



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**USO DE CAMISA SANITARIA EN LA CÁNULA DE  
INSEMINACIÓN PARA MEJORAR LA TASA DE PREÑEZ EN  
BOVINOS**

**Lourdes Rosalía Morales González**

**TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL  
OPCIÓN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
URUGUAY**

**2023**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**USO DE CAMISA SANITARIA EN LA CÁNULA DE  
INSEMINACIÓN PARA MEJORAR LA TASA DE PREÑEZ EN  
BOVINOS**

**Lourdes Rosalía Morales González**

Alejo Menchaca  
Director  
DMV, Msc., PhD

Richard Núñez Olivera  
Co-director  
DMV, Msc., PhD

**2023**

iii

# **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

## **DEFENSA DE TESIS**

**Jorge Gil; DVM, MSc, PhD**  
**Facultad de Veterinaria**  
**CENUR Litoral Norte, UdelaR**

**Gustavo Gastal; DMV, MSc, PhD**  
**Plataforma de Salud Animal**  
**INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.**

**Isabel Vazquez; DMV, MSc, PhD**  
**Unidad Académica de Reproducción Animal**  
**Facultad de Veterinaria, UdelaR**

**2023**

# ACTA DE DEFENSA DE TESIS



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

## ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: REPRODUCCION ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 5 de mayo de 2023

TRIBUNAL: JORGE GIL, GUSTAVO GASTAL, ISABEL VÁZQUEZ

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
5255843-5	MORALES GONZALEZ, LOURDES ROSALIA	SSS	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Gustavo Gastal

Dra. Isabel Vázquez

Dr. Jorge Gil

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer en primera instancia a mi tutor Alejo Menchaca, por su dirección, compartir sus conocimientos, experiencia y por el incentivo e impulso para realizar la tesis de maestría. También a mi co-tutor Richard Núñez por su gran ayuda en el análisis de los datos, redacción de esta tesis, pero sobre todo por la paciencia y dedicación para ayudarme siempre que lo necesité.

A mis compañeros del IRAUy, Federico Cuadro, Camila García Pintos, Camila Brochado y Marcela Souza que de una forma u otra colaboraron y me ayudaron un montón.

A Sergio Kmaid y Guillermo Brogliatti por brindarnos las camisas utilizadas en el trabajo

A Waldemir Santiago Neto por la ayuda con los datos y análisis estadístico

A Mi familia y amigos por estar siempre y por su apoyo incondicional que me animan a seguir superándome día a día.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue determinar el efecto del uso de una camisa sanitaria colocada sobre la pipeta de inseminación previo al ingreso al tracto reproductivo de la hembra sobre la tasa de preñez en bovinos. Se realizaron dos experimentos en hembras *Bos taurus* de carne y de leche. En el Experimento I se utilizaron 9.217 vacas y vaquillonas Angus y Hereford en 27 repeticiones, y en el Experimento II se utilizaron 1.244 vacas Holstein en 66 repeticiones. Las hembras recibieron un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) o se aplicó un esquema de detección de celo (IACD), y en cada repetición al momento de la inseminación artificial (IA) fueron asignadas a uno de dos grupos experimentales para recibir o no una camisa plástica sanitaria sobre la cánula de inseminación. Esta camisa sanitaria cumple la función de proteger la pipeta de inseminación de la contaminación externa durante el procedimiento de ingreso al tracto reproductivo, es decir desde que se arma la pipeta con el semen hasta que se alcanza la entrada del cuello uterino. La tasa de preñez se determinó mediante ultrasonografía entre los 30 y 40 días después de la inseminación. El uso de camisas sanitarias en las vacas de carne incrementó la tasa de preñez (55,9 %; 2.578/4.613 vs. 53,4 %; 2.458/4.604; para las vacas con o sin camisas, respectivamente;  $P < 0,01$ ), y mostró una tendencia en vacas de leche (50,2%; 381/759 vs. 46,8%; 589/1259 para vacas con o sin camisa, respectivamente;  $P = 0,09$ ). No se observó ninguna interacción entre el uso de camisas sanitarias y las diferentes variables evaluadas (categoría, inseminadores, establecimientos, número de servicios, número de lactancias y toro utilizado). En conclusión, los resultados muestran que la utilización de camisas sanitarias para proteger la pipeta previo a la IA mejora la tasa de preñez en ganado de carne, alcanzando una tendencia estadística en ganado de leche. Considerando estos resultados obtenidos en condiciones comerciales y a gran escala, sugerimos que podría ser recomendable el uso de la camisa sanitaria en programas de inseminación en bovinos.

## ABSTRACT

This thesis work aimed to determine the effect of the use of a sanitary sheath placed over the insemination pipette upon entering the reproductive tract of the female on the pregnancy rate in bovines. Two experiments were conducted on *Bos taurus* beef and dairy females. In Experiment I, 9,217 Angus and Hereford cows and heifers were used in 27 repetitions, and in Experiment II, 1,244 Holstein cows were used in 66 repetitions. The females received a protocol of fixed time artificial insemination (FTAI) or estrous detected artificial insemination (EDAI), and in each repetition at the time of the artificial insemination (AI) they were assigned to one of two experimental groups to receive or not a sanitary plastic sheath on the insemination pipette. This sanitary sheath has the function of protecting the insemination pipette from external contamination during entry into the reproductive tract, from the moment the pipette is armed with the semen until it reaches the cervix. The pregnancy rate was determined by ultrasonography between 30 and 40 days after insemination. The use of sanitary sheath in beef cows increased the pregnancy rate (55.9 %; 2,578/4,613 vs. 53.4 %; 2,458/4,604; for cows with or without sheath, respectively;  $P < 0.01$ ), and showed a trend in dairy cows (50.2%; 381/759 vs. 46.8%; 589/1259 for cows with and without sheath, respectively;  $P = 0.09$ ). Was not observed interaction between the use of sanitary sheath and the different variables evaluated (category, inseminators, farms, number of services, lactation number and bull used). In conclusion, the results show that the use of sanitary sheath to protect the pipette before to AI improves the pregnancy rate in beef cattle, with a statistical trend in dairy cattle. Considering these results obtained under commercial conditions and on a large scale, we suggest that the use of the sanitary sheath in bovine insemination programs could be recommended.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
TABLA DE CONTENIDO .....	ix
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA .....	9
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVOS .....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
CAPÍTULO 2.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
METODOLOGÍA GENERAL.....	11
Animales, manejo general e instalaciones.....	11
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	12
Experimento I .....	12
Experimento II .....	14
Análisis estadístico.....	15
CAPÍTULO 3.....	16
RESULTADOS.....	16
Experimento I .....	16
Experimento II .....	19
CAPÍTULO 4.....	21
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	25
Implicancias prácticas.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

### INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas comprenden diversas técnicas que favorecen la eficiencia reproductiva y el mejoramiento genético de los animales, contribuyendo de esta forma a mejorar la producción ganadera. Entre estas tecnologías, la inseminación artificial (IA) quizás sea la herramienta más empleada a nivel global y posiblemente la que ha generado mayor impacto en la mejora de los rodeos en todo el mundo, tanto en ganadería de carne como en lechería (Shearer, 2003).

Si bien la IA es una biotecnología desarrollada hace varias décadas, su adopción a gran escala por el sector productivo se había visto limitada por diferentes motivos, algunos de ellos vinculados con limitantes en la fertilidad y el anestro posparto, la dificultad operativa de detectar celo en vacas con cría al pie, la necesidad de contar con la alimentación necesaria para implementar programas de IA exitosos, y requerir personal dedicado exclusivamente a la IA por periodos prolongados. Sin embargo, en los últimos 20 años estas dificultades han sido superadas casi en su totalidad mediante el uso de protocolos de sincronización que controlan el desarrollo folicular y la ovulación permitiendo la IA de un gran número de animales sin la necesidad de detectar celo, aun cuando las vacas se encuentren en anestro posparto. Esta tecnología, conocida como inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), en los últimos años ha mostrado una creciente adopción por los productores en prácticamente todos los países, en particular en Sudamérica, Norteamérica y Oceanía (Mapletoft et al., 2018). La IATF es probablemente la biotecnología de la reproducción que ha mostrado mayor crecimiento en los últimos años, y es utilizada en diferentes condiciones a través de un importante número de profesionales que la aplican sin mayor dificultad y con resultados aceptables (Menchaca et al. 2013a).

La eficiencia reproductiva de los rodeos puede medirse como el porcentaje de vacas preñadas sobre las vacas destinadas a la reproducción, y este indicador conocido como tasa de preñez está determinado por diversos factores. Cuando esta eficiencia es menor a la esperada, no siempre es debido a una baja tasa de fecundación del ovocito como habitualmente se cree. Diferentes estudios han demostrado que la tasa de fecundación luego de una IA en bovinos es cercana al 90%, es decir que en la gran mayoría de las hembras ocurre la

concepción. En vacas de carne se ha reportado que la tasa de fecundación es 98% (rango de 94 a 100%) en multíparas no lactantes y 75% (rango de 60 al 100%) en lactantes (Breuel et al. 1993), y en vaquillonas se han reportado datos del 88% (rango 75 a 100%) (Dunne et al., 2000). En ganado lechero se ha reportado tasas de fecundación similares entre vacas lactantes y no lactantes, siendo 76,2% (rango de 55,3 a 87,8%) y 78,1% (rango de 58,0 a 98,0%), respectivamente (Sartori et al., 2002). Sin embargo, aun cuando se reportan altas tasas de fecundación, la tasa de preñez a los 30 días -momento en que habitualmente se realiza el diagnóstico de gestación- no supera el 50 o 60% en ganado de carne (Menchaca et al., 2013b), y 40 o 50% en ganado de leche (Sartori et al., 2002). Esta diferencia está indicando que seguramente existe una alta tasa de pérdidas o fallas en la gestación durante este periodo, es decir entre la concepción y los primeros 30 días de gestación.

Las pérdidas de gestación son un componente importante de las fallas reproductivas y de la baja eficiencia de la reproducción en la ganadería bovina. Varios estudios en vacas de carne y leche estimaron que las pérdidas embrionarias tempranas (entre 8 y 25 días de gestación) están en el rango de 20% a 45%, y las pérdidas embrionarias tardías (entre 26 y 45 días de gestación) en el rango de 8% a 17,5% (Humblot, 2001; Dunne et al., 2000). Este y otros estudios indican que la mayoría de las pérdidas por mortalidad embrionaria se producen dentro de las primeras tres semanas de gestación (Inskeep y Dailey, 2005; Diskin y Morris, 2008; Reese et al., 2020). Estas pérdidas pueden deberse a diferentes factores, ya sean genéticos, de manejo, estrés, problemas infecciosos, pobre actividad ovárica preovulatoria, mala calidad embrionaria y/o inapropiado ambiente y funcionalidad uterina (Wiltbank et al., 2016; Reese et al., 2020; Diskin y Morris, 2008). Cuando nos referimos a las pérdidas de gestación luego de la IA, también deben considerarse factores asociados a la aplicación de la técnica de inseminación que pueden afectar el establecimiento y mantenimiento de la gestación.

### **Inseminación artificial: factores que afectan el éxito de esta tecnología**

La eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen a mejorar el retorno económico de una explotación ganadera. La tasa de preñez y su distribución a lo largo del año, tienen un impacto económico muy importante en un establecimiento dedicado a la ganadería. Para que se logre con éxito la concepción en el ganado bovino, en rodeos clínicamente sanos y sin problemas de enfermedades infecciosas, es importante tener en cuenta algunos factores como la manifestación del estro y la ovulación, el buen estado de los gametos, y un ambiente uterino adecuado para que se logre la fecundación y establecimiento de la gestación.

Los diversos factores que afectan el éxito reproductivo son clasificados por algunos autores en tres grandes grupos; el primero depende de la correcta aplicación de la técnica, el segundo corresponde a factores asociados a la vaca (edad, raza, número de lactancias en vacas de leche, presencia del ternero en vacas de carne, entre otros), y el tercero está compuesto por factores ambientales (clima, manejo, alimentación, etc.) (Senger, 1980). Entre los factores vinculados a la correcta aplicación de la técnica se incluyen la habilidad del técnico inseminador (atravesar el cérvix y depositar el semen en el lugar apropiado, sin causar daños en el tracto reproductor de la hembra), la higiene durante el procedimiento, la calidad del semen, la detección eficiente del celo y el momento de la IA (Wattiaux, 1999). Se han reportado variaciones considerables en las tasas de preñez a la IA entre diferentes inseminadores (Buckley et al., 2003), lo que puede contribuir a un desempeño reproductivo y económico subóptimo de los rodeos. Es reconocido por los técnicos vinculados a la reproducción en bovinos que la habilidad del inseminador es un factor crucial que influye en el éxito de los programas (Diskin, 2018), y que los inseminadores más experimentados logran tasas de preñez más altas en comparación con aquellos menos experimentados (Morton, 2004). Estos estudios sugieren que la falta de capacitación y experiencia suficiente, o quizás también la falta de higiene durante el procedimiento, podría resultar en prácticas de IA subóptimas y tasas de preñez comprometidas. El reentrenamiento de los inseminadores para mejorar su destreza es un punto importante en el éxito de la técnica. En uno de los estudios en los que se evaluó la importancia del reentrenamiento de los inseminadores, se demostró que la tasa de no retorno al celo obtenida luego del reentrenamiento fue significativamente mayor que previo a dicho entrenamiento (Graham, 1996). En otro estudio se evaluó el sitio donde depositaban el semen los inseminadores (Peters et al., 1984), y se encontró que aun con inseminadores experimentados, sólo en el 40% de las inseminaciones el semen era colocado en el cuerpo del útero (lugar correcto para depositarlo), el 17% en el cérvix, y el 43% en los cuernos. Estos estudios en conjunto confirman la importancia de la destreza del inseminador y del reentrenamiento para mejorar los resultados de los programas comerciales. Por otra parte, se tiene que considerar que es común que con el tiempo los técnicos vayan descuidando detalles sencillos pero que pueden ser importantes como la temperatura y el tiempo de descongelado, o la manipulación de la pajuela, o las medidas de higiene en el armado de la pipeta y en el momento de la IA. Estos aspectos en general suelen no ser considerados con suficiente atención en predios comerciales, en ocasiones son actividades que quedan en manos de operarios no profesionales, que cumplen múltiples funciones, con escaso nivel de capacitación o reentrenamiento, y esto puede ocurrir tanto en establecimientos ganaderos como lecheros, grandes y pequeños.

## **Microbiota vaginal y uterina**

Desde hace algunos años es conocido en algunas especies que el epitelio del cuello uterino y vaginal contiene una microbiota específica del sitio, cuya composición puede variar dependiendo de varios factores (especie, edad, etapa del ciclo reproductivo, enfermedades, tratamientos hormonales, estrés, entre otros) (Uchihashi et al., 2015; Chen et al., 2020; France et al., 2022). En general, la función natural de la microbiota vaginal en humanos y otros mamíferos parece favorecer la función reproductiva, a través de la protección contra infecciones y la provisión de aptitud inmunológica, que son esenciales para la salud del endometrio, la fertilidad, la implantación del embrión y el éxito de la preñez (Fraga et al., 2011; Clemmons et al., 2017; Martinez-Ros et al., 2018). En general, la microbiota vaginal es dinámica y está en constante cambio en todas las especies. Swartz et al. (2014) compararon los microbiomas vaginales de las especies bovina y ovina a la de los humanos. Llegaron a la conclusión de que estos últimos presentan un ambiente vaginal más cerca del pH neutro debido a una menor abundancia de *Lactobacillus* (Swartz et al., 2014). Los autores indican que esta información es de utilidad para mostrar que el ambiente vaginal y uterino está influenciado por la microbiota que normalmente ocupa estos órganos, y que de alguna manera también afecta la fertilidad de la hembra.

La vagina y el útero están en comunicación con el ambiente externo y por lo tanto se ven expuestos a diversos factores que presumiblemente pueden afectar la microbiota en este sitio. Por ejemplo, algunos dispositivos utilizados con frecuencia para controlar la ovulación como las esponjas o dispositivos intravaginales de progestágenos para la sincronización del estro en rumiantes (Quereda et al., 2020, Manes et al., 2010), o los catéteres para la IA (Benner et al., 2018), entre otros, pueden ser vehículos de microorganismos que contaminan el fondo de la vagina y el útero. Este ingreso de microorganismos servirá para establecer interacciones entre la microbiota endógena y exógena y esto podría modificar el ambiente vaginal y quizás también el uterino (Toson et al., 2022). Cualquier desequilibrio en la composición con la microbiota (conocida como disbiosis) interrumpe la homeostasis, lo que induce una respuesta inflamatoria y altera el perfil metabólico fisiológico de un organismo (Galvão et al., 2019). Como conclusión, la disbiosis vaginal se ha asociado repetidamente con el estado del endometrio, la infertilidad o los malos resultados de preñez en todas las especies de mamíferos estudiadas (Fu et al., 2020; Wang et al., 2016; Moreno et al., 2022). Por lo tanto, la identificación de microorganismos en la superficie de la mucosa cérvico-vaginal puede ser de utilidad para predecir, o comprender, los resultados de la IA y preñez cuando se aplican tecnologías reproductivas (Srinivasan et al., 2021).

Por otra parte, en el oviducto tienen lugar eventos importantes como la capacitación de los espermatozoides, la fecundación y el desarrollo temprano

del embrión dentro de una cascada de señalización compleja (Jin et al., 2017). La información disponible sobre los microorganismos que pueden habitar o transitar por el oviducto es escasa, aunque se han propuesto interesantes interacciones entre gametos y bacterias oviductales no patógenas. Por ejemplo, existe evidencia que muestra que el semen suele contener una microbiota rica y diversa (Cojkic et al., 2021; Farahani et al., 2021; Koziol et al., 2022). En consecuencia, la fecundación no puede ocurrir bajo condiciones estériles, pero tampoco es viable que ocurra con alteraciones en el ambiente uterino que impidan el proceso de fecundación e implantación del embrión. El útero juega un papel clave en la implantación y el desarrollo embrionario, dos funciones en las que la implicancia del sistema inmunitario endometrial es especialmente relevante. Se ha demostrado que durante y después del parto, la luz uterina de casi todas las vacas se contamina con una variedad de microorganismos de la piel, el tracto gastrointestinal, las heces y el ambiente externo al animal (Sheldon et al., 2009). Debido a los avances tecnológicos (p. ej., el desarrollo de procedimientos moleculares para identificar la microbiota), la sensibilidad de la investigación del microbioma mejoró significativamente (Eisenhofer et al., 2019). Es así que varios autores han afirmado que el útero de diferentes mamíferos alberga una microbiota específica de sitio, que parece ser diferente de la que existe en la vagina (Diaz-martínez et al., 2021; Wang et al., 2021). En general, la microbiota endometrial muestra una mayor diversidad y riqueza bacteriana en comparación con la vagina y el cuello uterino en una variedad de especies animales como bovinos, equinos y humanos (Heil et al., 2019; Diaz-martínez et al., 2021). Varias rutas y fuentes han sido postuladas hasta ahora para explicar el origen de las bacterias que hipotéticamente llegan al entorno uterino. En primer lugar, se ha sugerido que algunas de ellas pueden surgir del torrente sanguíneo y ha sido descrito como una vía de transmisión de patógenos uterinos desde el intestino hasta el útero en vacas (Jeon et al., 2017). Otras bacterias pueden ingresar desde la vagina y alcanzar la mucosa endometrial ascendiendo por el cuello uterino. En efecto, un estudio reciente ha sugerido que la transferencia de microorganismos vaginales puede estar involucrada en el deterioro o la protección del ambiente uterino, dependiendo del tipo de microorganismo (Pascottini et al., 2020). Esta ruta de ingreso microbiano desde la vagina hacia la formación de nuevos microbiomas uterinos, tiene la capacidad de repercutir en el eje reproductivo y la gametogénesis, ya que por ejemplo se ha demostrado que la acción de ciertas bacterias puede inducir la inhibición de la respuesta de las gonadotropinas y afectar negativamente el desarrollo folicular (Franasiak y Scott, 2015).

Una microbiota uterina apropiada es de gran importancia, no solo por su papel potencial en la fertilidad, sino también por su posible efecto sobre endometritis y otras enfermedades uterinas, que conducen a la infertilidad principalmente en vacas con consecuencias graves para la ganadería (Santos et

al., 2011, Jeon et al., 2015, Galvão et al., 2019). La importancia relativa de los contaminantes vaginales que pueden introducirse en el útero de las vacas en el momento de la IA y la fertilidad subsiguiente sigue siendo poco claro, aunque sí se ha demostrado que la presencia de semen en la luz uterina desencadena una respuesta inmunitaria local caracterizada por una entrada de neutrófilos en el aparato reproductor femenino (Schuberth et al., 2008; Troedsson, 2006). Aún falta información sobre esta reacción del endometrio ya sea en respuesta al semen, a contaminantes, o agentes externos en el momento de la IA.

### **Endometritis subclínica**

La endometritis subclínica ha sido ampliamente estudiada durante el periodo posparto en vacas y se define como la inflamación del endometrio en ausencia de signos clínicos y con flujo uterino normal, con la presencia de polimorfonucleares (PMN) en la luz uterina (Kasimanickam et al., 2004; Prunner et al., 2014; Sheldon et al., 2006). Esta endometritis afecta la eficiencia reproductiva de las hembras al aumentar los intervalos parto-concepción, parto-primer servicio, así como también, la cantidad de servicios necesarios por preñez (Gilbert et al., 2005; Kasimanickam et al., 2004; Madoz et al., 2014). La endometritis subclínica es detectada solo por la presencia de PMN en la luz uterina sin estar acompañada de descargas uterinas (Sheldon et al., 2004). Debido a que se presenta en vacas clínicamente sanas, es decir animales con flujo vaginal normal y sin signos clínicos sistémicos evidentes, no es normalmente diagnosticada. Por lo tanto, aquellas vacas que no muestran ningún indicio de trastorno reproductivo pueden igualmente estar padeciendo de endometritis subclínica, y como consecuencia de esto, no sea óptima la fertilidad que pueda ser lograda de esa hembra al finalizar el período de espera voluntario. En el mismo sentido, Martínez et al., 2006 menciona, que la endometritis subclínica se encuentra entre las causas que llevan al fracaso en la gestación y repetición de celos, siendo difícil el diagnóstico ya que los signos clínicos suelen pasar desapercibidos. Si bien la endometritis subclínica está ampliamente estudiada luego del parto, no está del todo clara la respuesta del útero luego del procedimiento de inseminación. Es sabido que todo ingreso de agentes contaminantes en el útero durante el procedimiento de canulación puede inducir una respuesta a nivel local, y en ese caso esto podría afectar el éxito de esta técnica.

## **Endometritis subclínica post inseminación**

Durante la IA intrauterina no solo se introduce semen en la luz del útero sino también se favorece el acceso de microorganismos, un aspecto que está bastante estudiado en la yegua (Bogado y Opsomer, 2016). Si bien en bovinos no está claramente establecido que exista contaminación uterina y que esto desencadene una respuesta inflamatoria, algunos trabajos sugieren que esto podría generar cierto grado de endometritis lo que afectaría la fertilidad de la hembra (Sheldon et al., 2009). Por ejemplo, Morrell (2006) describe que la contaminación bacteriana del semen y la vagina durante el proceso de IA puede causar endometritis y reducir las tasas de preñez. Gilbert (2011) indica que un ambiente uterino con ciertas condiciones propias de la inflamación disminuye la motilidad del espermatozoide, la maduración de los ovocitos, función del cuerpo lúteo y calidad embrionaria. En un estudio se recogieron muestras de citología uterina de vacas lecheras 4 h después de la IA para la determinación de células polimorfonucleares (PMN) como indicador de endometritis subclínica luego de la IA (Kaufmann et al., 2009). Se demostró que aquellas con una mayor presencia de PMN en el útero luego de la IA resultaron con tasas de concepción más bajas (Kaufmann et al., 2009). En conjunto, estos estudios sugieren que la contaminación durante la IA perjudica la reproducción exitosa al afectar etapas cruciales como el transporte espermático, la fecundación o el desarrollo embrionario temprano. Un ambiente uterino hostil en estas etapas causa daño a los gametos y embriones, lo que perjudicaría el desempeño reproductivo de las vacas.

La infiltración de linfocitos que induce una endometritis subclínica, puede ser causada por la introducción de bacterias durante la IA o la monta, o por la presencia de los espermatozoides en el útero. El moco cervical posee altas cantidades de leucocitos, los cuales tienen la propiedad de impedir la introducción de agentes perjudiciales para la fecundación tales como microorganismos, impurezas o agentes extraños, o espermatozoides muertos (Hafez, 2002). En hallazgos bacteriológicos y patológicos en vaquillonas clínicamente diagnosticadas como infértiles, se atribuyó el origen de la salpingitis a la extensión directa de la endometritis a través del cérvix. En la IA el semen es depositado directamente en el útero, por lo tanto, se atraviesa la barrera natural de la entrada del cérvix donde normalmente están presentes diversas sustancias secretadas durante el estro (Maurino et al., 2012). En general, esta información sugiere que la canulación del útero durante la IA asociado a una higiene inadecuada durante este procedimiento, podría generar una exposición del útero al medio externo y facilitar la colonización del tracto reproductivo con ciertos microorganismos (Givens y Marley, 2008), induciendo una respuesta inflamatoria incluso sin manifestaciones clínicas, afectando negativamente la fertilidad (Dubuc et al., 2010; Sheldon et al., 2006).

## **Uso de camisa sanitaria**

Con el objetivo de proteger la pistola y la cánula de IA de la contaminación ambiental y vaginal previo a la canulación del útero, se ha propuesto el uso de una funda protectora de nylon conocida como camisa sanitaria. Esta camisa de nylon se coloca sobre la pistola de IA una vez armada con la cánula conteniendo la pajuela de semen, de tal manera que protege la cánula evitando la contaminación durante el ingreso a través de la vulva y vagina hasta justo antes de ingresar al cuello uterino, momento en que se retira dicha camisa tirando de la misma hacia la base de la pipeta de IA. Esta camisa pretende evitar la contaminación y el ingreso de patógenos al ambiente uterino que pueda afectar de manera negativa la fertilidad de las vacas. Si bien el objetivo final al proteger la pipeta de IA es incrementar la tasa de preñez de las vacas, es escasa la información que muestre de manera clara y contundente el beneficio sobre la fertilidad de utilizar dicho dispositivo en vacas de carne y de leche manejadas en condiciones comerciales y a gran escala. En esta sección se resume la información científica disponible con el uso de camisas sanitarias.

Uno de los primeros estudios utilizando camisas sanitarias (Richards et al., 1984) consistió en la toma de muestras colectadas con hisopo de la pistola de IA inmediatamente después de la IA en vacas de leche y carne. Los autores reportaron que el uso de estas camisas fue efectivo para disminuir la contaminación de la pipeta de IA. Sin embargo, en este estudio no se determinó la fertilidad obtenida con el uso de estas camisas.

En otros estudios en los que sí se evaluó la fertilidad con el uso de camisas sanitarias, los resultados son poco claros o controvertidos. Algunos autores no encontraron una mejora significativa en la tasa de no retorno en ganado lechero (King et al., 1984; Richards et al., 1984) ni en la tasa de preñez en ganado de carne (Kasimanickam, 2016). Sin embargo, otros autores han encontrado resultados positivos con el uso de camisas sanitarias, reportando mayores tasas de preñez en vacas lecheras con dos o más servicios (Bas et al. 2011). Estos autores también demostraron que el uso de camisas sanitarias durante la IA reduce el riesgo de contaminación uterina por bacterias en el momento de la IA.

En suma, si bien existen antecedentes que abordan el estudio del uso de camisas sanitarias en vacas de leche y de carne, la información disponible es contradictoria y no permite realizar recomendaciones claras sobre el beneficio de aplicar esta medida en predios comerciales.

## **PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA**

La IA representa una gran herramienta para el mejoramiento genético de los rodeos bovinos (Shearer, 2003) y es una tecnología ampliamente utilizada tanto en ganadería de carne como de leche. Sin embargo, el éxito de la misma depende de diversos factores entre los que se encuentran los errores de procedimiento durante la aplicación de la técnica. La contaminación durante el ingreso de la pistola de IA a través de la vulva y vagina para ingresar al útero, es un factor que puede afectar negativamente la fertilidad de la vaca. Para disminuir dicha contaminación, se requiere que el procedimiento previo a la canulación del cuello uterino sea realizado de manera “limpia” y manteniendo la mayor higiene posible. Una alternativa para lograr que la técnica sea más higiénica es el uso de camisas sanitarias, lo que evitaría la contaminación y así se podría mejorar la salud del útero y los resultados reproductivos.

En la práctica, las camisas sanitarias no son de uso habitual en los programas de IA y la información existente es escasa. El creciente uso de la IA en programas a gran escala y con mucha cantidad de animales que deben inseminarse en pocas horas, como por ejemplo ocurre con la tecnología de la IATF o incluso detectando celo en rodeos grandes, podría ir en desmedro de las buenas prácticas de esta técnica. Se requieren más estudios para profundizar en el uso de camisas sanitarias en la IA en bovinos de carne y de leche, una medida que sería muy simple de aplicar y de muy bajo costo, y que en caso de mejorar los resultados reproductivos tendría una rápida adopción y un impacto directo sobre el sector productivo.

## **HIPÓTESIS**

La utilización de camisas sanitarias para proteger la pipeta de IA al introducirla a través de la vulva y la vagina, mejora la tasa de preñez en programas comerciales de IA realizados a gran escala, tanto en ganado de carne como de leche.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del uso de las camisas sanitarias para proteger la pipeta de IA previo a la canulación del útero sobre la tasa de preñez en bovinos de carne y leche.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Evaluar el efecto del uso de camisas sanitarias durante la inseminación artificial sobre la tasa de preñez en vacas nulíparas y multíparas de razas de carne.
- 2) Evaluar el efecto del uso de camisas sanitarias durante la inseminación artificial sobre la tasa de preñez en vacas de leche.
- 3) Evaluar posibles factores asociados al uso de camisas sanitarias tales como la categoría, el inseminador, establecimiento, número de servicios, número de lactancias y toro utilizado.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### METODOLOGÍA GENERAL

##### **Animales, manejo general e instalaciones.**

Se realizaron dos experimentos, uno en vacas de carne (Experimento I) y otro en vacas de leche (Experimento II). En el Experimento I se utilizaron 9.217 vacas multíparas o nulíparas de razas británicas Angus, Hereford y sus cruza, todas manejadas en condiciones de pastoreo en campo natural o campo natural mejorado. Este experimento se realizó durante el periodo de servicio para este tipo de producción (noviembre a enero), en 14 predios comerciales en diferentes zonas de Uruguay (33-35° LS, Uruguay). En el Experimento II se utilizaron 1.244 vacas Holando manejadas en pasturas de segundo y tercer año de festuca, avena y *ryegrass*, suplementadas a base de granos en el ordeño y silo de maíz o sorgo cuando las pasturas no estaban disponibles y eran limitantes. Los trabajos se realizaron durante el período de servicio establecido en Uruguay para ganado lechero (mayo a agosto) en tres establecimientos comerciales.

Los animales fueron manejados en condiciones de infraestructura adecuadas (corrales, huevo, tubo, cepo) y todos los procedimientos que involucraron animales, incluyendo administración de inyectables, aplicación de dispositivos intravaginales y ultrasonografía de órganos reproductivos, fueron aprobados por el Comité de Ética, Cuidado y Manejo de Animales para Experimentación de la Fundación IRAUy (resolución N° PGM\_01\_2021), avalada por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) de Uruguay.

## ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Las hembras recibieron un protocolo de sincronización de celos para IATF o fueron inseminadas a celo detectado (IACD). El día de la IA las hembras fueron asignadas a uno de los dos grupos experimentales para recibir o no una camisa sanitaria (SBS, Cryotec, Argentina) para proteger la pipeta de IA durante el procedimiento. Una vez cargada la pipeta con la pajuela de semen, la camisa sanitaria se colocó sobre la pipeta para cubrirla durante la introducción por la vulva y se retiró cuando la misma estaba en el fondo de la vagina justo antes de la canulación del cuello uterino. La IATF fue realizada por 10 y 3 técnicos experimentados utilizando semen congelado de 21 y 34 toros en el Experimento I y II, respectivamente, siendo estos factores asignados a cada grupo experimental de manera balanceada. El diagnóstico de preñez se realizó mediante ultrasonografía transrectal.

### Experimento I

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del uso de camisa sanitaria en la IA sobre la tasa de preñez en vacas y vaquillonas de carne. Se utilizaron 9217 vacas Angus, Hereford y sus cruza múltiparas en 27 repeticiones con una condición corporal (CC) de  $3,6 \pm 0,1$ , y nulíparas (vaquillonas) con una CC de  $5,1 \pm 0,1$  (Media  $\pm$  ES; escala 1 a 8; Vizcarra y Wettermann, 1996). Todas las vacas fueron examinadas por ultrasonografía para determinar la presencia o ausencia de un cuerpo lúteo (CL) al comienzo del tratamiento (Día 0). Las vacas nulíparas ( $n = 1.335$ ) recibieron un tratamiento para IATF (protocolo J-Synch) (de la Mata *et al.*, 2018) que consistió en la colocación de un dispositivo intravaginal que contenía 0,5 g de progesterona (DIB 0,5; Zoetis, Buenos Aires, Argentina) durante 6 días y la administración i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis). La colocación de los dispositivos intravaginales se realizó con el cuidado necesario para mantener la higiene previo al ingreso en la vagina de la vaca. Para esto, cada dispositivo fue manipulado por un operario con guantes limpios, que al retirar el dispositivo del envase plástico lo colocó en un aplicador que previamente había sido lavado con una solución de desinfectante y enjuagado con agua potable. Luego de cargado el dispositivo en el aplicador, este fue sumergido en una solución con desinfectante para luego colocarlo en la vagina de la vaca. La solución de desinfectante utilizada fue en base a un amonio cuaternario (cloruro de benzalconio al 1%, Droguería Paysandú, Montevideo, Uruguay) siguiendo las recomendaciones de trabajos previos que muestran la eficacia de este desinfectante en dispositivos intravaginales en bovinos (Bardón

et al., 2003). Al colocar el dispositivo en la vagina, un segundo operario retiró la materia fecal de la vulva y abrió ambos labios vulvares para evitar el contacto con el aplicador/dispositivo. El dispositivo fue colocado en el fondo de la vagina y se retiró el aplicador. Al momento de retirar el dispositivo se administró i.m. una dosis de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Zoetis) y 300 UI de eCG (Novormon, Zoetis). La IA se realizó entre las 60 y 72 h con la administración i.m. de una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (Gonasyn Gdr, Zoetis) después de retirar el dispositivo. Las vacas multíparas ( $n= 7.882$ ) recibieron un dispositivo intravaginal que contenía 0,5 g de progesterona (DIB 0,5, Zoetis) durante 8 días y 2 mg de benzoato de estradiol i.m. Al momento de retirar el dispositivo se administraron 500 µg de cloprostenol, 0,5 mg de cipionato de estradiol y 400 UI de eCG i.m., y la IATF se realizó entre las 48 y 56 h luego del retiro del dispositivo.

Dentro de cada réplica y para cada categoría, los animales fueron asignados a los dos grupos experimentales con camisa sanitaria ( $n= 4.613$ ) o sin camisa sanitaria ( $n= 4.604$ ). Dentro de cada réplica, para realizar la IATF se asignó aproximadamente el mismo número de vacas por grupo experimental a cada inseminador (dos a tres inseminadores por réplica) y a cada toro utilizado (uno a cinco toros por réplica). La tasa de preñez se determinó mediante ecografía entre 30 y 35 días luego de la IATF. En la Figura 2.1 se presenta el esquema del diseño experimental.

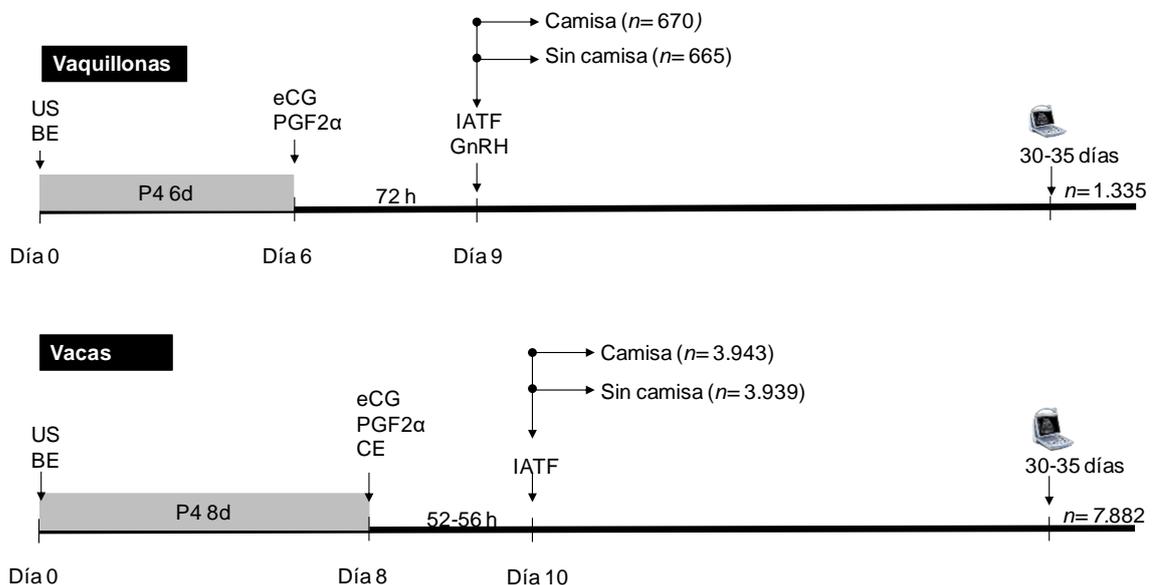


Figura 2.1. Diseño experimental para el Experimento I. US: ultrasonografía, eCG: gonadotropina coriónica equina, BE: benzoato de estradiol, PGF2α: prostaglandina F2α, P4: dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona, CE: cipionato de estradiol, GnRH: acetato de gonadorelina, IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

## Experimento II

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del uso de camisa sanitaria en el momento de la IA sobre la tasa de preñez en vacas lecheras. El experimento se realizó en 68 réplicas en un total de 1.244 vacas Holstein lactantes ubicadas en tres establecimientos de una misma empresa ganadera (33°LS, Florida, Uruguay). Las vacas estaban con una CC de  $3,3 \pm 0,1$  (escala 1 a 5; Wildman *et al.*, 1982), con una lactancia promedio de  $1,1 \pm 0,1$  y producción diaria de leche de  $22,5 \pm 0,2$  L. La IA se realizó después de realizar un protocolo de sincronización de celo para IATF o después de la detección de celo (IACD) en los ciclos estrales siguientes a la IATF. La sincronización para IATF consistió en un tratamiento farmacológico basado en la inserción intravaginal de un dispositivo con progesterona (DIB, 1,9 g, Zoetis, Buenos Aires, Argentina) durante 7 d y 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis) i.m. El procedimiento para la colocación del dispositivo fue el mismo que el descrito para el Experimento I manteniendo buenas condiciones de higiene. En el momento del retiro del dispositivo intravaginal se administraron 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Novormon, Zoetis), 500 µg de cloprostenol sódico (Bioestrovect, Vetoquinol, Francia) y 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Zoetis) i.m. Se administró un análogo de GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina, Fertiline, Vetoquinol) en el momento de la IATF que se realizó de 48 a 60 h después del retiro del dispositivo. En los programas de IACD, el celo se detectó dos veces al día y la IA se realizó también dos veces diarias, de tal manera que las vacas se inseminaban en el mismo momento que eran detectadas en celo. Tanto en el esquema con IATF como con IACD, en cada réplica el día de la IA las vacas fueron asignadas a los dos grupos experimentales con camisa sanitaria ( $n = 472$ ) o sin camisa sanitaria ( $n = 772$ ). La IA fue realizada por tres técnicos inseminadores en todos los establecimientos y en ambos tipos de IA, IATF o IACD. Dentro de cada réplica, se asignó aproximadamente el mismo número de vacas por grupo experimental a cada inseminador y a cada toro utilizado (uno a ocho toros por réplica). El diagnóstico de gestación se determinó mediante ultrasonografía a los 30 a 35 días luego de la IATF y a los 33 a 40 días después de la IACD en todas las réplicas. En la Figura 2.2 se presenta el esquema del diseño experimental.

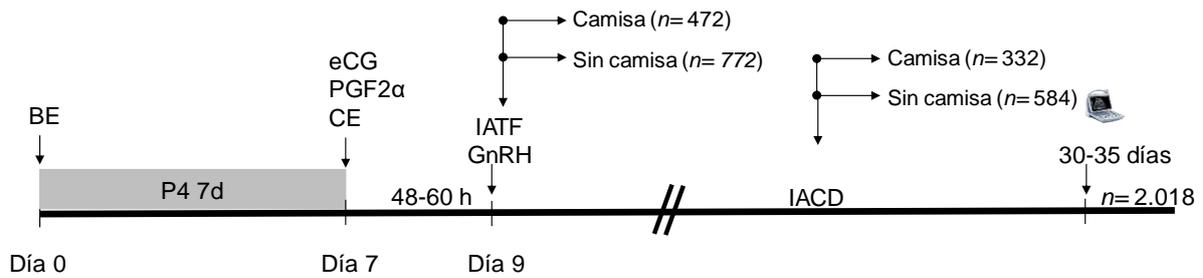


Figura 2.2 Diseño experimental para el Experimento II. BE: benzoato de estradiol, eCG: gonadotropina coriónica equina, PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F2 $\alpha$ , CE: cipionato de estradiol, GnRH: acetato de gonadorelina, IATF: inseminación artificial a Tiempo Fijo, IACD: inseminación artificial a celo detectado.

## Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2021). Se verificó la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos mediante histogramas, diagramas q-q y pruebas estadísticas formales como parte del procedimiento univariado. El tipo de estructuras de varianza-covarianza se eligió según la magnitud del criterio de información de Akaike (AIC) y al Bayesiano (BIC) para modelos ejecutados bajo simetría compuesta heterogénea, no estructurados, autorregresivos, potencia espacial y antidependencia de primer orden. Los modelos con el menor valor de AIC y BIC fueron los seleccionados. La tasa de preñez se analizó mediante regresión logística incluida en los MLGM considerando el uso o no de camisa sanitaria, categoría (nulíparas/múltiparas) inseminador, tipo de IA (para vacas de leche IATF o IACD) como efectos fijos, y sus interacciones. Como ajustes del modelo se utilizó un método de remoción paso a paso para aquellas variables con un valor  $P > 0,1$ . Como efectos aleatorios se incluyó el establecimiento, réplica, identificación del animal, número de lactancia, cantidad de inseminaciones (número de servicios) en vacas de leche, toro y partida de semen. Los resultados obtenidos en la tasa de preñez están expresados en porcentaje (%), el nivel de significancia estadística se definió cuando  $P < 0,05$  y tendencia cuando  $P < 0,1$ .

### RESULTADOS

#### Experimento I

##### **Efecto del uso de camisas sanitarias sobre la tasa de preñez en vacas de carne**

La tasa de preñez fue mayor en hembras inseminadas con camisa sanitaria (55,9%; 2.578/4.613) en comparación con hembras inseminadas sin camisa sanitaria (53,4%; 2.458/4.604; respectivamente;  $P < 0,05$ ). No se encontró interacción entre camisa sanitaria e inseminadores ( $P = NS$ ) ni categoría ( $P = NS$ ), motivo por el que los resultados se analizaron juntos para cada factor. La tasa de preñez en las vacas multíparas y nulíparas se muestran en la Figura 3.1.1. La tasa de preñez fue numéricamente mayor con el uso de camisa sanitaria en 11 de los 14 establecimientos evaluados, alcanzando diferencia significativa en tres de ellos (Tabla 3.1.1).

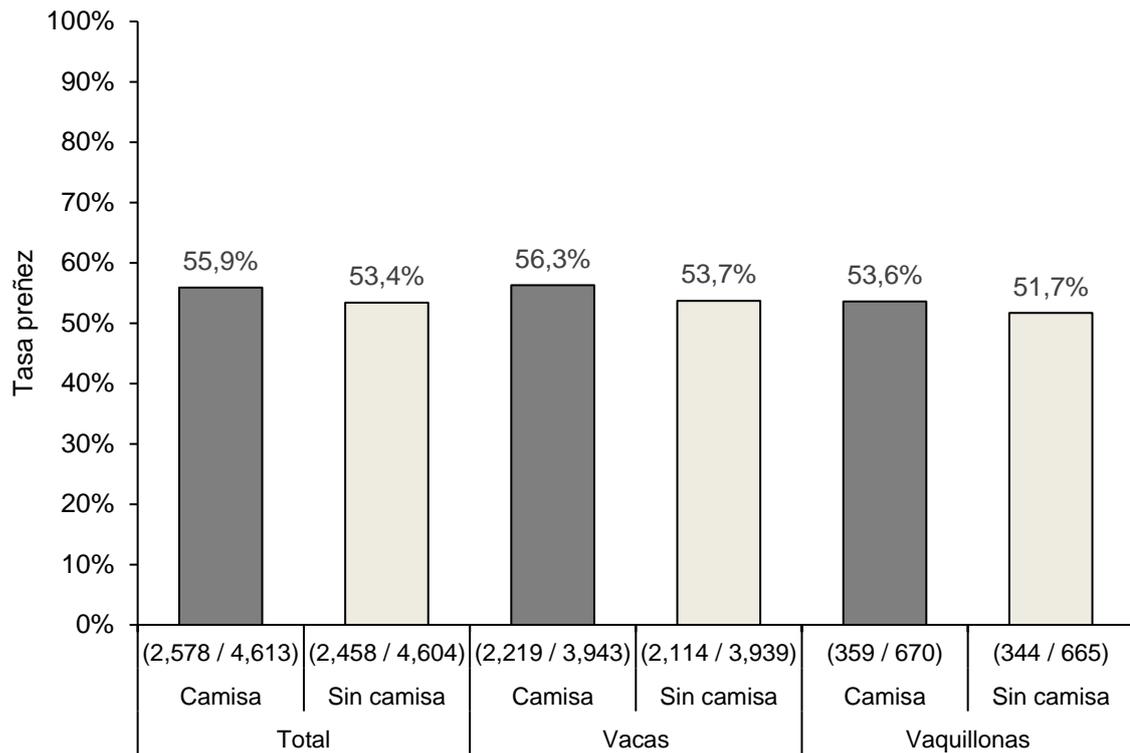


Figura 3.1.1 Tasa de preñez (P/IA) obtenida con el uso de camisa sanitaria (■) o sin camisa (□) en vacas y vaquillonas de carne sometidas a inseminación artificial a tiempo fijo. Hubo diferencia significativa entre hembras con y sin camisas ( $P < 0.05$ ), y no hubo interacción ( $P = NS$ ) con la categoría (vacas y vaquillonas).

Tabla 3.1.1 Tasa de preñez (P/IA) luego del uso de camisas sanitarias en diferentes establecimientos con inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en bovinos de carne.

Establecimiento#	N° animales	Con camisa	Sin camisa	Diferencia (%)	P
#1	245	60,0% (72/120)	46,4% (58/125)	+13,6	<0,05
#2	664	46,5% (155/333)	45,6% (151/331)	+0,9	NS
#3	1998	62,9% (621/986)	62,9% (637/1012)	0	NS
#4	534	48,8% (123/252)	54,6% (154/282)	-5,8	NS
#5	533	61,4% (170/277)	46,5% (119/256)	+14,9	<0,05
#6	630	67% (214/319)	64,6% (201/311)	+2,4	NS
#7	1213	48,5% (298/615)	45,1% (270/598)	+3,4	NS
#8	139	81,9% (59/72)	65,7% (44/67)	+16,2	<0,05
#9	1178	48,4% (286/591)	44,2% (260/587)	+4,2	NS
#10	546	43,5% (118/271)	45,8% (126/275)	-2,3	NS
#11	376	67,7% (130/192)	65,2% (120/184)	+2,5	NS
#12	282	62,9% (88/140)	54,9% (78/142)	+8	NS
#13	461	56,4% (133/236)	55,1% (124/225)	+1,3	NS
#14	418	53,1% (111/209)	51,7% (108/209)	+1,4	NS
Total	9217	55,9% (2.578/4.613)	53,4% (2.458/4.604)	+2,5	<0,05

## Experimento II

### Efecto del uso de camisas sanitarias sobre la tasa de preñez en vacas de leche

Los resultados muestran una tendencia ( $P= 0,09$ ) a una mayor tasa de preñez en las vacas inseminadas con camisa sanitaria (50,2%; 381/759) vs. las vacas inseminadas sin camisa (46,8%; 589/1.259). Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.1. Esta tendencia no estuvo afectada por el tipo de IA, no mostrando interacción entre el uso de camisas con la IATF o IACD ( $P= NS$ ). En las vacas con IACD hubo una tasa de preñez mayor que en las vacas con IATF (55,8%, 511/916 vs. 42,7%, 459/1.102; respectivamente;  $P < 0,01$ ). No se detectó interacción entre camisa sanitaria e inseminadores, número de servicios, número de lactancias. La tasa de preñez por cada inseminador se muestra en la Tabla 3.2.2

Tabla 3.2.1 Efecto del uso de camisas sanitarias en la inseminación artificial (IA) sobre la tasa de preñez (P/IA) en vacas lecheras con inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) y con detección de celo (IACD).

Establecimiento #	N° animales	Producción de leche (L)	Días en leche	N° de lactancia	Tasa de preñez (%)		Diferencia (%)
					Con camisa	Sin camisa	
#1	539	23,8 ± 0,3	52 ± 0,7	1,16 ± 0,1	50,3% (193/384)	45,9% (226/492)	+4,7
#2	277	21,9 ± 0,4	50 ± 0,8	1,03 ± 0,1	39,4% (41/104)	40,7% (125/307)	-1,3
#3	428	21,9 ± 0,4	51 ± 0,7	1,19 ± 0,1	54,2% (147/271)	51,7% (238/460)	+2,5
Total	1.244	22,5 ± 0,2	51 ± 0,7	1,15 ± 0,1	50,2% (381/759) <sup>c</sup>	46,8% (589/1.259) <sup>d</sup>	+3,4

c vs. d;  $P < 0,1$

Tabla 3.2.2 Tasa de preñez (P/IA) en vacas de leche inseminadas con o sin camisas sanitarias, mostrando los resultados con diferentes inseminadores.

Inseminador #	Tasa de preñez (%)			Diferencia	Interacción camisa*IA
	Con camisa	Sin camisa	<i>P</i>		
#1	50,3%	46,6%	<i>NS</i>	+3,7	<i>NS</i>
	(176/350)	(251/539)			
#2	52,3%	48,9%	<i>NS</i>	+3,4	<i>NS</i>
	(162/310)	(230/470)			
#3	43,4%	43,2%	<i>NS</i>	+0,2	<i>NS</i>
	(43/99)	(108/250)			
Total	50,2%	46,8%	0,09	+3,4	<i>NS</i>
	(381/759)	(589/1.259)			

### DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis muestran que el uso de camisas sanitarias para proteger la pipeta de IA mejoró la tasa de preñez en ganado de carne, y mostró una tendencia a mejorar la tasa de preñez en el ganado de leche.

Si bien existen algunos antecedentes que evalúan la eficacia de estas camisas sobre la fertilidad en bovinos de carne y de leche, los resultados no estaban del todo claros. Si bien sí se había demostrado que el uso de camisas evita la contaminación uterina durante el procedimiento de canulación en vacas de leche (Bas et al., 2011), algunos estudios realizados en vacas de carne no reportaron mejoras en la fertilidad (Richards et al., 1984; Kasimanickam, 2016). Los resultados del presente experimento muestran que en vacas de carne la tasa de preñez aumenta con el uso de camisa. Esto sugiere que la contaminación uterina durante la IA puede ser un factor que esté afectando la fertilidad en los programas de IA en ganado de carne. A pesar de que la prevalencia y la gravedad de los problemas uterinos en el posparto y en particular la endometritis en el ganado de carne no son tan frecuente como en el ganado lechero (17% vs. 51% de prevalencia de endometritis a las 7 semanas posparto, respectivamente) (Santos et al., 2009), los resultados encontrados en esta tesis sugieren que al menos durante la inseminación la entrada de microorganismos al útero -y la forma de evitarlo- podría ser un factor a tener en cuenta en estudios futuros.

En bovinos de leche, los primeros estudios en los que se evaluó el uso de las camisas sanitarias (King et al., 1984; Richards et al., 1984), no reportaron mejoras en fertilidad. Estos estudios se realizaron hace más de 30 años, utilizando varios técnicos para la IA, y solo se evaluaron las tasas de no retorno al primer servicio. En otro estudio también realizado en bovinos de leche, se encontró que la tasa de preñez no estuvo afectada por el uso de camisas en el primer servicio, pero aumentó con el uso de camisa sanitaria para aquellas vacas con dos o más servicios (Bas et al., 2011). Estos autores sugieren que cada nuevo servicio implica un nuevo ingreso al útero con la pipeta de IA aumentando el riesgo de contaminación y reduciendo las probabilidades de preñez en los servicios siguientes. En nuestro estudio realizado en vacas de leche, la tasa de preñez tendió a ser mayor con el uso de camisas, y este efecto no estuvo afectado por el número de servicios que presentaban las vacas.

La camisa sanitaria se utiliza con el objetivo de proteger la pipeta de inseminación durante el ingreso a la vagina y a la entrada del cérvix de la contaminación externa, permitiendo una técnica de IA más limpia, y así mejorar los resultados reproductivos. La hipótesis es que los agentes infecciosos o incluso comensales habituales de la microbiota de la hembra, puedan transferirse de un punto del tracto reproductivo (vulva y vagina) a otro (útero) a través de la pipeta durante el procedimiento de IA. La contaminación vulvar puede aumentar el riesgo de contaminación bacteriana vaginal e infección uterina desde el medio externo, lo que podría disminuir las tasas de preñez (Dubuc et al., 2010; Galon et al., 2010; Salasel et al., 2010; Gilbert, 2011). En relación a esto, Bas et al. 2011 demostraron que el uso de camisas sanitarias en el momento de la IA redujo la contaminación bacteriana de las puntas de las pipetas de IA después de la IA, lo que indica que el uso de una protección como la camisa sanitaria mejora la higiene en el momento de la IA. Estos autores encontraron que la bacteria que fue más aislada de la pipeta inmediatamente después de la IA fue *Escherichia coli*, que se identificó en casi el 49 % de los aislamientos de vacas inseminadas sin camisa sanitaria en comparación con el 35% en vacas inseminadas con las camisas. La presencia de *Escherichia coli* y *Arcanobacterium pyogenes* en el útero bovino se asocia con disfunción ovárica (diámetro de folículos más pequeños y cuerpos lúteos con niveles más bajos de estradiol y progesterona en plasma) (Williams et al., 2007). Aún no están del todo claros los posibles efectos perjudiciales de la introducción de estos patógenos en el útero bovino en el momento de la IA, pero las bacterias pueden colonizar el endometrio uterino y desencadenar una respuesta inflamatoria aun cuando las vacas no presenten signos clínicos (endometritis subclínica), lo que puede intervenir en los eventos que conducen al reconocimiento materno de la preñez. En este sentido, se ha descrito una reacción inmunitaria fisiológica, principalmente en yeguas (Zerbe, 2006) pero también en vacas (Schuberth et al., 2008) como respuesta inflamatoria posterior al servicio o la IA, asociada principalmente a los espermatozoides y al plasma seminal. En condiciones normales, esta respuesta endógena es controlada y dicha inflamación desaparece en aproximadamente 48 horas (Katila et al., 1996). Si bien esta respuesta no está tan estudiada en bovinos, la mayor presencia de células polimorfonucleares (PMN; >15 %) próximo al momento de la IA se la ha asociado con un desempeño reproductivo deficiente en vacas lecheras (Williams et al., 1988; Kaufmann et al., 2009). Además, se ha demostrado que los estrógenos, que normalmente se encuentran en altas concentraciones justo antes del pico preovulatorio de LH y ya más bajas al momento de la ovulación (Ungerfeld, 2002), regulan la migración de leucocitos hacia el cuello uterino, el útero y la matriz extracelular del tracto reproductivo (Ramos et al., 2000; Stygar et al., 2006). Aunque la respuesta inflamatoria y el perfil hormonal no se evaluaron en este estudio, es razonable esperar que el nivel reducido de estradiol en el momento de la ovulación pueda provocar una respuesta inmunológica deficiente

en el útero (Lacetera et al., 2004) y reducir la fertilidad (Leroy et al., 2004). Por lo tanto, el uso de camisas sanitarias en el momento de la introducción de la pipeta de inseminación podría prevenir la introducción de una microbiota contaminante en el útero, asegurando un ambiente uterino óptimo que favorezca la fertilidad. La mayor tasa de preñez que muestra este estudio en vacas de carne y la tendencia en vacas de leche obtenida con el uso de camisas respalda esta hipótesis.

La higiene del inseminador y la contaminación de la vulva es uno de los aspectos a considerar durante el procedimiento de ingreso a la vagina, para mejorar así el éxito de la técnica. En un estudio se encontró que el efecto de la camisa sanitaria sobre la tasa de preñez fue negativo cuando la vulva estaba clasificada como sucia en comparación a cuando la vulva estaba limpia (Hosie et al., 2019). Los autores indican que en este estudio los inseminadores no tenían el entrenamiento apropiado, y sugieren que entonces no consideraron aspectos de higiene cuando utilizaron la camisa (y sí los consideraron cuando no usaban camisa), resultando en una mala práctica en el uso de la misma. El inseminador es un factor fundamental para el éxito de la técnica de IA y la falta de habilidad, cuidado, o destreza puede afectar seriamente el resultado. En este sentido, es importante el entrenamiento y reentrenamiento de los técnicos inseminadores ya que a menudo los resultados reproductivos se ven afectados por este factor. Se ha demostrado que tanto la duración de la formación inicial (Howells et al., 1999) como el reentrenamiento de inseminadores experimentados (Senger, 1987) tienen efectos significativos sobre la precisión del lugar donde se deposita el semen en el útero afectando la tasa de concepción. Generalmente se acepta que la técnica de IA, en particular el sitio donde se deposita el semen, es el principal factor asociado con la variabilidad entre técnicos (Senger, 2002), y se ha reportado una diferencia de 5% en la tasa de concepción entre inseminadores nuevos en comparación con aquellos con algunos años de experiencia (White, 1985).

En ambos experimentos se utilizaron protocolos de IATF que requerían de la colocación de dispositivos intravaginales de P4 durante 6 a 8 días. La colocación de estos dispositivos genera ciertas condiciones que podrían favorecer la contaminación local de la vagina o la ocurrencia de una vaginitis bacteriana. En un estudio en vacas de leche se encontró una gran concentración de microorganismos infecciosos en el mucus vaginal luego de ser sincronizadas con dispositivos intravaginales conteniendo progesterona (Walsh et al., 2008). El cultivo bacteriano de hisopos vaginales después de un período de 7 días con los dispositivos intravaginales reveló un crecimiento moderado de coliformes, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* (Walsh et al., 2008). En ese estudio la colocación del dispositivo se realizó sin el uso de desinfectante y no se describe con precisión la higiene durante la colocación. En el presente estudio de esta tesis, se utilizó un desinfectante apropiado como el cloruro de

benzalconio al 1% (Bardón et al., 2003), y se tuvo particular cuidado en la higiene para evitar la contaminación al ingresar con el dispositivo en la vulva. Bulman et al. 1978 tomaron muestras cerca del orificio cervical luego de 14 días de tratamiento con un dispositivo intravaginal de P4 y aislaron *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* y *Proteus spp.* del 90% de los animales tratados. Este estudio fue realizado hace varias décadas con dispositivos diferentes a los utilizados actualmente y por un periodo de tiempo que fue aproximadamente el doble que el utilizado en el presente estudio. También puede considerarse como antecedente, aunque son estudios realizados en otra especie (ovinos) y utilizando otro tipo de dispositivos (esponjas intravaginales con progestágenos), la microbiota vaginal se ve alterada por acción del dispositivo y se ha reportado cierto efecto sobre la fertilidad subsiguiente (Ungerfeld y Silva, 2005). Como los resultados de estos estudios previos no son comparables con el estudio actual realizado en esta tesis, el posible efecto sobre la microbiota uterina de animales que han recibido un dispositivo intravaginal aplicando la metodología descrita, podría ser motivo de futuros estudios. En el presente estudio en vacas de leche se realizó tanto IATF como IACD, y el efecto de la camisa sanitaria sobre la tasa de preñez ( $P= 0,09$ ) no tuvo interacción con el tipo de IA, siendo válido este resultado tanto para IATF como IACD. Si bien se requieren nuevos estudios para profundizar en estos aspectos, a modo de discusión podemos sugerir o plantear la hipótesis que en las condiciones de este estudio el efecto de la camisa sería de utilidad tanto en vacas que recibieron dispositivos intravaginales como en aquellas vacas que manifiestan celo espontáneo sin haber recibido dispositivos intravaginales.

En resumen, en este estudio se evaluó el uso de camisas sanitarias en la IA para evaluar el efecto sobre la tasa de preñez en bovinos de carne y leche. En ganado de carne sobre 9.217 vacas el uso de camisas sanitarias mejoró la tasa de preñez alcanzando diferencias significativas, y en el ganado lechero sobre 1.244 vacas esta diferencia alcanzó una tendencia estadística. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de aplicar una técnica de IA basada en un procedimiento limpio que permita maximizar los resultados reproductivos. Sugerimos el uso de una camisa sanitaria para mejorar la tasa de preñez, y planteamos como nueva hipótesis que esta medida evita la contaminación de la pipeta de IA durante el procedimiento de entrada hacia el cuello uterino, impidiendo el arrastre de microorganismos hacia el útero.

## **CONCLUSIONES**

El uso de camisas sanitarias en el momento de la canulación previo a la IA mejora las tasas de preñez de manera significativa en bovinos de carne, y muestra una tendencia estadística en vacas de leche. En base a estos resultados sugerimos la recomendación de implementar el uso de camisas sanitarias en protocolos para IA en bovinos.

## **Implicancias prácticas**

Los resultados de esta tesis muestran los beneficios de utilizar una camisa sanitaria durante la inseminación en bovinos de carne y leche. Esta medida es una herramienta muy simple de implementar y de muy bajo costo, que genera mejoras en los índices reproductivos los que a su vez afectan favorablemente los indicadores productivos. Tanto en ganado de carne como en ganado de leche, mejorar los índices reproductivos aumentando la tasa de procreo o mejorando el intervalo entre partos, respectivamente, tiene un fuerte impacto en los indicadores económicos de las empresas agropecuarias.

Todos estos beneficios, aun cuando la mejora sea de escasa magnitud en términos de tasa de preñez o en el intervalo entre partos, desde el punto de vista económico justifican ampliamente el uso de esta herramienta de forma masiva en programas comerciales.

En el ámbito científico también se pueden indicar algunas implicancias de esta tesis. Los resultados serán publicados en una revista internacional y el artículo se encuentra en preparación. Como nuevas propuestas a partir de estos resultados, es posible avanzar con nuevos estudios para evaluar cómo afecta la canulación a la microbiota y al ambiente uterino, considerando a la vez ciertas medidas -como por ejemplo el uso de camisas sanitarias- para mejorar esta tecnología y contribuir así a una mayor adopción por el sector productivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bardón JC, Combessies GM, Cordeviola JM, Fiscalini B, Martínez AH, Nosedá RP, 2003. Evaluación de la acción de iodopovidona y amonios cuaternarios en los dispositivos intravaginales TRIU-B frente a distintos patógenos reproductivos. En: V Simposio Internacional de Reproducción Animal 379 (abstract).
2. Bas S, Hoet A, Rajala-Schultz P, Sanders D, Schuenemann GM, 2011. The use of plastic cover sheaths at the time of artificial insemination improved fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 793–799. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3704>
3. Benner M, Ferwerda G, Joosten I, van der Molen RG, 2018. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction Update* 24: 393-415
4. Bogado Pascottini OA y Opsomer G, 2016. Postpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 85(6): 378-385.
5. Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL, 1993. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biology of reproduction* 48(3): 655-661.
6. Buckley F, Mee J, O'Sullivan K, Evans R, Berry D, Dillon P, 2003. Insemination factors affecting the conception rate in seasonal calving Holstein-Friesian cows. *Reproduction Nutrition Development* 43(6): 543-555.
7. Bulman DC, McKibbin PE, Appleyard WT, Lamming GE, 1978. Effect of a progesterone-releasing intravaginal device on the milk progesterone levels, vaginal flora, milk yield and fertility of cyclic and non-cyclic dairy cows. *Reproduction* 53(2): 289-296.

8. Chen H, Fu K, Pang B, Wang J, Li H, Jiang Z, Feng Y, Tian W, Cao R, 2020. Determination of uterine bacterial community in postpartum dairy cows with metritis based on 16S rDNA sequencing. *Veterinary and Animal Science*10:100-102.  
<https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100102>.
9. Clemmons B, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Adeyosoye OI, Pohler KG, Myer PR, 2017. Vaginal and uterine bacterial communities in post-partum lactating cows. *Frontiers in Microbiology* 8:1047.
10. Cojkic A, Niazi A, Guo Y, Hallap T, Padrik P, Morrell JM, 2021. Article identification of bull semen microbiome by 16s sequencing and possible relationships with fertility. *Microorganisms* 9: 1-12.
11. de la Mata JJ, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Bosolasco D, de Brun V, Meikle A, Bó GA, Menchaca A, 2018. Effects of Extending the Length of Pro-Oestrus in an Oestradiol- and Progesterone-Based Oestrus Synchronisation Program on Ovarian Function, Uterine Environment and Pregnancy Establishment in Beef Heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 30 (11): 1541.
12. Diaz-martínez MDC, Bernabeu A, Lledó B, Carratalá-Munuera C, Quesada JA, Lozano FM, Ruiz V, Morales R, Llácer J, Ten Jorge, Castillo JC, Rodríguez A, Nouni-García R, López-Pineda A, Moliner B, Castillo JC, 2021. Impact of the vaginal and endometrial microbiome pattern on assisted reproduction outcomes. *Journal of Clinical Medicine* 10 (18): 4063.
13. Diskin MG y Morris DG, 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 260-267.
14. Diskin MG, 2018. Review: semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal* 12 (1): 75-84.
15. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ, 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93(12): 5764-5771.

16. Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM, 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal reproduction science* 58(1-2): 39-44.
17. Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, Cooper A, Knight R, Weyrich LS, 2019. Contamination in low microbial biomass microbiome studies: issues and recommendations. *Trends in microbiology* 27(2): 105-117.
18. Farahani L, Tharakan T, Yap T, Ramsay JW, Jayasena CN, Minhas S, 2021. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 9: 115-144. [https://doi.org/ 10.1111/andr.12886](https://doi.org/10.1111/andr.12886).
19. Fraga M, Perelmutter K, Delucchi L, Zununino P, 2011. Equine native microbiota as a source of beneficial microbes. *Horses: Biology, Domestication, and Human Interactions*. Nova Science Publishers. Hauppauge, NY.
20. Franasiak JM y Scott RT, 2015. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility* 104(6): 1364–1371. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.10.012>
21. France M, Alizadeh M, Brown S, Ma B, Ravel J, 2022. Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. *Nature Microbiology* 7: 367-78. [https:// doi.org/10.1038/s41564-022-01083-2](https://doi.org/10.1038/s41564-022-01083-2).
22. Fu M, Zhang X, Liang Y, Lin S, Qian W, Fan S, 2020. Alterations in vaginal microbiota and associated metabolome in women with recurrent implantation failure. *Microbe Biology* 11(3): 03242-19 <https://doi.org/10.1128/mBio.03242-19>.
23. Galon N, Zeron Y, Ezra E, 2010. Factors affecting fertility of dairy cows in Israel. *Journal of Reproduction and Development* 56: 8-14.
24. Galvão KN, Bicalho RC, Jeon SJ, 2019. Symposium review: the uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102 (12): 11786-11797. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17106>.

25. Gilbert RO, 2011. The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 24(1): 252-257.
26. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M, 2005. Prevalence of endometritis and its effect on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64 (9): 1879-1888.
27. Givens MD y Marley MSD, 2008. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 70 (3): 270-285.
28. Graham EF, 1966. The use of a dye indicator for testing, training, and evaluation technicians in artificial insemination. *Proc. 1st Tech. Conf. on Artificial Insemination and Bovine Reproduction* 57-60.
29. Hafez ESE, 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-Hill Interamericana.
30. Heil BA, Paccamonti DL, Sones JL, 2019. Role for the mammalian female reproductive tract microbiome in pregnancy outcomes. *Physiological Genomics* 51: 390-399.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00045.2019>.
31. Hosie J, Rowe SM, Morton JM, Tranter WP, Cavalieri J, 2019. Use of a sanitary sheath at artificial insemination by nonprofessional technicians does not markedly improve pregnancy rates to artificial insemination in pasture-based dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102 (6): 5588-5598.
32. Howells MJ, Davies DAR, Dobson H, 1999. Influence of the number of days spent training in an abattoir with access to live cows on the efficiency of do-it-yourself artificial insemination. *Veterinary record* 144 (12): 310-314.
33. Humblot P, 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and

- sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56 (9): 1417-1433.
34. Inskeep EK y Dailey RA, 2005. Embryonic death in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 21(2): 437-461.
35. Jeon SJ, Cunha F, Vieira-Neto A, Bicalho RC, Lima S, Bicalho ML, Galvão KN, 2017. Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows. *Microbiome* 5:109. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0328-9>.
36. Jeon SJ, Vieira-Neto A, Gobikrushanth M, Daetz R, Mingoti RD, Parize ACB, Lucas de Freitas S, Lima da Costa AN, Bicalho RC, Lima S, Jeong KC, Galvão KN, 2015. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Applied Environmental Microbiology* 81:6324- 6332. <https://doi.org/10.1128/AEM.01753-15>.
37. Jin SK, Yang WX, 2017. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget* 8:3600- 3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>.
38. Kasimanickam R, 2016. The use of artificial insemination gun protective plastic sheath at the time of artificial insemination did not improve fertility of beef cattle. *Clinical Theriogenology* 8:103–111.
39. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH, 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62(1-2): 9-23.
40. Katila T, Celebi M, Koskinen, 1996. Effect of timing of frozen semen insemination on pregnancy rate in mares. *Acta Veterinaria Scandinavica* 37:361–365.
41. Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Forderung D, Heuwieser W, 2009. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4 h after insemination

and its effects on first service conception rate. *Theriogenology* 71(2): 385-391.

42. King GJ, Bellissimo DJ, Penner WJ, 1984. Routine use of protective sheaths in cattle inseminations did not improve fertility. *The Canadian Veterinary Journal* 25:327–328.
43. Koziol JH, Sheets T, Wickware CL, Johnson TA, 2022. Composition and diversity of the seminal microbiota in bulls and its association with semen parameters. *Theriogenology* 182:17-25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.01.029>.
44. Lacetera N, Scalia D, Franci O, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A, 2004. Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 87(4): 1012-1014.
45. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A, 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 62:1131-1143.
46. Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL, 2014. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97(1): 195-201.
47. Manes J, Fiorentino MA, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R, Sanchez E, F Paolicchi, 2010. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research* 94:201-204. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.021>.
48. Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS, Menchaca A, Sartori R, 2018. Evolution of Knowledge on ovarian Physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. *Animal Reproduction* 15: 1003-1014. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0007>.

49. Martínez-Fernández A, Silveira EA, López OF, 2006. Las infecciones uterinas en la hembra bovina. REDEVET, Revista Electrónica de Veterinaria 7(10): 1-40.
50. Martínez-Ros P, M Lozano, F Hernandez, A Tirado, A Rios-Abellan, MC Lopez Mendoza, A Gonzalez-Bulnes, 2018. Intravaginal device-type and treatment-length for ovine estrus synchronization modify vaginal mucus and microbiota and affect fertility. *Animals* 8:226.
51. Maurino A, Bernardi S, Rinaudo A, Marini PR, 2012. Prevalencia de endometritis subclínica antes y cuatro horas después de la inseminación artificial en vaquillonas. *Spermova* 2(1): 47-48.
52. Menchaca A, Núñez R, Wijma R, García Pintos C, Fabini F, de Castro T, 2013b Sartori. How fertility can be improved in fixed-time AI programs in beef cattle. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba 103-134.
53. Menchaca A, Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Cuadro F, 2013a. Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. *Semin Actual Técnica Cría Vacuna INIA* 46: 208-229.
54. Moreno CG, Luque AT, Galvao KN, Otero MC, 2022. Bacterial communities from vagina of dairy healthy heifers and cows with impaired reproductive performance. *Research in Veterinary Science* 142: 15- 23 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.11.007>.
55. Morrell JM, 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 63-67 [doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x).
56. Morton J, 2004. Determinants of reproductive performance of dairy cows in commercial herds in Australia. PhD Thesis, University of Melbourne, Melbourne, Australia.
57. Pascottini OB, Van Schyndel SJ, Spricigo JFW, Rousseau J, Weese JS, LeBlanc SJ, 2020. Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy

cows with clinical or subclinical endometritis. *Scientific Reports* 10: 1-11.  
[https://doi.org/ 10.1038/s41598-020-69317-z](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69317-z).

58. Peters JL, Senger PL, Rosenberger JL, O'Connor ML, 1984. Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman inseminators using 5 and 25-ml French straws. *Journal of Dairy Science* 1659:1671.
59. Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M, 2014. Risk factors for uterine diseases on small-and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology* 82(6): 857-865.
60. Quereda JJ, García-Rosello E, Barba M, Mocé ML, Gomis J, Jimenez-Trigos E, Bataller A, Martínez- Boví R, García- Muñoz A, Gómez- Martín A, 2020. Use of probiotics in intravaginal sponges in sheep: a pilot study. *Animals* 10 (4): 719.  
<https://doi.org/10.3390/ani10040719>.
61. Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodriguez H, de Toro MM, Montes GS, Luque EH, 2000. Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids* 65(7): 409-414.
62. Reese ST, Franco GA, Poole RK, Hood R, Montero LF, Oliveira Filho RV, Cooke RF, Pohler KG, 2020. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Animal Reproduction Science* 212: 106251.
63. Richards MW, Spitzer JC, Newman SK, Thompson CE, 1984. Bovine pregnancy and nonreturn rates following artificial insemination using a covered sheath. *Theriogenology* 21: 949-957.
64. Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T, 2010. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 74(7): 1271-1278.
65. Santos NR, Lamb GC, Brown DR, Gilbert RO, 2009. Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology* 71:739- 745.

66. Santos TMA, Gilbert R, Bicalho RC, 2011. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 291-302. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3668>.
67. Sartori R, Sartor-Bergfelt, R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC, 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* 85(11): 2803-2812.
68. Schuberth HJ, Taylor U, Zerbe H, Waberski D, Hunter R, Rath D, 2008. Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology* 70:1174–1181.
69. Senger PL, 1980. Handling frozen bovine semen-factors which influence viability and fertility. *Theriogenology* 13(1): 51-62.
70. Senger PL, 1987. Artificial insemination technique needs attention. *Bovine Proceedings* 19: 114–116.
71. Senger PL, 2002. Fertility factors – which ones are really important? In: *Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners* 35: 112–123.
72. Shearer K, 2003. The Milk Progesterone Test and Its Applications in Dairy cattle reproduction. University of Florida, Cooperative Extension Service. <http://edis.ifas.ufl.edu>, 2003.
73. Sheldon IM, Dobson H, 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science*. 82-83:295-306.
74. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO, 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65(8): 1516-1530.
75. Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE, 2009. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical

endometritis in high producing dairy cattle. *Reproduction in domestic animals* 44: 1-9.

76. Srinivasan M, Adnane M, Archunan G, 2021. Significance of cervico-vaginal microbes in bovine reproduction and pheromone production e a hypothetical review. *Research in Veterinary Science* 135: 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.003>.
77. Stygar D, Westlund P, Eriksson H, Sahlin L, 2006. Identification of wild type and variants of oestrogen receptors in polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *Clinical endocrinology* 64(1): 74-81.
78. Swartz JD, Lachman M, Westveer K, O'Neill T, Geary T, Kott RW, Berardinelli JG, Hatfield PG, Thomson JM, Roberts A, Yeoman CJ, 2014. Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science* 1:19.
79. Toson B, Simon C, Moreno I, 2022. The endometrial microbiome and its impact on human conception. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms23010485>.
80. Troedsson MH, 2006. Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 22(3): 705-712.
81. Uchihashi M, Bergin IL, Bassis CM, Hashway SA, Chai D, Bell JD, 2015. Influence of age, reproductive cycling status, and menstruation on the vaginal microbiome in baboons (*Papio anubis*). *American Journal of Primatology* 77: 563-578. <https://doi.org/10.1002/ajp.22378>.
82. Ungerfeld R, 2002. Control endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea 39-53.
83. Ungerfeld R, Silva L, 2005. The presence of normal vaginal flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous ewes. *Applied Animal Behavior Science* 93: 245-250.

84. Vizcarra JA, Ibañez W, Orcasberro R, 1986. Repeatability and reproducibility of two systems to evaluate body condition in Hereford beef cows. *7 Investigaciones Agronómicas*, Montevideo, Uruguay 45–47.
85. Walsh RJ, LeBlanc SJ, Vernoooy E, Leslie KE, 2008. Safety of a progesterone-releasing intravaginal device as assessed from vaginal mucosal integrity and indicators of systemic inflammation in postpartum dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* 72:43-49.
86. Wang J, Li Z, Ma X, Du L, Jia Z, Cui X, Yu L, Yang J, Xia L, Zhang B, Fan H, Zhao F, 2021. Translocation of vaginal microbiota is involved in impairment and protection of uterine health. *Nature Communications* 12: 1-15.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24516-8>.
87. Wang J, Sun C, Liu C, Yang Y, Lu W, 2016. Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR. *Anaerobe* 38: 1-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.11.004>.
88. Wattiaux MA, 1999. Reproducción y selección genética. Trad. J. Cibelli. 2 ed. Instituto Babcock para la investigación y desarrollo de la industria lechera. Wisconsin, USA. 164.
89. White MB, 1985. The impact of DIY insemination: Proceedings of the Australian and New Zealand Society of Animal Reproduction 296.
90. Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt Jr HF, Lesch TN, 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science* 65(3): 495-501.
91. Williams BL, Gwazdauskas FC, Whittier WD, Pearson RE, Nebel RL, 1988. Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 71(8): 2278-2283.

92. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM, 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68:549–559.
  
93. Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PL, Melo LF, Ochoa JC, Santos JEP, Sartori R, 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86(1): 239-253.
  
94. Zerbe H, Schuberth HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W, 2006. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* 60: 209-223.