

La administración oral de glicerol después de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein

Glycerol supplementation after artificial insemination increases conception rate in Holstein cows

Alvaro Ortega León^a, Joel Hernández Cerón^a, Carlos G. Gutiérrez^a

RESUMEN

Se probó si un incremento en las concentraciones de insulina, provocado por la administración oral de una sustancia glucogénica (glicerol) durante los primeros días posinseminación, aumenta el porcentaje de concepción (PC) en vacas Holstein. Se utilizaron 190 vacas de uno a tres servicios, con condición corporal de 2.5 a 3. Al momento de la inseminación (día cero), se distribuyeron al azar en dos grupos: el grupo glicerol (n=95) recibió 1 L de solución de glicerol y agua (90:10, v/v), la cual se repitió en los días 2, 4 y 6 posinseminación. El grupo testigo (n=95) recibió 1 L de agua por vía oral en el mismo esquema. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación rectal en el día 45 posinseminación. El PC se comparó con una prueba de Ji-cuadrada. En seis animales de cada grupo se determinaron las concentraciones plasmáticas de insulina mediante radioinmunoanálisis antes de la toma de glicerol y en los siguientes 15, 30, 60, 90, 120 y 240 min y se compararon mediante análisis de varianza para mediciones repetidas. El PC fue mayor ($P < 0.05$) en el grupo glicerol (47.4) que en el testigo (31.6). Después de la administración del glicerol se observó un incremento de las concentraciones de insulina ($P < 0.05$). Se concluye que la administración de glicerol durante los primeros seis días posinseminación aumenta el porcentaje de concepción en vacas Holstein; probablemente el incremento de la insulina posterior a la toma del glicerol esté involucrado en dicho efecto.

PALABRAS CLAVE: Fertilidad, Glicerol, Insulina, Ganado lechero.

ABSTRACT

In the present study, the possibility to improve conception rate (CR) in Holstein cows, due to an increase in insulin concentration promoted by oral administration of a glycogenic substance (glycerol), was tested. A total of one to three inseminations from 190 Holstein cows, body condition 2.5 to 3 were used. At insemination (day 0), cows were divided at random in two groups, i) glycerol group (n=95) was given 1 L of a glycerol/water solution (90:10 v/v) orally, and again on d 2, 4 and 6; whereas the ii) Control group (n=95), was given 1 L water at the same time. Pregnancy diagnosis was performed 45 d post insemination through rectal examination. Conception rate was compared by χ^2 (Chi Square) test. In six animals in each group, plasma insulin concentrations were determined through radioimmunoassay (RIA) before being drenched with glycerol and in the following 15, 30, 60, 90, 120 and 240 min and compared between groups by ANOVA for repeated measurements. CR was higher in the glycerol group ($P < 0.05$) (47.4) than in control (31.6). Glycerol increased insulin concentration ($P < 0.05$). It is concluded that glycerol administered in the first six days post insemination increases the conception rate in Holstein cows. The increase in insulin levels might be involved in this effect.

KEY WORDS: Fertility, Glycerol, Insulin, Dairy Cattle.

La mortalidad embrionaria es la principal causa de infertilidad en la vaca lechera. Se ha observado que de 80 a 95 % de los ovocitos son fertilizados;

Embryo mortality is the main cause of infertility in dairy cattle. It has been observed that between 80 and 95 % of oocytes are fertilized, but almost

Recibido el 29 de mayo de 2009. Aceptado para su publicación el 20 de agosto de 2009.

^a Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Reproducción. 04510. México D. F. jhc@servidor.unam.mx. Correspondencia al segundo autor.

sin embargo, alrededor de 50 % de ellos muere antes del día 40 posinseminación⁽¹⁾. La mayor parte de las muertes embrionarias ocurre antes de que se establezca el reconocimiento materno de la gestación, por lo que las vacas retornan en estro en un periodo equivalente a un ciclo estral normal⁽²⁾. Para mejorar la fertilidad se han desarrollado estrategias que favorecen la sobrevivencia embrionaria; así, se han utilizado los efectos positivos del factor del crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y de la hormona bovina del crecimiento (bST) en el desarrollo embrionario temprano. En varios estudios se ha demostrado que la inyección de la bST al momento de la inseminación aumenta la proporción de embriones sin anomalías y el porcentaje de concepción^(3,4).

Otra opción para favorecer la sobrevivencia embrionaria consiste en la utilización de la insulina. En condiciones *in vitro*, la insulina previene la apoptosis y favorece el desarrollo embrionario⁽⁵⁾, y estimula la proliferación y función esteroidogénica en las células de la granulosa y de la teca⁽⁶⁾. En estudios *in vivo* la administración de insulina mejora la función lútea y el porcentaje de concepción en vacas repetidoras⁽⁷⁾. Un método para incrementar las concentraciones séricas de insulina consiste en la administración de sustancias glucogénicas. En vacas Holstein tratadas por vía oral con propilenglicol en los días 7 al 42 posparto, se ha observado un aumento en el porcentaje de concepción, lo cual se asocia con incremento en las concentraciones séricas de insulina⁽⁸⁾.

Una estrategia no evaluada para mejorar la fertilidad en vacas Holstein, consiste en la administración de una sustancia glucogénica para incrementar los niveles de insulina durante los primeros días siguientes al servicio, lo que podría favorecer la sobrevivencia embrionaria y el porcentaje de concepción. En este estudio se probó si la administración oral de glicerol durante los primeros días siguientes al servicio aumenta el porcentaje de concepción en vacas Holstein.

El presente trabajo se realizó en un hato lechero en el altiplano de México. Se utilizaron 190 vacas

50 % of them die before day 40 post insemination⁽¹⁾. Most embryo deaths take place before maternal recognition of pregnancy, so cows return to estrus at the normal interestrus interval⁽²⁾. In order to improve fertility several strategies to improve embryo survival have been developed; as the positive effects of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and bovine growth hormone (bST) in early embryo development. In several studies, increase in the conception rate and in the proportion of normal embryos through injection of bST at insemination has been proven^(3,4).

Another approach to enhance embryo survival is increased insulin concentrations. *In vitro*, insulin prevents apoptosis⁽⁵⁾ and encourages the proliferation and the steroidogenesis of granulosa and theca cells⁽⁶⁾. *In vivo*, insulin improves luteal function and conception rate in repeat breeding cows⁽⁷⁾. A method for increasing insulin serum concentration consists of administering glycogenic substances. In Holstein cows drenched with propylene glycol in d 7 to 42 post partum, an increase in the conception rate was observed, which is associated to an increase of seric insulin concentration.

A non evaluated strategy to improve fertility in Holstein cows consists of administering glycogenic substances for increasing insulin levels in the first days after insemination, which could enhance embryo survival and conception rate. The purpose of the present study was to test if glycerol given orally in the first days post insemination improves conception rate in Holstein cows.

The present study was carried out in a Holstein dairy cattle herd in the Mexican highland. A total of 190 cows with a 2.5 to 3 body condition (1=emaciated; 5=obese)⁽⁹⁾ was used. These cows were fed the same rations as the rest of the herd, which consisted of free access to a total mixed ration diet, which covered both maintenance and production needs in accordance with National Research Council nutrient requirements⁽¹⁰⁾. When insemination was performed, cows were distributed at random in two groups: i) glycerol group (n=95), cow were drenched with 1 L of a glycerol: water

Cuadro 1. Días posparto (PPD), número de servicios, número de lactancias y producción de leche (kg) en vacas Holstein de los grupos glicerol y testigo (media \pm error estándar)

Table 1. Postpartum days (PPD), number of inseminations, number of lactations, and milk production (kg) in Holstein cows in the glycerol and control group (mean \pm standard error)

Group	n	PPD	Inseminations	Lactations	Milk (kg)
Glycerol	95	107.3 \pm 4.51	1.6 \pm 0.07	2.19 \pm 0.12	45.37 \pm 0.90
Control	95	103.0 \pm 4.03	1.7 \pm 0.08	2.20 \pm 0.11	43.56 \pm 0.99

($P > 0.05$).

Holstein, con una condición corporal de 2.5 a 3 (uno = emaciada, cinco = obesa;⁽⁹⁾). La alimentación proporcionada fue la misma que la del resto del hato, y consistió en una dieta integral a libre acceso, cubriendo las necesidades tanto de mantenimiento como de producción, de acuerdo con los requerimientos del National Research Council⁽¹⁰⁾. Al momento del servicio las vacas se distribuyeron al azar en dos grupos: el grupo glicerol (n = 95) recibió 1 L de solución de glicerol y agua (90:10, v/v), la cual se repitió en los días 2, 4 y 6 posteriores a la inseminación. El grupo testigo (n = 95) recibió 1 L de agua por vía oral en el mismo esquema. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación rectal el día 45 después del servicio.

En seis animales de cada grupo se tomaron muestras sanguíneas antes del tratamiento (0 min) y en los siguientes 15, 30, 60, 90, 120 y 240 min. Las muestras se obtuvieron por punción de la vena caudal en tubos vacutainer de 10 ml, adicionados con 100 μ l de citrato de sodio. Posterior a la obtención, las muestras se centrifugaron a 1,500 xg por 15 min, para la separación del plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su análisis. Las concentraciones de insulina se determinaron por medio de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida, con el kit Coat-A-Count® Insulin (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A.) con una sensibilidad de 0.052 ng ml⁻¹ y coeficiente de variación intra-ensayo de 9.54 %.

Los días posparto, número de servicios, número de lactancias y la producción de leche el día del servicio fue similar entre las vacas de ambos grupos (Cuadro 1).

solution (90:10 v/v), repeated on d 2, 4 and 6 post insemination; and ii) control group, where cows were drenched with 1 L water following the same pattern. Pregnancy diagnosis was carried out 45 d post insemination through rectal examination.

In six animals of each group blood samples were taken before treatment (0 min) and 15, 30, 60, 90, 120 and 240 min after treatment. Blood samples were collected through puncture of the caudal vein in 10 ml vacutainer tubes. Samples were later centrifuged at 1,500 xg for 15 min for plasma separation, which was kept at -20 °C until being analyzed. Insulin concentrations were determined by RIA in solid phase, using the Coat-a-Count® insulin kit (Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA, USA), having a 0.052 ng ml⁻¹ sensibility and a 9.54 % intra assay variation coefficient.

Postpartum days, number of inseminations, number of lactations and milk production on day of service was similar in both groups (Table 1).

The conception rate was compared between groups through a Chi square test. Insulin concentrations were compared by an ANOVA for repeated measurements and the model included the effects of treatment, time and the interaction. Data was transformed (square root) to satisfy normality supposition.

Conception rate (Table 2) was higher in the glycerol group than in control ($P < 0.05$). Insulin concentrations (Figure 1) were greater in the glycerol group than in control [treatment ($P < 0.05$); time ($P < 0.05$) and interaction time*treatment ($P > 0.05$)]. The mechanism through which the

El porcentaje de concepción se comparó entre grupos mediante una prueba de Ji-cuadrada. Las concentraciones de insulina se compararon por medio de análisis de varianza para mediciones repetidas por REML y el modelo incluyó los efectos del tratamiento, el tiempo y su interacción. Los datos se transformaron (raíz cuadrada) para satisfacer el supuesto de normalidad.

El porcentaje de concepción (Cuadro 2) fue mayor en las vacas del grupo glicerol que en las del grupo testigo ($P < 0.05$). Las concentraciones de insulina (Figura 1) fueron mayores en las vacas del grupo glicerol que en el grupo testigo [tratamiento ($P < 0.05$); tiempo ($P < 0.05$) e interacción tratamiento x tiempo ($P > 0.05$)]. El mecanismo de acción de las dietas glucogénicas en la fertilidad no es claro; sin embargo, puede explicarse por los efectos que tiene la insulina en los procesos relacionados con el desarrollo folicular, la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano⁽⁵⁾. En el presente trabajo el tratamiento se aplicó al momento de la inseminación (12 h aproximadamente después del inicio del estro), por lo que la insulina pudo haber influido en la maduración final del ovocito y en el desarrollo temprano del embrión (primeros seis días). Se conoce que la insulina promueve la esteroidogénesis en el folículo⁽¹¹⁾. Además, el ovocito posee receptores para la insulina y la adición de esta hormona al medio de cultivo favorece su proceso de maduración⁽⁵⁾. También la insulina actúa directamente en el embrión, ya que éste tiene

glycogenic diets act on fertility is not clear, however, it could be explained by means of the effects of insulin on follicle development, oocyte maturation and embryo early development⁽⁵⁾. In the present study, treatment was applied at the time of insemination (approximately 12 h after beginning of estrus), so insulin could have influenced oocyte final maturation and early embryo development (first six days). It is known that insulin promotes follicle steroidogenesis⁽¹¹⁾. In addition, oocytes have insulin receptors, and adding this hormone to a culture media prevents apoptosis and encourages embryo cell mitosis, which results in an increase in the proportion of embryos reaching the blastocyst stage⁽¹³⁾.

In cows fed diets formulated to generate high insulin concentrations, a greater proportion of elongated embryos was found, which had higher concentrations of *tau* interferon (IFN- τ)⁽¹⁴⁾. Due to the fact that one cause of pregnancy failure is incapacity to synthesize enough IFN- τ ⁽²⁾, probably glycerol increases embryo capacity to trigger maternal recognition of pregnancy.

On the other hand, the mechanism through which this treatment increased fertility could be related to

Cuadro 2. Porcentaje de concepción en vacas Holstein tratadas con glicerol por vía oral el día de la inseminación y en los siguientes dos, cuatro y seis días

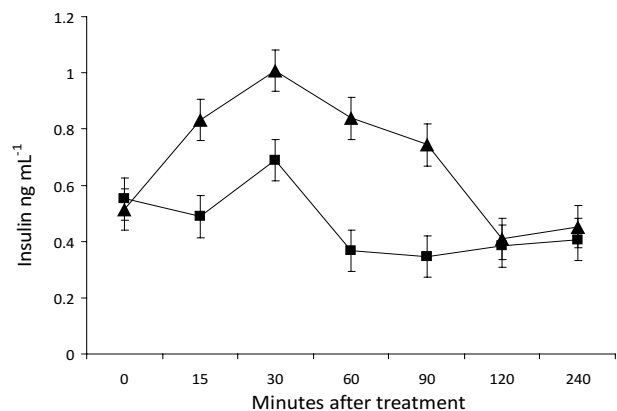
Table 2. Conception rate in Holstein control cows and cows treated with glycerol at insemination and in the following two, four and six days

Group	N	Pregnant	Conception rate
Glycerol	95	45	47.4 ^a
Control	95	30	31.6 ^b

^{ab} Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figura 1. Concentración plasmática de insulina (media \pm error estándar) en vacas Holstein tratadas (—▲—) con 1 L de glicerol (90:10, v/v) y testigos (—■—) ($P < 0.05$)

Figure 1. Plasma insulin concentration (average \pm standard error) in Holstein cows treated (—▲—) with 1 L glycerol (90:10, v/v) and control (—■—) ($P < 0.05$)



receptores para esta hormona⁽¹²⁾. Así, la adición de insulina al medio de cultivo previene la apoptosis y favorece la mitosis de las células embrionarias, lo que resulta en un incremento de la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto⁽¹³⁾.

En vacas alimentadas con dietas para generar concentraciones altas de insulina se encontró una mayor proporción de embriones elongados, los cuales tuvieron concentraciones superiores de interferón *tau* (IFN- τ)⁽¹⁴⁾. Debido a que una de las causas del fracaso del establecimiento de la gestación es la insuficiente capacidad de síntesis de IFN- τ ⁽²⁾, es probable que la administración de glicerol aumente la capacidad embrionaria para establecer el mecanismo de reconocimiento de la gestación.

Por otra parte, el mecanismo por el cual el tratamiento mejoró la fertilidad puede estar relacionado con el efecto que tiene la insulina en la función lútea. Aunque no se midieron las concentraciones de progesterona en este estudio, se conoce que un incremento en las concentraciones de la insulina estimula la función del cuerpo lúteo. Las vacas tratadas con insulina por vía subcutánea muestran un incremento de las concentraciones de progesterona⁽⁷⁾ y el tratamiento oral con propilenglicol durante el periodo posparto mejora la función lútea⁽⁸⁾. El aumento en los niveles de progesterona puede favorecer la fertilidad debido a que se ha encontrado una relación positiva entre las concentraciones de progesterona y el desarrollo embrionario en vaquillas alimentadas con una dieta para incrementar las concentraciones de insulina⁽¹⁴⁾. Además, se ha logrado mejorar el porcentaje de concepción en vacas suplementadas con progesterona durante los primeros días posteriores al servicio⁽¹⁵⁾.

En nuestro conocimiento esta es la primera vez que se demuestra un efecto favorable de un tratamiento de corta duración con una sustancia glucogénica en la fertilidad de vacas lecheras. Estos resultados permiten proponer estudios futuros para establecer los mecanismos de acción.

Se concluye que la administración de glicerol durante los primeros seis días posteriores a la inseminación aumenta el porcentaje de concepción

the effect of insulin on luteal function. Although in the present study progesterone concentrations were not measured, it is a known fact that an increase in insulin concentration stimulates luteal function. Cows treated with insulin subcutaneously show increases in progesterone levels⁽⁷⁾ and post partum oral treatment with propylene glycol improves luteal function⁽⁸⁾. An increase in progesterone levels can promote fertility due to a positive relationship between progesterone concentrations and embryo development was found in heifers fed with a diet which increases insulin levels⁽¹⁴⁾. Moreover, an increase in conception rate in cows supplemented with progesterone in the first days post service was attained⁽¹⁵⁾.

To our knowledge this is the first time that a favorable effect of a short term treatment with a glycogenic substance on dairy cows is found. These findings warrant further studies to establish the role of insulin in embryo development.

It is concluded that glycerol administration during the first six days post-insemination increases conception rate in Holstein cows. The increase in insulin levels might be involved in this effect.

End of english version

en vacas Holstein; probablemente el incremento de la insulina posterior a la toma del glicerol está involucrado en dicho efecto.

LITERATURA CITADA

1. Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt EP. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci* 1994;72(Suppl 3):16-30.
2. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim* 2008;43(Suppl 2):260-267.
3. Moreira F, Risco CA, Pirest MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use o somatotopin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000;83:1237-1247.
4. Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández-Cerón J, Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus

- on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 2001;55:1831-1841.
5. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 2002;62:489-495.
 6. Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I in vitro. *J Anim Sci* 1993;71:1232-1241.
 7. Selvaraju S, Agarwal SK, Karche SD, Srivastava SK, Majumdar AC, Shanker U. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Anim Reprod Sci* 2002;73:141-149.
 8. Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2001;68:29-43.
 9. Ferguson JO, Galligan DT, Thomsen N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1994;77:2695-2703.
 10. NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, DC, USA: National Academy Press; 2001.
 11. Butler ST, Pelton SH, Butler WR. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 2004;127:537-545.
 12. Totey Sm, Pawshe CH, Appa Roa. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. *J Reprod Fertil* 1996;(Suppl 50):113-119.
 13. Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and antiapoptotic activity of insulin bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 2003;126:91-99.
 14. Mann GE, Green MP, Sinclair KD, Demmers KJ, Fray MD Gutierrez CG, Garnsworthy PC, Webb R. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 2003;79:71-79.
 15. Mann GE, Merson P, Fray MD, Lamming GE. Conception rate following progesterone supplementation after second insemination in dairy cows. *Vet J* 2001;162:161-162.