ITHs study was to analyze the pregnancy rate per artificial insemination (P/IA) in Holstein cows using Ovsynch protocol making a second insemination 12 h apart to increase the fertility. Data was recorded from January 2015 to December 2021, comparing IA single (n= 50285) vs double (n= 4392), nulliparous heifers was inseminated with either sex-sorted or conventional semen and pluriparous only conventional semen. Also, ITHs study aimed to investigate the relationship between temperature-humidity index (ITH) and time of the first AI and fertility. Fertility of cows receiving two AI with normothermia (ITH < 68) was higher ( $p < 0.05$ ) than cows receiving a single AI (42.9% vs. 36.4%). P/AI of cows receiving two AI with severe heat stress (ITH > 85) was higher ( $p < 0.05$ ) than cows receiving a single AI (21.0% vs. 12.6%). Regardless of heat stress conditions, applying the first AI in the morning increased ( $p < 0.05$ ) P/AI in cows with double AI than in cows whose first AI occurred in the afternoon (38.4 vs. 33.3%). With moderate heat stress, and sexed-sorted semen, P/AI to timed AI was higher (65.0 vs. 51.9%;  $p < 0.05$ ) in heifers receiving double AI than those serviced once. It was concluded that double AI, 12 h apart, enhanced fertility at timed AI than herd mates with a single AI, particularly with heat stress at breeding.

Keywords: Artificial insemination, Double insemination, Fertility, Heat stress, Ovsynch

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos de la industria lechera es optimizar los recursos económicos, buscando métodos para mejorar la tasa de preñez de las vacas, sin embargo, en los establos lecheros de la Comarca Lagunera se encuentra lejos de alcanzar las metas reproductivas debido a los efectos del estrés por calor (Mellado et al., [2012](#)).

El estrés por calor es un gran desafío para lograr las demandas de lactancia y crecimiento. En vacas Holstein se considera que un índice de temperatura-humedad (ITH)  $< 68$  corresponde a la zona de confort, de 68 a 74 los animales empezaran a tener signos leves de estrés por calor, y un ITH  $\geq 75$  provoca disminuciones drásticas en el rendimiento productivo (Sammad, et al., [2020a](#)).

Las respuestas al estrés por calor por encima de la zona de confort incluyen problemas de alimentación, aumento de la tasa de respiración, jadeo, sudoración, búsqueda de sombra, ingestión de agua frecuente, vasodilatación, disminución en producción de leche y problemas reproductivos (Roth, [2020](#); Sammad, et al., [2020b](#)).

En los programas reproductivos, la regla AM-PM para la inseminación artificial (IA) continúa utilizándose. Sin embargo, se han hecho intentos para refinar esta regla, como la IA con la presencia de moco vaginal claro en la IA (Mellado et al., [2015](#)), la hora del día en que las vacas son inseminadas, extenderse en los días después del parto para la primera IA (Gernand et al., [2019](#)) y el aumento de actividad de las vacas (Holman et al., [2011](#); Bijker et al., [2015](#)), pero en general, estas prácticas de manejo no han resultado en un mejor comportamiento reproductivo.

Una IA después de la ovulación produce un embrión de mala calidad debido a que el ovocito envejece (Brackett et al., [1980](#)), además, los espermatozoides también se deterioran si el servicio de IA se realiza después de la ovulación (Saacke , [2008](#)).

Además, aunque el intervalo desde el inicio del estro hasta la ovulación es aproximadamente 28 h, existe una gran variabilidad (desviaciones estándar de 5 a 6 h) (Diskin, [2018](#)).

Por lo anterior, el uso de la regla tradicional AM-PM puede no proporcionar la mejor tasa de preñez porque algunas vacas probablemente tendrán demasiado tiempo

después del inicio del estro, y las posibilidades de fertilización pueden reducirse (LeRoy et al., [2018](#)).

Por lo tanto, dos IA podría aumentar la tasa de preñez al mejorar la migración de espermatozoides al óvulo, mantener los espermatozoides activos durante el tiempo entre la IA y la ovulación, disminuir la temperatura en el útero y seleccionar los espermatozoides más aptos para la fertilización (López-Gatius, [2000](#)).

### **Hipótesis**

Habrará un aumento de la tasa de preñez por inseminación artificial usando el protocolo de Ovsynch en vacas Holstein independientemente si se aplicara semen sexado o convencional al realizar una doble inseminación con un intervalo de 12 h, incluso en días de intenso calor.

### **Objetivo**

Evaluar de manera retrospectiva el efecto que se tiene sobre la tasa de preñez al inseminar vacas y novillas Holstein una o dos veces (con 12 horas de diferencia) con semen sexado o convencional con diferentes niveles de estrés por calor.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Importancia del manejo en la reproducción para la producción de leche

El manejo reproductivo es fundamental para la toma de decisiones dentro del sistema de producción lechero, descuidar la eficiencia reproductiva repercutirá directamente en los parámetros económicos del establo (Kuhn et al., [2006](#)).

Los parámetros que se deben de tomar en cuenta para el manejo de la reproducción son la fertilidad, el intervalo entre partos, los días abiertos, detección de calores, el primer servicio después del parto (Bijker et al., [2015](#)), con una meta de que las novillas tengan su primer parto a los 24 meses de edad y de ahí en adelante, una cría cada 12 meses logrando que las vacas conciban con menos de dos inseminaciones por lactancia (Córdova et al., [2005](#)).

Hay factores que afectan directamente el porcentaje de preñez por inseminación artificial (P/IA) como lo son las condiciones climáticas en las que se encuentran los animales, el tipo de semen que se usa (sexado o convencional), enfermedades al parto, condición corporal (Mellado et al., [2013](#)).

Las vacas lecheras modernas han sido seleccionadas para una alta producción de leche en la lactancia temprana que se asocia con una capacidad muy alta para movilizar las reservas corporales durante este período. En un estudio de Tamminga et al. ([1997](#)) con 5 unidades de producción utilizando 295 vacas, mostró que estas pueden producir tanto como entre 120 y 550 kg de leche de reservas corporales sobre la base de energía (promedio de 324 kg). La máxima movilización en 8 semanas ascendió a 41.6 kg de peso corporal vacío, 30.9 kg de grasa y 4.6 kg de proteína. La mayoría de las vacas pueden hacer frente con esta carga metabólica que se define como: “el total de carga energética impuesta por la síntesis y secreción de leche, que puede satisfacerse mediante la movilización de las reservas corporales” (Knight, [1999](#)). Sin embargo, el estrés metabólico se define como “la cantidad de carga metabólica que no puede ser sostenida por esta movilización, que conduce a la regulación a la baja de algunos procesos energéticos, incluidos los que mantienen la salud general”. Por lo tanto, la 'sobre' movilización de reservas corporales durante el período de balance negativo de energía (BNE) es un factor clave para la susceptibilidad a enfermedades en el ganado lechero

moderno. Además, el balance energético post parto, la pérdida de condición corporal antes del parto también tiene consecuencias para el estado metabólico y la fertilidad de las vacas (Crowe et al., [2018](#)). Contrarrestar los mecanismos relacionados con el BNE, ayuda a tener una fertilidad exitosa y evita problemas con las primeras lactancias (Garnsworthy et al., [2008](#)).

El sistema reproductivo está influenciado por múltiples hormonas que también están involucradas en lograr una alta producción de leche (por ejemplo la hormona del crecimiento, GH, factor de crecimiento similar a la insulina I, IGF-I y leptina), solo la insulina responde a los cambios en la composición de la ración (Gong et al., [2002](#)). Los folículos ováricos contienen receptores de insulina y las vacas con niveles más bajos de insulina periférica en el período posparto inmediato sufren un retraso en la reanudación ovárica posparto y ciclicidad normal, entre otros, por un mayor riesgo de padecer quistes ováricos (Vanholder et al., [2005](#)). Por lo tanto, las dietas glucogénicas se han recomendado en el período posparto con el objeto de mejorar las concentraciones de insulina periférica y promover la reanudación de la actividad ovárica normal (Gong et al., [2002](#)). Sin embargo, se ha demostrado que la insulina tiene efectos perjudiciales sobre la competencia de los ovocitos y los embriones (Fouladi-Nashta et al., [2005](#)) y que estimula el catabolismo enzimático de la progesterona (P<sub>4</sub>) en el hígado (Lemley et al., [2008](#)). Esto último sugiere que las dietas glucogénicas solo son ventajosas cuando se ofrecen en el período posparto inmediato y evitarse cuando las vacas son inseminadas.

Numerosos factores de crecimiento (insulina e IGF1) y metabolitos (glucosa) influyen en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) de las neuronas hipotálamicas (Sinclair y Webb, [2005](#)) y tanto la hormona folículo estimulante (FSH) como la hormona luteinizante (LH) se liberan desde la parte anterior de pituitaria en respuesta a GnRH (Wolfenson et al., [2004](#)). FSH estimula el reclutamiento de folículos y el crecimiento temprano de folículos, mientras que se requiere LH pulsátil para el crecimiento continuo y el desarrollo del folículo ovulatorio dominante. Butler ([2003](#)) encontró que el BNE está fuertemente asociado con niveles bajos de glucosa en sangre, insulina e IGF1 y al mismo tiempo se reduce la frecuencia del pulso de esta hormona. Precursores glucogénicos (suplemento de almidón) no influyó en las concentraciones de FSH en vacas que no pastorean (Gong et al., [2002](#)). Butler et al. ([2006](#)) mostró que mono-

propylen glycol en vacas que no pastorean no tuvo efecto sobre las características de la secreción de LH.

### **Inseminación artificial (IA)**

La IA es la técnica por la cual se introduce el semen del toro mecánicamente dentro del útero de las vacas durante el periodo preovulatorio (Foote, [2002](#)). La primera IA la hizo el investigador Lázaro Spallanzini en 1779 al fecundar una perra con material seminal y lograr una camada normal (Giraldo, [2019](#)). En México se empezó a utilizar esta técnica a finales de los años 50's y a mediados de 1960 de usó manera comercial por el Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal (Duarte, [2019](#)).

Tradicionalmente, la IA se maneja con el sistema AM-PM y PM-AM, el cual consiste en que las vacas que sean vistas en estro (celo) en la mañana, deben de ser inseminadas durante la tarde del mismo día, (aproximadamente 12h después) y las vacas detectadas por la tarde, deben de ser inseminadas en la mañana del día siguiente (Marizancén y Artunduaga, [2017](#)).

Sin embargo, Graves et al. ([1997](#)) en su estudio no encontraron diferencias en la tasa de preñez en vacas Jersey que fueron inseminadas según la regla AM-PM y vacas que se observaron en celo por la mañana inseminadas en ese mismo momento.

Se han publicado informes que muestran que algunos toros se desempeñan mejor en escenarios de IA a tiempo fijo que otros (Hiers et al., [2003](#)). Esto debería estimular a los administradores y veterinarios a analizar los datos de fertilidad de su hato en relación con el uso de toros específicos. Por otro lado, aún se desconoce si de esta forma estimulamos la selección hacia animales que se adaptan mejor a protocolos específicos de tiempo fijo en lugar de estimular la selección hacia una mayor fertilidad.

Otro factor que contribuye es el sitio de deposición del semen. Aunque generalmente se acepta que el cuerpo uterino es el sitio adecuado para la deposición de semen, en un experimento que utilizó radiografía de contraste para evaluar la precisión de los inseminadores profesionales, la deposición de semen en el cuerpo uterino tuvo éxito solo en el 39% de los intentos, mientras que en el 25% de los casos, el semen se depositó en el cuello uterino (Peters et al., [1984](#)). Si bien varios estudios observaron una mejora de la fertilidad en respuesta a la reproducción de cuernos (inseminación bicornual profunda

en la que la dosis de inseminación completa se dividía entre ambos cuernos uterinos después de un examen de ultrasonido anterior para detectar el sitio del folículo ovulatorio para permitir la inseminación ipsilateral), la mayoría de los estudios comparativos no indicaron diferencias en tasas de preñez (Lopez-Gatius, [2000](#)). Recientemente, se desarrolló un nuevo dispositivo que facilita significativamente la inseminación intrauterina profunda (Verberckmoes et al., [2004](#)), aunque los autores no pudieron demostrar mejores resultados de preñez con este dispositivo en comparación con la inseminación convencional en el cuerpo uterino (Verberckmoes et al., [2005](#)). DeJarnette et al. ([2004](#)) mencionaron que la principal preocupación es garantizar que la deposición de semen se realice cranealmente en el orificio cervical interno. Cabe destacar en este contexto el artículo de López-Gatius y Hunter ([2011](#)) en el que los autores informan sobre la inseminación intrafolicular exitosa en vacas reproductoras repetidas bajo estrés por calor.

Actualmente, la mayor parte del semen de toro se congela en pajillas francesas de 0.25 o 0.50 ml y se almacena en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además de facilitar el envasado, etiquetado, almacenamiento y transporte del semen, las pajillas también facilitan un control más uniforme de la congelación y descongelación, lo que en última instancia conduce a una mejor recuperación de los espermatozoides después de la descongelación. Sin embargo, una gran desventaja de las pajillas es su vulnerabilidad al mal manejo, en particular las pajillas de 0.25 ml, que son las más populares en Europa y Canadá. Las pajillas de 0.25 ml tienen una gran relación superficie-volumen, en comparación con las pajillas de 0.5 ml, lo que las hace vulnerables a las rápidas fluctuaciones de temperatura. Seidel ([2011](#)) recomendó que 3 segundos sea el tiempo máximo para mover pajillas de 0.25 ml de un tanque de nitrógeno líquido a otro sin dañar los espermatozoides y de manera similar para mover del tanque al baso de descongelación.

La descongelación del semen congelado debe realizarse a máxima velocidad. La descongelación rápida disminuye los efectos nocivos de la recristalización y rehidratación del agua, evitando así daños en la membrana y el citoplasma del espermatozoide. La zona de temperatura crítica para la formación de cristales de hielo está entre  $\sim -50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $\sim 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La

rápida progresión a través de esta zona de temperatura significa que el semen cambia de estado vítreo a líquido y los cristales de hielo no tienen tiempo suficiente para formarse. Se han realizado numerosos estudios para determinar la tasa de descongelación que proporciona el mayor porcentaje de espermatozoides viables después de la descongelación (Correa et al., [1996](#)). En algunos estudios, las temperaturas de descongelación de hasta 60 °C a 80 °C durante 6 a 7 segundos mejoraron la motilidad y viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación (Lyashenko, [2015](#)). Sin embargo, la duración de la exposición a una temperatura tan alta es de vital importancia y parece haber muy poco margen de error a diferencia de la situación en la que las pajillas se descongelan a temperaturas más bajas.

### **Ventajas de la inseminación artificial**

La IA ofrece principalmente un evidente mejoramiento genético dentro de los hatos generando un impacto en la mejora de los índices de producción lechera (Huanca, [2001](#)), esto debido a que esta técnica permite buscar y utilizar semen de toros altamente productivos que no están dentro del hato de los vientres, además de que la IA permite que los machos produzcan más descendencia, sin la necesidad de más machos. Por lo tanto, uno puede elegir sólo los mejores toros para usarlos como padres, aumentando la intensidad de selección. Además, debido a que los machos pueden tener más descendencia, su descendencia se puede utilizar en una prueba de progenie para evaluar con mayor precisión el valor genético de los toros (Mulu et al., [2018](#)).

Otras ventajas son el control de enfermedades transmisibles por la monta, reducción de problemas al parto en novillas a través del uso de toros con facilidades de parto, al usar semen sexado se incrementa la posibilidad de crías hembras (Marizancén y Artunduaga, [2017](#)).

### **Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF)**

A diferencia de la IA el cual se maneja a celo detectado, la IATF es un protocolo que a través del uso de hormonas se tiene un tiempo de proceso de inseminación, es decir



que se debe de tomar en cuenta las horas de la aplicación de las hormonas para la inseminación en tiempos exactos (Marizancén y Artunduanda, [2017](#)).

Hay una gran variedad de productos y protocolos para hacer una sincronización de celos, los cuales varían en el precio, combinaciones y tiempos en la aplicación de hormonas. Los protocolos para IATF se pueden dividir en los protocolos de tipo Ovsynch que utilizan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y protocolos que utilizan compuestos de estradiol (E2) más tratamiento con progesterona (protocolos E2/P4). Independientemente de las combinaciones hormonales, los objetivos fisiológicos siempre son sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular para inducir el recambio de folículos en la onda folicular actual. La P4 circulante se mantiene elevada durante el desarrollo de la nueva onda folicular preovulatoria (Cardoso Consentini et al., [2021](#)).

Los programas de IATF como el protocolo Ovsynch utilizan una combinación de GnRH y PGF2 $\alpha$  para controlar el momento de la ovulación (Pursley et al., [1995](#)). Estos programas de sincronización han sido adoptados en diferentes grados por la mayoría de las granjas lecheras de USA (Caraviello et al., [2006](#)). Los protocolos de sincronización para IATF harán que la mayoría de las vacas ovulen sincrónicamente dentro de una ventana corta de 8 a 12 h (Pursley et al., [1995](#)), haciendo que el momento de la ovulación sea más predecible y creando una oportunidad para mejorar la IA. intervalos de ovulación en relación con la IA realizada después de la detección del estro.

El momento óptimo en el que debe tener lugar la inseminación en relación con la ovulación parece depender de la vida útil fértil de los espermatozoides y la vida útil viable del ovocito en el tracto genital de la vaca después de la ovulación (Roelofs et al., [2006](#); Hockey et al., [2010](#)). En consecuencia, si la IA se lleva a cabo a intervalos prolongados antes de la ovulación, los toros con una mejor calidad del semen probablemente tendrán menos probabilidades de tener concepciones reducidas debido a su mayor vida útil de las células espermáticas en comparación con los espermatozoides de toros con una vida más corta en el tracto femenino (Hockey et al., [2010](#)). En consecuencia, asumiendo la variación en los rasgos de calidad del semen de diferentes toros y la posibilidad de controlar con precisión el momento de la ovulación con protocolos de IA a tiempo fijo, es razonable

suponer que algunos toros de servicio pueden producir resultados de P/IA que pueden diferir si la IA se realiza después EAI o siguiendo programas IATF.

### **Hormonas utilizadas para la sincronización de celos**

GnRH: Induce la liberación de hormonas como FSH y LH, las cuales son indispensables para del desarrollo folicular.

Progestágenos: Son implantes de liberación lenta que sirven para mantener el periodo de cuerpo lúteo y controlar la ovulación hasta que se retire.

Prostaglandinas PGF: Su función principal es destruir el cuerpo lúteo y terminar con la fase lútea. De 50 a 70% de los animales presentaran celo y ovulación a los 6 días siguiente de la aplicación de PGF.

Estrógenos: se aplica benzoato de estradiol a razón de 2 mg al inicio del protocolo de IATF provocando una nueva oleada folicular.

Gonadotropina coriónica equina: Se aplica al retirar los dispositivos de P4, y este actúa estimulando la FSH y LH para estabilizar la ovulación, favoreciendo el crecimiento del folículo dominante.

### **Protocolo de Ovsynch**

Los folículos, durante su crecimiento y hasta alcanzar el tamaño de alrededor de 9 mm, se vuelven sensibles a la hormona luteinizante (LH) y como consecuencia es posible acelerar su maduración mediante la inyección de hormonas exógenas (Yanis et al., [2004](#)). Se pueden utilizar caso por caso, según el resultado del examen ginecológico, o en aplicación directa, asumiendo una etapa de desarrollo similar de folículos en todas las vacas. Ovsynch es un ejemplo de tal protocolo de inyección, y conduce a la igualación del desarrollo del folículo en los ovarios, provoca la ovulación y permite la IA (Pursley et al., [1995](#)). Este programa supone que la primera hormona liberadora de gonadotropina, la inyección de GnRH induce al folículo ovárico a ovular, lo que conduce al desarrollo del cuerpo lúteo (CL). La eficacia de la inducción de la ovulación por la primera inyección de GnRH varía del 66% al 85% (Ullah et al., [1996](#); Perry et al., [2005](#)) y depende de la etapa de maduración de los folículos (Bello et al., [2006](#)) en el momento del tratamiento. Detección por ultrasonido de los primeros folículos en desarrollo de una nueva ola es

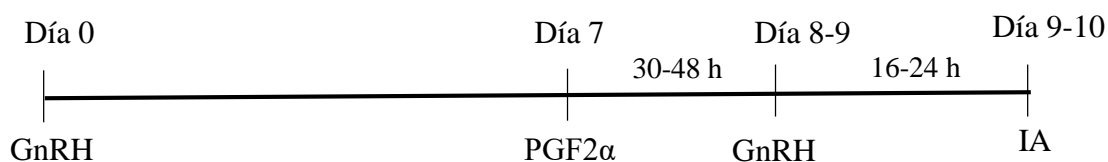
posible dos días después de la inyección de GnRH (Bisinotto et al., [2010](#)) y uno de estos folículos se utilizarán para IATF al final de la Protocolo OvSynch. En el séptimo día de Ovsynch, se inyecta prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) tanto para inducir luteólisis y para permitir el desarrollo continuo de el folículo dominante de la próxima ola. A su vez, se estima que este folículo ovulará por la segunda inyección de GnRH el día 9 del protocolo. La inseminación debe realizarse a sin detección de celo entre 16 y 24 horas más tarde.

Ovsynch da los mejores resultados cuando se utiliza para el hato entero. Esta estrategia permite que todas las vacas designadas para que la IA sean inseminadas en un momento similar posparto, y la tasa de preñez en el hato sea mejorado (Pursley et al. [1995](#), [1997a](#)). Sin embargo, no mejora el comportamiento reproductivo del hato cuando se utiliza únicamente para vacas problemáticas seleccionadas. El principal beneficio de los programas hormonales como Ovsynch es la reducción del número de vacas en estro no detectadas que podrían ser potencialmente inseminados y preñadas (Allahyari et al., [2023](#)). La primera tasa de preñez **con ls** primera inseminación (FIR) en el protocolo Ovsynch alcanza el 35%, lo que confirma que es un buen alternativa a la detección de celo (Pursley et al., [1997a,b](#)). Un mayor porcentaje de preñez (47.7%) con Ovsynch fue informado por Vasconcelos et al. ([1999](#)). La tasa de preñez después Ovsynch fue mejor cuando se realizó IATF 16 horas después de la segunda inyección de GnRH (45%), y una tasa del 41% se devolvió cuando se realizó 8 o 24 h después de GnRH (Pursley et al., [1998](#)).

La sincronización hormonal utilizada para la IATF altera la fisiología reproductiva y la endocrinología involucradas en los ciclos estrales. Los animales tratados están preparados para iniciar una nueva ola de folículos, seguida de la ovulación, lo que brinda una mayor probabilidad de concebir incluso para las vacas poco fértiles. Por lo tanto, el desempeño de las vacas genéticamente inferiores cambiará debido a los protocolos hormonales y serán más parecidas a las vacas que naturalmente muestran celo. Dado que los programas genéticos se basan en la recopilación de datos fenotípicos precisos, estos fenotipos enmascarados podrían agregar sesgos a las evaluaciones genéticas (Tsuruta et al., [2000](#); Bouquet y Juga, [2013](#)). Esta práctica reproductiva también puede causar cambios en la variación genética y residual cuando se compara con hatos no sincronizados (Goodling et al., [2005](#)).

Saldarriaga (2009) divide la IATF en los que se utilizan combinaciones de GnRH y prostaglandinas, llamados protocolos de Ovsynch y los que utilizan dispositivos con progesterona ( $P_4$ ) y estradiol.

Con este protocolo las vacas pueden ser inseminadas sin detección del estro. El protocolo de Ovsynch (figura 1) prácticamente se basa en una primera inyección de GnRH para estimular la hormona luteinizante (LH) y así provocar que el folículo dominante ovule o de lo contrario que se inicie una nueva onla folicular; a los 7 días siguientes se aplica  $PGF2\alpha$  para inducir luteolisis y las 48 horas se aplica una segunda inyección de GnRH para provocar la ovulación de un nuevo folículo. Posterior a esto se debe de inseminar 24 h después (Morales y Cavestany, 2012).



**Figura 1.** Protocolo de Ovsynch. Fuente: Morales y Cavestany (2012)

Pursley (1998) menciona que la inseminación se puede efectuar entre 0 y 24 h después de la segunda aplicación de GnRH esperando una la tasa de preñez similar, aunque sugiere que el momento óptimo para la IA es ~16 h después de la última inyección de GnRH, además menciona que hay una considerable flexibilidad entre el tiempo de la IA en relación con la ovulación cuando la IA fue antes de la ovulación. Esta flexibilidad entre el tiempo de inseminación y ovulación fue demostrada por Roelofs et al. (2006) quienes no encontraron diferencia en la tasa de preñez en vacas inseminadas de 36 a 12 h antes de la ovulación. Sin embargo, hay una disminución de P/IA cuando las vacas reciben IA al comienzo del estro en comparación con una inseminación 12 o 24 horas después (Dalton et al., 2001). Esto como consecuencia del deterioro de la viabilidad de los espermatozoides al hacer la IA en un tiempo no óptimo después de la ovulación (Brusveen et al., 2008).

## **Diferencia en tasas de preñez entre el uso de semen sexado y convencional**

El semen sexado se usa particularmente para tener una mayor probabilidad al escoger el sexo a conveniencia del ganadero (Bonilla y Sánchez, [2019](#)), El uso de semen clasificado por sexo en la producción de leche permite la predeterminación del sexo de los terneros con una confiabilidad de ~90% (Healy, [2013](#)).

En el bovino, un espermatozoide portador del cromosoma X contiene un 3.8% más ADN que un espermatozoide portador del cromosoma Y (Johnson, [1995](#)), proporcionando una función que se puede utilizar para identificar rápidamente espermatozoides portadores de cromosomas X o Y. En la actualidad, el único método confiable para predeterminar el sexo de la descendencia es manipulando la abundancia relativa de X- viable y espermatozoides portadores del cromosoma Y (Holden y Butler, [2018](#)). Para lograr esto, se usa una técnica llamada citometría de flujo que permite separar los espermatozoides X de Y, gracias a la diferencia cuantitativa en el contenido de ADN (Cordova et al., [2016](#)).

A pesar de los beneficios asociados con el uso de semen sexuado, actualmente representa un porcentaje pequeño (pero de rápido crecimiento) del mercado de la inseminación artificial (IA) (<5%; Seidel, [2014](#)). El semen sexado se usa principalmente en hatos lecheros, y dentro de los hatos lecheros tradicionalmente se limitaba a su uso en novillas (Borchersen y Peacock, [2009](#); Frijters et al., [2009](#)) debido a la reducción de la preñez. en las vacas (Healy et al., [2013](#)). Estudios más recientes han demostrado que el semen sexado se puede usar con éxito tanto en novillas vírgenes como en vacas lactantes, y que se debe emplear el uso específico de semen sexado (Xu, [2000](#)). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que cualquier reducción en la fertilidad reducirá los beneficios financieros de implementar el uso de semen sexado en la granja, y es poco probable que el uso de semen sexado sea rentable en hatos con poca fertilidad.

La P/IA usando IATF llega a variar cuando se usa semen convencional (Pursley et al., [1998](#)) en comparación al semen sexado (Sales et al., [2011](#); Lauber et. al., [2020](#);) debido que al usar semen sexado se puede tener una tasa de preñez menor debido al estrés que genera el sexaje y la baja dosis de espermatozoides por dosis de semen, es por esto que el semen sexado se usa mayormente solo en novillas (Frijters et al., [2009](#)).

Oses et al. (2016) Mencionan que la utilización de semen sexado resulta una P/IA entre 5 y 35% inferiores a los obtenidos con semen convencional. La inseminación intrauterina profunda se probó para la inseminación de dosis de espermatozoides clasificados por sexo con un bajo número de células espermáticas.

Es bien sabido que el semen sexado se ha utilizado a nivel mundial para controlar el sexo del ternero en los últimos años en muchos países (Vishwanath y Moreno, 2018). Se recomienda el uso de semen sexado en vacas que expresan estro para maximizar la tasa de preñez en las vacas (Kurykin et al., 2017). Estudios recientes demostraron que la expresión del estro cerca del momento de TAI fue fundamental para obtener una mayor tasa de preñez con semen sexado en novillas de carne (Colazo et al., 2018) y vacas de carne (Crites et al., 2018). Aunque el semen sexado se prefiere principalmente en el ganado lechero (Holden y Butler, 2018).

### **Efecto del estrés por calor**

La temperatura rectal, la temperatura corporal central (medida con termómetros intravaginales) y el termógrafo infrarrojo para la temperatura de la piel son los diversos medios para conocer el estrés por calor. Los animales al enfrentarse a altas temperaturas y humedad pueden llegar a presentar diferentes niveles de estrés por calor, esto trae como consecuencia una reducción en el apetito, lo cual afecta directamente en la producción de los animales (Roca, 2011). Además, en hatos lecheros el estrés por calor produce una disminución en la capacidad reproductiva de los animales. Mellado et al (2013) mencionan que los animales que se encuentran en un estrés entre moderado a severo ( $ITH \leq 70$  a  $\geq 95$ ) se tiene una disminución en la P/IA de un 47% a 26 %.

El estrés por calor compromete la tasa de fertilización (Sartori et al., 2002). Por ejemplo, la tasa de fertilización en vacas lactantes inseminadas por IA se redujo del 88% en invierno al 55% en verano (Sartori et al., 2002). Las bajas tasas de fertilización podrían reflejar el daño al ovocito, el esperma depositado en el útero, o la interrupción del proceso de fertilización en sí. Los efectos sobre el esperma o el proceso de fertilización pueden ser la causa más importante que los efectos sobre el ovocito.

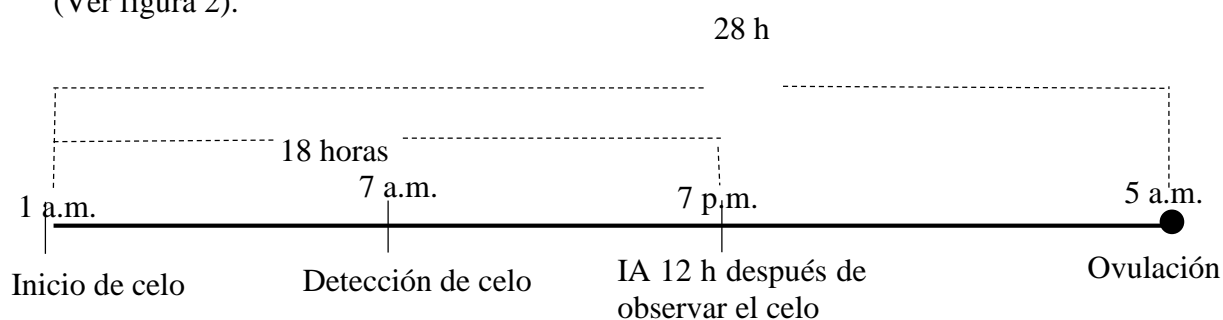
La competencia del ovocito para ser fertilizado in vitro no se redujo en el verano aunque hubo una reducción en el desarrollo de embriones en el estadio de blastocisto

(Ferreira et al., [2011](#)). Además, indirecta evidencia de un efecto del estrés por calor en los espermatozoides es la observación de vacas Girolando donde la inseminación en el mañana se asoció con un leve pero significativo aumento de P/IA (Rocha de Souza et al., [2016](#)).

### Doble inseminación artificial

Usar la regla tradicional AM-PM puede no garantizar una P/IA óptima porque algunas vacas serán inseminadas después de que éstas entren en celo y la probabilidad de la fertilización es menor. Esto debido a que la vida del ovocito después de la ovulación es de 8 a 12 horas (Brackett et al., [1980](#)) y después de este tiempo, se reduce la calidad del embrión. Entonces, una IA después de la ovulación producirá embriones de baja calidad (Roelofs et al. [2006](#)).

El tiempo para que la vaca ovule después de iniciado el celo es aproximadamente 28 h aunque existe variación de 5 a 6 h (Diskin, [2018](#)), es por esto que el uso de la regla AM-PM puede no dar los resultados esperados en término de aceptables tasas de preñez (Ver figura 2).



**Figura 2.** Inseminación siguiendo el protocolo AM-PM. Fuente: Elaboración propia

En el ejemplo anterior se puede ver que si una vaca comienza su celo a la 1 a.m. será detectada por el personal del establo a las 7 a.m. debido al horario laboral y será inseminada aproximadamente 17 a 18 horas después de que entró en celo. Este escenario se vuelve más complicado si tomamos en cuenta que la expresión del celo se reduce en vacas de alta producción lechera (Rivera et al, [2010](#); Burnett et al., [2018](#)). Se puede observar también que los espermatozoides estarían incubados por 4 h dentro de la útero y

presentaran motilidad y su potencial mitocondrial será reducido en comparación con los espermatozoides no incubados (Rahman et al., [2014](#)). Los espermatozoides depositados en el útero de vacas bajo estrés por calor (39.2°C) (Rejeb et al., [2016](#)), también puede contribuir a una reducción en su integridad y en la capacidad de fertilización (Gong et al., [2017](#)). Por lo tanto, dos IA durante el estro podrían mejorar la migración de los espermatozoides hacia los oviductos para fertilizar al ovocito, manteniendo a los espermatozoides activos durante el tiempo entre la IA y la ovulación, evitando así las altas temperaturas en el útero y seleccionar los mejores espermatozoides para la fertilización.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales se manejaron siguiendo las reglas por "Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching" (3rd ed. 2010 Federation of Animal Science Societies, Champagne, IL; [https://www.fass.org/images/science-policy/Ag\\_Guide\\_3rd\\_ed.pdf](https://www.fass.org/images/science-policy/Ag_Guide_3rd_ed.pdf)), y fue autorizado por el Comité de Asesoría para el Cuidado Animal de la UAAAN (número de aprobación 5-5-30-38111-4250-3001-2419).

### **Descripción del área de estudio y manejo de animales**

El estudio se realizó en el establo "La Victoria" ubicado en la comarca Lagunera, Coahuila, México, con una precipitación media anual de 234 mm y temperatura media anual de 23.7 °C, teniendo un clima con altas temperaturas la mayor parte del año (marzo-septiembre).

Las vacas se encontraban en corrales abiertos de tierra, con sombra y ventiladores, los cuales se activaban con un sistema SmaX-tec (smaXtec Animal Care GmbH, Graz, Austria), el cual es un dispositivo que se coloca en el retículo-rumen de las vacas para evaluar el pH y temperatura interna, y con esta información se activa un sistema de nebulización a alta presión dos o tres veces al día para aliviar el estrés por calor de las vacas lactantes.

Debido a las altas temperaturas durante la mayor parte del año, este hato presentó baja fertilidad, lo que condujo a frecuentes lactancias prolongadas no planificadas (>450 días). La alimentación se basó en una ración mixta total de heno de alfalfa, ensilaje de maíz y concentrado de grano, suministrado en partes iguales dos veces al día. La relación forraje-concentrado fue de 50:50, y esta ración cumplía con los requerimientos de las vacas que pesaban 650 kg, producían 37 kg de leche/día con un consumo de 25 kg de MS/d (NCR, [2001](#)). La ración se ajustó a la etapa de lactancia de acuerdo con la producción de leche.

## Manejo reproductivo

Las vacas y vaquillas se sincronizaron con el protocolo de Ovsynch, el cual consistió en la administración de 100 mg de GnRH (CEVARELIN®), siete días después se aplicó 25 mg de PGF2 $\alpha$  (CELOSIL®), 56 h después se aplicó una segunda inyección de 100 mg de GnRH, para después hacer la IA 16 a 20 h más tarde. El uso de semen sexado solo se usó en vacas nulíparas. Para las vacas que recibieron doble inseminación, la segunda IA se hizo  $\pm$  12 h después de la primera.

El diagnóstico de preñez se determinó mediante la palpación rectal del contenido uterino  $45 \pm 3$  días después de la IA. Los animales que no estaban preñadas se sometieron a una resincronización de la ovulación. Los servicios entre partos fue  $3.1 \pm 2.4$  en pluríparas y  $2.6 \pm 1.5$  para primíparas.

## Diseño del estudio

En este estudio retrospectivo se incluyeron 18,670 vacas Holstein, los datos fueron tomados desde enero del 2015 hasta diciembre del 2021. Los criterios de inclusión fueron vacas sin lactancias, vacas cuya lactancia fue inducida hormonalmente, sin signos y síntomas de laminitis, metritis o mastitis con una condición corporal promedio al parto de 3.52 ( $\pm$ 0.24). Las vacas fueron separadas en grupos como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Organización de grupos para diseño experimental

	Vacas multíparas	Vacas primíparas
Animales	15,046	3,624
Inseminaciones	46,704	7,973
IA simple	44,068	6,217
IA doble	2,636	1,756
IA semen sexado	NA	4,914
IA semen convencional	NA	3,059

Los datos climáticos provienen de una estación meteorológica ubicada a 2.5 km del establo en cuestión. Se registro las temperaturas máximas y humedad relativa diaria. Esta información se utilizó para calcular el índice de temperatura-humedad diaria utilizando la siguiente ecuación:

$$ITH = (0.8 \times \text{temperatura}) + ((\% \text{ RH}/100) \times (\text{temperatura} - 14.4)) + 46.4$$

Donde:

ITH = índice de temperatura-humedad

%RH = humedad relativa máxima

Temperatura = temperatura máxima en °C

El ITH se ha clasificado en categorías para indicar el grado de estrés por calor; estas varían dependiendo el autor, la fórmula utilizada y las condiciones climáticas específicas de cada lugar (De Rensis et al., [2015](#); Yan et al., [2021](#); Habeeb et al., [2018](#)). En este estudio se usaron tres categorías como se muestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Categorías para indicar el grado de estrés por calor

	ITH (%)
Zona de confort	$\leq 68$
Estrés por calor	68 a 85
Estrés severo	$\geq 85$

### Análisis estadístico

El porcentaje de preñez se analizó por separado para vacas multíparas y primíparas utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS (SAS Inst. Inc.; versión 9.4), las variables fueron tipo de inseminación (simple o doble IA), nivel de estrés por calor (zona de confort, estrés, estrés severo), ITH del día de la primera IA (mañana o tarde) y todas las interacciones unidireccionales. El número de lactación y el intervalo entre partos se tomó como covariable. La unidad experimental fue la IA, la interacción entre el ITH y la tasa de preñez se analizó usando una regresión no lineal con el software CurveExpert

Professional 2.5.6 (Hyams Development). Los valores con  $p < 0.05$  se consideran estadísticamente significativos para todos los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

Los siguientes resultados deben de ser analizados cuidadosamente antes de ponerlos en práctica, ya que aunque se considera que este estudio retrospectivo genera información confiable por la gran base de datos utilizado, el estudio sólo fue en un establo lechero y las condiciones climáticas, estructurales y económicas pueden variar entre granjas lecheras.

### Análisis de resultados para vacas multíparas

En el cuadro 3, se muestra la diferencia estadística de las vacas con una inseminación contra las que recibieron doble inseminación en diferentes ITH; vacas que recibieron doble IA por ovulación inducida mostraron mayor P/IA ( $p < 0.05$ ) que las que recibieron un solo servicio. El 87% de las veces, las vacas fueron inseminadas cuando se encontraban en un nivel de estrés moderado a severo (ITH 68 a <85), es por esto que las vacas se encontraban bajo estrés por calor la mayor parte del año.

El nivel en el que la fertilidad se vio afectada por el ITH y por el número de inseminaciones que se hicieron fue estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ).

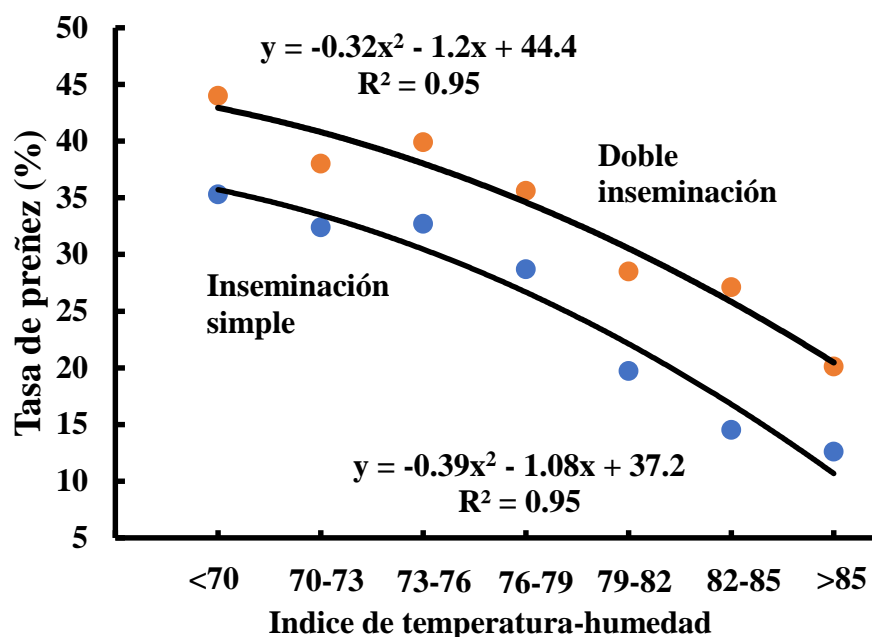
**Cuadro 3.** Tasa de preñez en vacas multíparas con simple o doble IA con diferentes niveles de estrés por calor al momento del primer servicio

ITH (%)	Número de inseminaciones		Relación ITH	Relación NIA
	IA Simple	IA Doble		
≤68	35.3 <sup>b</sup> (1,983/5,623)	43.4 <sup>a</sup> (184/424)	<0.0001	<0.0001
68-85	27.4 <sup>b</sup> (7,001/2,5537)	34.6 <sup>a</sup> (413/1,195)		
≥85	13.9 <sup>b</sup> (1,790/12,907)	24.2 <sup>a</sup> (246/1,017)		

ITH: índice de temperatura y humedad; IA: inseminación artificial, NIA: número de inseminaciones artificiales

<sup>a,b</sup> Indica que hay diferencia significativa entre la tasa de preñez con una y dos inseminaciones dentro de cada categoría de ITH ( $p < 0.05$ ).

Aunque el ITH disminuye en gran medida la P/IA, la doble IA mejoró la tasa de preñez independientemente del estrés que se presente (Figura 3). El nivel en el que la variación de P/IA fue explicada en un 95% por el ITH el día de la IA.



**Figura 3.** Relación entre el ITH y la tasa de preñez usando una o doble inseminación en vacas multíparas

Sabiendo que las vacas con doble inseminación presentaron mayor porcentaje de preñez, en el Cuadro 4 se observa que cuando las vacas se encuentran en su zona de confort y estrés moderado no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la tasa de preñez al recibir su primera inseminación en la mañana o en la tarde. Sin embargo, la fertilidad aumentó en vacas multíparas cuando el primer servicio se hizo por la mañana en los días que los animales se encontraban bajo estrés por calor severo ( $ITH \geq 85$ ).

Existió una interacción entre el ITH y el momento en el que se hizo la primera inseminación ( $P=0.0621$ ).

**Cuadro 4.** Diferencia de fertilidad entre las vacas multíparas con doble IA que recibieron la primera inseminación en la mañana o en la tarde.

ITH (%)	Momento de la primera IA		Relación ITH	Relación TIA	ITH x TIA
	AM	PM			
≤68	49.5 (46/93)	41.7 (138/331)	0.3959	0.0506	0.0621
68-85	39.0 (98/125)	33.4 (315/944)			
≥85	28.1 <sup>a</sup> (123/438)	21.2 <sup>b</sup> (123/579)			

ITH: índice de temperatura y humedad; IA: inseminación artificial, TIA: Tiempo de la primera inseminación artificial (mañana o tarde)

<sup>a,b</sup> Indica que hay diferencia significativa entre la tasa de preñez cuando la primera IA fue en la mañana o tarde dentro de cada categoría de ITH ( $p < 0.05$ ).

### Análisis de resultados para vacas primíparas

Como se mencionó anteriormente, las vacas primíparas además de recibir uno o doble servicio, fueron inseminadas con semen sexado o convencional. En el Cuadro 5 se muestra el porcentaje de preñez de cada caso; al usar semen convencional, la doble inseminación aumento la fertilidad ( $p < 0.01$ ) cuando los animales se encontraban en su zona de confort. Al usar semen sexado se demostró que independientemente del ITH, con un doble servicio se aumentó la tasa de preñez.

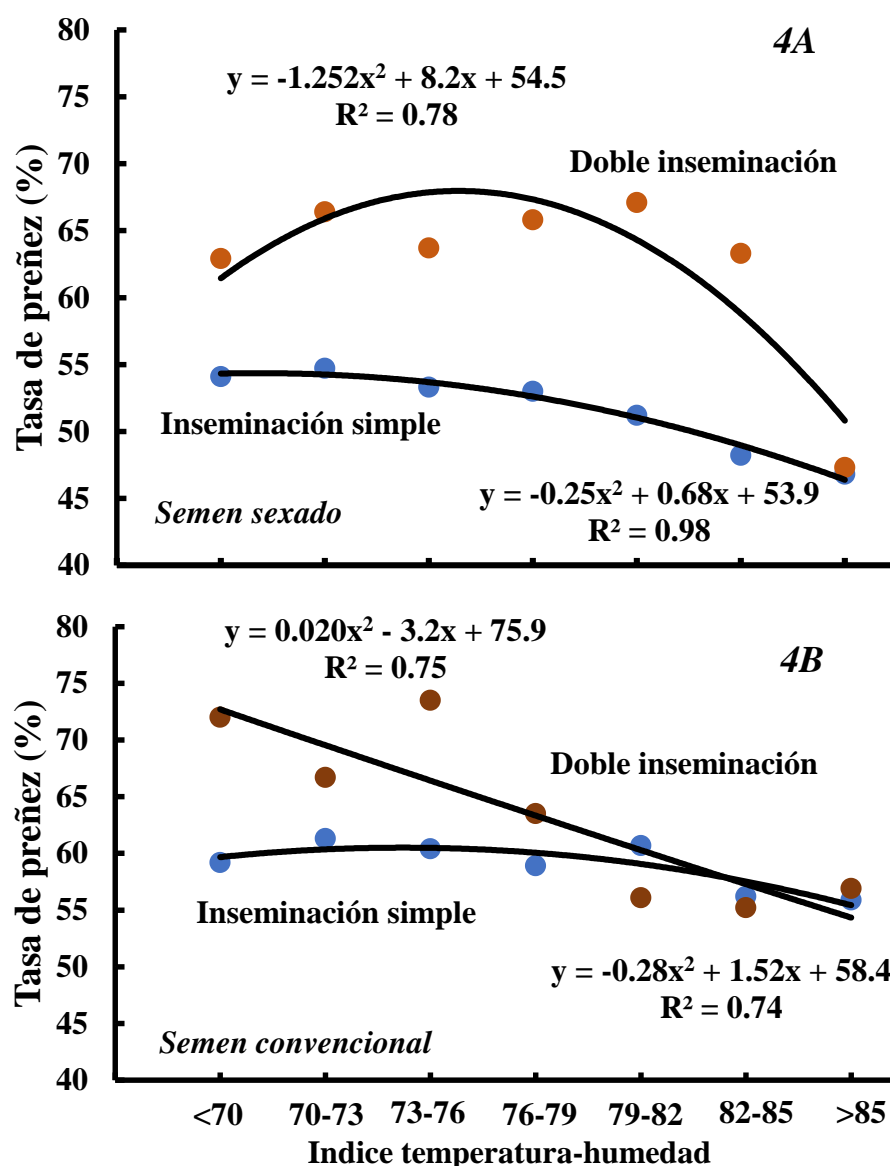
**Cuadro 5.** Efecto de una o doble IA con diferente tipo de semen (convencional o sexado) y su interacción con el nivel de estrés por calor en vacas primíparas.

Tipo de semen	Número de inseminaciones		
	ITH	IA Simple	IA Doble
Convencional	≤68	59.2 <sup>b</sup> (190/321)	72.0 <sup>a</sup> (54/75)
	68-85	60.2 (263/406)	64.8 (263/406)
	≥85	56.1 (391/697)	55.7 (122/219)
Sexado	≤68	54.1 <sup>b</sup> (384/710)	62.9 <sup>a</sup> (107/170)
	68-85	52.9 <sup>b</sup> (1178/2226)	65.7 <sup>a</sup> (401/610)
	≥85	47.7 <sup>b</sup> (440/992)	58.3 <sup>a</sup> (161/276)

ITH: índice de temperatura y humedad; IA: inseminación artificial.

<sup>a,b</sup>Indica que hay diferencia significativa entre la tasa de preñez con una y dos inseminaciones dentro de cada categoría de ITH ( $p < 0.05$ ) cuando se usó semen sexado o convencional.

La doble inseminación no aumentó la fertilidad en vacas primíparas cuando se usó semen convencional y los animales eran sometidos a estrés por calor severo (Figura 4B). Por otro lado, el porcentaje de preñez en vaquillas con doble inseminación y semen sexado fue 10 puntos porcentuales mayor ( $p < 0.05$ ) en zona de confort y estrés moderado, comparado con las primíparas que se inseminaron una sola vez con este tipo de semen (Figura 4A). El aumento de ITH trajo como consecuencia una disminución de la tasa de fertilidad.



**Figura 4.** Relación entre el índice de temperatura- humedad y la tasa de preñez basado en una o doble IA en vacas primíparas; la figura 4A corresponde a la inseminación usando semen sexado y la 4B semen convencional.



Para ambos grupos de novillas, la tasa de preñez fue mayor con doble IA que con una sola IA, sin embargo, hubo un mayor aumento de fertilidad cuando se usó semen sexado que con semen convencional. En todas las categorías de ITH no hubo diferencia significativa cuando en la doble inseminación, la primera dosis ocurrió en la mañana o en la tarde ( $p > 0.05$ ; Cuadro 6).

Se presentó una interacción entre el ITH y el momento en el que se hizo la primera inseminación ( $p = 0.0621$ ).

**Cuadro 6.** Diferencia de P/IA entre las vacas primíparas con doble IA que recibieron el primer servicio por la mañana o en la tarde.

ITH (%)	Momento de la primera IA		Relación ITH	Relación TIA	ITH X TIA
	AM	PM			
≤68	66.7 (76/144)	64.9 (85/131)	0.3959	0.0506	0.0621
68-85	66.5 (305/459)	64.4 (358/556)			
≥85	58.6 <sup>a</sup> (140/239)	56.1 <sup>b</sup> (143/255)			

ITH: índice de temperatura y humedad; IA: inseminación artificial, TIA: Tiempo de la primera inseminación artificial (mañana o tarde)

<sup>a,b</sup> Significa que hay diferencia significativa entre la tasa de preñez cuando la primera IA fue en la mañana o tarde dentro de cada categoría de ITH ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis un aumento de la tasa de preñez haciendo doble inseminación artificial con el protocolo de Ovsynch, en comparación con una IA. Independientemente del ITH y del tipo de semen (sexado o convencional), la tasa de preñez fue 7.5 y 8.6 puntos porcentuales más alto en las vacas que recibieron doble IA en comparación con las que recibieron un solo servicio. Los animales estudiados sufrían de estrés por calor debido a las temperaturas muy altas la mayor parte del año, provocando un desempeño reproductivo muy pobre (Mellado et al., [2012](#)). El incremento de la tasa de preñez usando doble IA no fue muy alta, sin embargo, ofrece una herramienta confiable y prometedora para mejorar el rendimiento reproductivo en vacas con estrés por calor.

Esta investigación sugiere que en vacas lecheras con un bajo desempeño reproductivo que se encuentran en estrés por calor, usar doble IA con 12 h entre servicios incrementa la tasa de preñez. Sin embargo, cuando se usa semen muy costoso, es probable que económicamente no sea redituable, es por esto que la recomendación para usar doble IA es preferible usar un semen económico.

Los motivos por el cual la doble IA aumenta la tasa de preñez aun no es bien conocida. Una limitación del protocolo de Ovsynch es la imprecisión para sincronizar la ovulación entre 24 y 32 h después de la segunda aplicación de GnRH (Pursley et al., [1998](#)), es por esto que algunas vacas ovularán demasiado tarde. En este escenario, al realizar una sola IA, el intervalo entre el servicio y la ovulación sea demasiado temprano para algunas vacas.

Cuando se hace una monta natural, el tracto reproductivo de las vacas se encarga de garantizar que los espermatozoides mantengan su morfología y motilidad vigorosa (Miller, [2018](#)), sin embargo cuando se hace una IA, el semen es manipulado y muchos espermatozoides sufren cambios morfológicos y disminuye su capacidad para fertilizar (Nagata et al, [2019](#)). Los espermatozoides sufren estrés por la descongelación y pueden llegar a tener daños oxidativos dentro del tracto reproductivo y estos deben sobrevivir sin mecanismos de reparación (Kumar et al., [2019](#)), por lo tanto, los espermatozoides dependen de recursos limitados para mantener su viabilidad antes de la llegada al ovocito

en el oviducto. Debido a lo anterior, la viabilidad de los espermatozoides se reduce mientras más sea el tiempo que estén dentro del tracto reproductivo de la vaca.

Es por esto que la a doble IA puede incrementar la tasa de preñez asegurando una población espermática altamente viable unas horas antes de la ovulación (Holt y Faazeli, 2016). Además, la doble IA podría mejorar las interacciones de los espermatozoides, promoviendo los mecanismos de selección y supervivencia de estos, evitaría la capacitación espermática antes de tiempo, modularía la respuesta inmunitaria de la vaca, mejoraría el almacenamiento transitorio de los espermatozoides antes de la ovulación, y por lo tanto, aumenta la probabilidad de fertilización (Saint-Dizier et al., [2020](#)).

Este estudio indica que el efecto de la doble inseminación en vacas Holstein pluríparas no es uniforme en las diferentes categorías de estrés por calor, por lo tanto la fertilidad es dependiente del ITH. El mayor porcentaje de tasa de preñez ocurrió con un ITH >82, lo que sugiere el beneficio de practicar doble IA maximizando la fertilidad bajo condiciones de estrés por calor. El posible beneficio de esta práctica es debido al reemplazo de espermatozoides dañados en el tracto reproductivo de la vaca (Gong et al., [2017](#)) en la segunda inseminación.

Cuando el primer servicio de la doble inseminación con semen convencional ocurrió en días de intenso calor, la tasa de preñez fue mayor 7 puntos porcentuales cuando se hizo en la mañana comparada con la tarde. Se desconoce los motivos de esta respuesta, pero se sugiere que cuando los espermatozoides son depositados en el tracto reproductivo por la mañana se enfrentan a una temperatura uterina más cálida, favoreciendo las condiciones de sobrevivencia. Además, que la doble IA genera una pequeña subpoblación de espermatozoides de alta calidad en el sitio de fusión de gametos (Saint-Dizier et al., [2020](#)).

La tasa de preñez se vio afectada en gran medida del ITH ( $r= 0.95$ ) tanto en inseminación doble como en simple. La tasa de preñez disminuye considerablemente a partir de un ITH  $\leq 72$ , por lo que se pudo confirmar que la fertilidad disminuye al aumentar el ITH (Mellado et al., [2013](#)).

Usar semen sexado para la IA disminuye la fertilidad al compararla con semen convencional (Mellado et al., [2014](#); Lenz et al., [2017](#)), debido a que éste contiene un

menor número de células espermáticas por pajilla (Seidel, [2014](#)). A causa de esto, no es sorpresa que en este estudio la tasa de preñez fue significativamente mayor para vaquillas que tuvieron doble inseminación con semen sexado, en comparación con las que recibieron un solo servicio. Estos resultados confirman el beneficio de usar el método de doble inseminación con semen sexado para vaquillas para aumentar la tasa de preñez. Sin embargo, los altos costos del semen sexado podrían dificultar el uso de este semen en novillas.

Además, hay una estrecha relación entre el ITH y el momento de la IA, por lo que hay una mayor fertilidad para la doble inseminación cuando el animal se encuentra en su zona de confort. Sin embargo, este resultado no sigue esta misma tendencia con semen sexado en vacas pluríparas. El mecanismo de acción de esta respuesta sigue sin estar claro, aunque podría explicarse por el hecho de que las vaquillas son más tolerantes al estrés por calor que las vacas lactantes, debido a los menores cambios en la temperatura corporal (Wang et al., [2020](#)).

## CONCLUSIÓN

La tasa de preñez se optimizó (con un incremento de ~8 puntos porcentuales) al implementar doble inseminación con 12 horas entre cada servicio usando semen convencional o sexado. Este aumento de fertilidad fue más evidente cuando las vacas fueron inseminadas bajo estrés por calor severo (ITH  $\geq 85$  %). Además, la tasa de preñez fue más alta cuando la primera inseminación se realizó por la mañana.

Los productores deben de usar cuidadosamente este protocolo, debido a que parece ser redituable solo cuando se usa semen económico y en zonas de estrés por calor severo.

**REFERENCIAS**

- Allahyari, I., Gharagozlou, F., Vojgani, M., Pooladzadeh, P., Mobedi, E., & Akbarinejad, V. (2023). Replacement of the first GnRH by estradiol in the breeding Ovsynch of Double Ovsynch protocol could improve fertility in Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 252, 107228. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2023.107228
- Bello, N. M., Steibel, J. P., & Pursley, J. R. (2006). Optimizing ovulation to first gnrh improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3413-3424. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72378-5
- Bijker, I., Christley, R., Smith, R., & Dobson, H. (2015). Effect of signs of oestrus disease stressors and cow activity on pregnancy rate following artificial insemination. *Veterinary Record*, 176(16), 411-411. DOI: 10.1136/vr.102776
- Bisinotto, R. S., Chebel, R. C., & Santos, J. E. P. (2010). Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3578-3587. DOI: 10.3168/jds.2010-3047
- Bossaert, P., DeCock, H., Leroy, J. L. M. R., De Campeneere, S., Bols, P. E. J., Filliers, M., Opsomer, G. (2010). Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology* 73, 1210–1219. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.01.012
- Bonilla León, L., & Sánchez Navarro, H. (2019). Semen sexado en ganado bovino. *Universidad Cooperativa de Colombia*, 1-9.
- Borchersen, S., Peacock, M. (2009). Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology*, 71(1), 59-63. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.026
- Bouquet, A., Juga, J. (2013). Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: A review. *Animal*, 7(5), 705-713. DOI: 10.1017/S1751731112002248

- Brackett, B. G., Oh, Y. K., Evans, J. F., & Donawick, W. J. (1980). Fertilization and development of cow ova. *Biology of Reproduction*, 23, 189–205. DOI: 10.1095/biolreprod23.1.189
- Brusveen, D. J., Cunha, A. P., Silva, C. D., Cunha, P. M., Sterry, R. A., Silva, E. P. B., Guenther, J. N., & Wiltbank, M. C. (2008). Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during ovsynch affects pregnancies per ai in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 1044–1052 DOI: 10.3168/jds.2007-0409
- Burnett, T., Polsky, L., Kaur, M., & Cerri, R. (2018). Effects of estrous expression on timing and failure of ovulation of Holstein dairy cows using automated activity monitos. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 11310-11320. DOI:10.3168/jds.2018-15151
- Butler, W.R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83, 211–218 DOI: 10.1016/S0301-6226(03)00112-X DOI: 10.1016/S0301-6226(03)00112-X
- Butler, S. T., Pelton, S. H., Butler, W. R. (2006). Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *Journal of Dairy Science*, 89, 2938–2951. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72566-8
- Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., Fricke, P. M., Wiltbank, M. C., Florent, M. J., Cook, N. B., Nordlund, K. V., Zwald, N. R., & Rawson, C. L. (2006). Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4723-4735. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(06)72522-X
- Cardoso Consentini, C. E., Wiltbank, M. C., Sartori, R. (2021). Factors that optimize reproductive efficiency in dairy herds with an emphasis on timed artificial insemination programs. *Animals*, 11(2), 301. DOI: 10.3390/ani11020301
- Colazo, M. G., Whittaker, P., Macmillan, K., Bignell, D., Boender, G., de Carvalho Guimaraes, R., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation of a modified GnRH-based

- timed-AI protocol associated with estrus detection in beef heifers inseminated with sex-selected or conventional semen. *Theriogenology*, 118, 90–95. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.05.037
- Córdova Izquierdo, A., Córdova Jiménez, M., Córdova Jiménez, C., & Pérez Gutiérrez, J. (2005). Comportamiento reproductivo de ganado lechero. *REDVET*, 1-4. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612652017>
- Cordova Izquierdo, A., Iglesias Reyes, A., Espinosa Cervantes, R., Guerra Liera, J., Inzunza Castro, J., Juárez Mosqueda, M., Gómez Vázquez A., Rodríguez Denis, B. (2016). Aplicación de la citometría de flujo en veterinaria. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 60-73.
- Correa, J. R., Rodríguez, M. C., Patterson, D. J., & Zavos, P. M. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46(3), 413-420. DOI: 10.1016/0093-691X(96)00163-X
- Crites, B. R., Vishwanath, R., Arnett, A. M., Bridges, P. J., Burriss, W. R., Mcleod, K. R., & Anderson, L. H. (2018). Conception risk of beef cattle after fixed-time artificial insemination using either SexedUltra™ 4M sex-sorted semen or conventional semen. *Theriogenology*, 118, 126–129. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.05.003
- Crowe, M. A., Hostens, M., & Opsomer, G. (2018). Reproductive management in dairy cows—The future. *Irish Veterinary Journal*, 71(1), 1. DOI: 10.1186/s13620-017-0112-y
- Dalton, J., Nadir, S., Bame, J., Noftsinger, M., Nebel, R., & Saacke, R. (2001). Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 84, 2413-2418 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74690-5
- De Rensis, F., Garcia-Ispierto, I., & López-Gatius, F. (2015). Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology*, 84, 659–666. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.04.021.



- DeJarnette, J. M., Marshall, C. E., Lenz, R. W., Monke, D. R., Ayars, W. H., Sattler, C. G. (2004). Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. *Journal of Dairy Science*, 87(E. Suppl), E93–E104. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)70065-X
- Diskin, M. G. (2018). Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal*, 12, s75–s84. DOI: 10.1017/S1751731118000952
- Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., & Warnick, L. D. (1998). Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 1874-1882. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75758-3
- Duarte Ortuño, A. (2019). Manual de inseminación artificial de ganado. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-53.
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C. A., Watanabe, Y. F., Vireque, A. A., Joaquim, D. C., Smith, L. C., Meirelles, F. V., Baruselli, P. S. (2011). The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science* 94, 2383-2392. . DOI: 10.3168/jds.2010-3904
- Foote, R. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *American Society of Animal Science*, 1-10. DOI: 10.2527/ANIMALSCI2002.80E-SUPPL\_21A
- Fouladi-Nashta, A. A., Gutierrez, C. G., Garnsworthy, P. C., Webb, R. (2005). Effect of dietary carbohydrate source on oocyte/embryo quality and development in high-yielding, lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction (Special Issue)*, 72,135–136. DOI: 10.1095/biolreprod.106.058578.
- Frijters, A. C. J., Mullaart, E., Roelofs, R. M. G., van Hoorne, R. P., Moreno, J. F., Moreno, O., Merton, J. S. (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, 71(1), 64-67. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.025.

- Garay, A.V., Sangerman, J. D., Rindermann, R. S., Vargas, G. A., Barrera, J. L. (2011). Determinación de la competitividad del sector agropecuario en México, 1980-2009. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(4), 501-514.
- Garnsworthy, P. C., Sinclair K. D., Webb, R. (2008). Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal* 2,1144–1152. DOI: 10.1017/S1751731108002358.
- Gernand, E., König, S., & Kipp, C. (2019). Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6660-6671. DOI: 10.3168/jds.2018-16011
- Giraldo Giraldo, J. (2019). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4(1), 51-57.
- Gong, J. G., Lee, W. J., Garnsworthy, P.C., Webb, R. (2002). Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentration during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*, 123, 419–427. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230419>
- Gong, Y., Guo, H., Zhang, Z., Zhou, H., Zhao, R., & He, B. (2017). Heat stress reduces sperm motility via activation of glycogen synthase kinase-3 $\alpha$  and inhibition of mitochondrial protein import. *Frontiers in Physiology*, 8, 718. DOI: 10.3389/fphys.2017.00718
- Goodling, R. C., Shook, G. E., Weigel, K. A., Zwald, N. R. (2005). The effect of synchronization on genetic parameters of reproductive traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 2217-2225. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72897-6
- Graves, W., Dowlen, H., Lamar, K., Johnson, D., Saxton, A., & Montgomery, M. (1997). The effect of artificial insemination once versus twice per day. *Journal of Dairy Science*, 80(11), 3068-3071. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76275-1
- Habeeb, A., Gad, A., & Atta, M. (2018). Temperature-humidity indices as indicators to heat stress of climatic conditions with relation to production and reproduction of

- farm animals. *International Journal of Biotechnology and Recent Advances*, 1(1), 35-50. DOI: 10.18689/ijbr-1000107
- Healy, A. A., House, J. K., & Thomson, P. C. (2013). Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1905-1914. DOI: 10.3168/jds.2012-5465
- Hiers, E. A., Barthle, C. R., Dahms, M. K. V., Portillo, G. E., Bridges, G. A., Rae, D. O., Thatcher, W. W., Yelich, J. V. (2003). Synchronization of Bos Indicus x Bos Taurus cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F2-alpha in combination with melengestrol acetate. *Journal of Animal Science*, 81, 830–835. DOI: 10.2527/2003.814830x.
- Hockey, C., Morton, J., Norman, S., & McGowan, M. (2010). Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle: Pregnancy rates may improve by timing AI with ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), e239-e248. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01548.x
- Holden, S.A., Butler, S.T. (2018). Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal*, 12, s97-s103. DOI: 10.1017/S1751731118000721.
- Holman, A., Thompson, J., Routly, J. E., Cameron, J., Jones, D. N., Grove-White, D., Smith, R. F., & Dobson, H. (2011). Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle. *Veterinary Record*, 169(2), 47–47. DOI: 10.1136/vr.d2344
- Holt, W. V., & Fazeli, A., (2016). Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: Hypotheses, mechanisms, and new opportunities. *Theriogenology*, 85(1), 105-112. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.019
- Huanca L. W. (2001). Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas lecheras. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 161-163. DOI: 10.15381/rivep.v12i2.1645
- Johnson L.A. (1995). Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 893-903. DOI: 10.1071/rd9950893

- Knight, C. H., Beever, D. E., Sorensen, A. (1999). Metabolic loads to be expected from different genotypes under different systems. Metabolic stress in dairy cows. *British Society of Animal Science Occ Publication*, 24, 37–36.
- Kuhn, M., Hutchison, J., & Wiggans, G. (2006). Characterization of Holstein heifer fertility in the United States. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4907–4920. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72541-3
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K., (2019). Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), 603–612. DOI: 10.1089/bio.2019.0037
- Kurykin, J., Jalakas, M., Kaart, T., & Jaakma, Ü. (2017). Efficiency of insemination with sexed semen at spontaneous estrus and synchronization of ovulation in lactating Holstein cows. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 75(97), 30–35.
- Lemley, C. O., Butler, S. T., Butler, W. R., Wilson, M. E. (2008). Short communication: insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P450 2C and 3A in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 641–645. DOI: 10.3168/jds.2007-0636
- Lara G. (2020). Dairy and Products Annual, Mexico. Global Agricultural Information Network. Report Number: MX2020-0059.
- Lauber, M. R. (2020). Short communication: Effect of timing of induction of ovulation relative to timed artificial insemination using sexed semen on pregnancy outcomes in primiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10856–10861. DOI: 10.3168/jds.2020-18836
- Lenz, R. W., Gonzalez-Marin, C., Gilligan, T. B., DeJarnette, J. M., Utt, M. D., Helser, L. A., Hasenpusch, E., Evans, K. M., Moreno, J. F., & Vishwanath, R., (2017). 190 sexedultra™, a new method of processing sex-sorted bovine sperm improves conception rates. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(1), 203.

- LeRoy, C. N. S., Walton, J. S., & LeBlanc, S. J. (2018). Estrous detection intensity and accuracy and optimal timing of insemination with automated activity monitors for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1638-1647. DOI: 10.3168/jds.2017-13505
- Loera, J., Banda, J. (2017). Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Revista de Investigación Altoandina*, 19 (4), 419 - 426. DOI: 10.18271/ria.2017.317
- López-Gatius, F., Hunter, R. H. F. (2011). Intrafollicular insemination for the treatment of infertility in the dairy cow. *Theriogenology*, 75, 1695–1698. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.01.006
- Lopez-Gatius, F. (2000). Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology*, 53, 1407-1414. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00283-1
- López-Gatius, F. (2022). Revisiting the timing of insemination at spontaneous estrus in dairy cattle. *Animals*, 12(24), 3565. DOI: 10.3390/ani12243565
- Lyashenko, A. (2015). Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 17-21. DOI: 10.1016/S2305-0500(14)60051-8
- Marizancén Silva, M. A., & Artunduaga Pimentel, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 247-259. DOI:10.22490/21456453.2050
- Mellado, M., Zuñiga, A., Veliz, F. G., de Santiago, A., García, J. E., & Mellado, J. (2012). Factors influencing pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder cows induced to ovulate with a CIDR-based protocol. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4), 105-111. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.001.
- Mellado, M., Sepulveda, A., Meza-Herrera, C., Veliz, F., Arevalo, J., Mellado, J., & De Santiago, A. (2013). Effects of heat stress on reproductive efficiency in High yielding Holstein cows in a hot arid environment. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, 193-200.

- Mellado, M., Sepulveda, E., Macias-Cruz, U., Avendaño, L., Garcia, J. E., Veliz, F. G., & Rodríguez, A. (2014). Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 265-269.
- Mellado, M., Lara, L.M., Veliz, F.G., Santiago, M.A.D., Avendaño-Reyes, L., Meza-Herrera, C., Garcia, J.E. (2015). Conception rate of artificially inseminated Holstein cows affected by cloudy vaginal mucus, under intense heat conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50, 492–498. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000600008
- Miller, D. J. (2018). Review: The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *Animal*, 12, s110-s120. DOI: 0.1017/S1751731118000526
- Morales, J., & Cavestany, D. (2012). Anestro posparto en vacas lecheras: tratamientos hormonales. *Veterinaria*, 48(188), 19-27.
- Mulu, M., Moges, N., Adane M. (2018). Review on process, advantages and disadvantage of artificial insemination in cattle. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 3(6), 8-13.
- Nagata, M. B., Egashira, J., Katafuchi, N., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Hashiyada, Y., & Yamashita, K., (2019). Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 91. DOI:10.1186/s40104-019-0395-9
- NCR. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle Acad. Sci. (7th rev. ed.). Natl.
- Núñez, J.M. (2016). Productividad, comercialización y calidad de vida en los productores lecheros de la Ciénega de Jalisco, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 38:367-376.

- Oses, M., Teruel, M., & Cabodevila, J. (2016). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Revista Veterinaria*, 10(2), 60-73. DOI: 10.30972/vet.2021867
- Perry, G. A., Smith, M. F., Lucy, M. C., Green, J. A., Parks, T. E., MacNeil, M. D., Roberts, A. J., & Geary, T. W. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5268-5273.
- Peters, J. L., Senger, P. L., Rosenberger, J. L., O'Connor, M. L. (1984). Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman-inseminators using 0.5 and 0.25-ml French straws. *Journal of Animal Science*, 59,1671–83. DOI: 10.2527/jas1984.5961671x.
- Pursley, J. R., Mee, M. O., & Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 44(7), 915-923.
- Pursley J. R., Kosorok M. R., Wiltbank M. C. (1997a). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science*, 80, 301–306.
- Pursley J. R., Wiltbank M. C., Stevenson J. S., Ottobre J. S., Garverick H. A., Anderson L. L. (1997b). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*, 80, 295–300.
- Pursley, J., Silcox, R., & Wiltbank, M. (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 2139-2144. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75790-X
- Rahman, M., Vandaele, L., Rijsselaere, T., El-Deen, M., Maes, D., Shamsuddin, M., & Van Soom, A. (2014). Bovine spermatozoa react to in vitro heat stress by activating the mitogen-activated protein kinase 14 signaling pathway. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(2), 245-257. DOI: 10.1071/RD12198.

- Rejeb, M., Sadraoui, R., Najar, T., & M'rad, M. (2016). A complex interrelationship between rectal temperature and dairy cows performance under heat stress conditions. *Open Journal of Animal Sciences*, 93(4), 24-30. DOI: 10.4236/ojas.2016.61004
- Rivera, F., Narciso, C., Oliveira, R., Cerri, R., Correa-Calderon, A., Chebel, R., & Santos, J. (2010). Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 4, 1500–1510. DOI: 10.3168/jds.2009-2489.
- Roca Cedeño, A. (2011). Efecto del estrés calórico en el bienestar animal, una revisión en tiempo de cambio climático. *Espamciencia*, 2(1), 15-25.
- Rocha de Souza, F., Campos, C. C., Marques da Silva, N, dos Santos R. (2016). Influence of seasonality, timing of insemination and rectal temperature on conception rate of crossbred dairy cows. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 37, 155-162.
- Roelofs, J., Graat, E., Mullaart, E., Soede, N., Voskamp-Harkema, W., & Kemp, B. (2006). Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology*, 66(9), 2173-2181. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.07.005.
- Roth, Z. (2020). Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat stress—Experiences from the past and lessons for the present. *Theriogenology*, 155, 150-156 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.05.040.
- Saacke, R. (2008). Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology*, 70(3), 479–484. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.015.
- SADER. (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios. CDMX: Dirección de Análisis Estratégico.
- SAGARPA. (2018). Crece la producción de leche en México: SAGARPA. CDMX: Representación AGRICULTURA Colima.



- Saint-Dizier, M., Mahé, C., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermillod, P., & Druart, X., (2020). Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 516, 110956. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110956
- Saldarriaga, E. (2009). Análisis comparativo entre inseminación artificial a tiempo fijo e inseminación artificial a celo detectado, con sus variables económicas y reproductivas. *Corporación Universitaria Lasallista*.
- Sales, J. N. (2011). Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, 76(3), 427-435. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.019
- Salomón, J.M., Ramírez, A.B. (2018). Panorama sobre la producción y el consumo de leche y lácteos en México. *Hitos de Ciencias Económico Administrativas*, 24(70), 518-534.
- Sammad, A., Umer, S., Shi, R., Zhu, H., Zhao, X., & Wang, Y. (2020a). Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(4), 978-986. DOI: 10.1111/jpn.13257.
- Sammad, A., Wang, Y. J., Umer, S., Lirong, H., Khan, I., Khan, A., Ahmad, B., & Wang, Y. (2020b). Nutritional physiology and biochemistry of dairy cattle under the influence of heat stress: Consequences and opportunities. *Animals*, 10(5), 793. DOI: 10.3390/ani10050793
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J.N., Parrish, J. J., Wiltbank, M.C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85, 2803-2812. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1.
- Seidel G.E. (2011). Profitable uses of sex-sorted semen. In Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Joplin Missouri, USA, pp. 349–352.
- Seidel Jr, G.E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8, 160-164.

- SIAP-SAGARPA. (2014). Panorama de la lechería en México. Consultado en diciembre 2023. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>
- Sinclair KD, Webb R. (2005). Fertility in the modern dairy heifer. In: Garnsworthy PC, editor. Calf and heifer rearing: principles of rearing the modern dairy heifer from calf to calving. Nottingham, UK: Nottingham University Press; p. 277–306
- Tamminga, S., Luteijn, P. A., Meijer, R. G. M. (1997). Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livestock Production Science*, 52, 31–38. DOI: 10.1016/S0301-6226(97)00115-2
- Tsuruta, S., Keown, J. F., Van Vleck, L.D., & Misztal, I. (2000). Bias in genetic evaluations by records of cows treated with bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2650-2656. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75158-7.
- Ullah, G., Fuquay, J. W., Keawkhong, T., Clark, B. L., Pogue, D. E., & Murphey, E. J. (1996). Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating holsteins during heat stress. *Journal of Dairy Science*, 79(11), 1950-1953.
- Vanholder, T., Leroy, J.L.M.R., Dewulf, J., Duchateau, L., Coryn, M., de Kruif, A., Opsomer, G. (2005). Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reproduction Domestic Animal*;40:460–7. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2005.00601.x.
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Rosa, G. J. M., Pursley, J. R., & Wiltbank, M. C. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52(6), 1067-1078.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., De Pauw, I., Dewulf, J., Vervaeke, C., de Kruif, A. (2004). Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology* 61, 103–115. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00186-9
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., Thys, M., de Kruif, A. (2005). Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology*, 64, 1716–1728. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.04.017.

- Vishwanath, R., y Moreno, J. F. (2018). Review: Semen sexing – current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal*, 12(1), 85–96.
- Wang, J., Li, J., Wang, F., Xiao, J., Wang, Y., Yang, H., Li, S., & Cao, Z., (2020). Heat stress on calves and heifers: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 79.
- Wolfenson, D., Inbar, G., Roth, Z., Kaim, M., Bloch, A., & Braw-Tal, R. (2004). Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, 62(6), 1042-1055.
- Xu, Z., Johnson, D., Burton, L. (2000). Factors affecting the sex ratio in dairy cattle in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 60, 301-302
- Yan, G., Liu, K., Hao, Z., Shi, Z., & Li, H. (2021). The effects of cow-related factors on rectal temperature, respiration rate, and temperature-humidity index thresholds for lactating cows exposed to heat stress. *Journal of Thermal Biology*, 100(103), 041. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2021.103041.
- Yaniz J. L., Murugavel K., López-Gatius F. (2004). Recent developments in oestrous synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disorders. *Reproduction in Domestic Animals* 39, 86–93.