

# NUEVOS PROGRAMAS DE SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS

Andrés Cedeño<sup>1,3,4</sup> y Gabriel A. Bó<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural General Paz, Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencias Básicas, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup>Maestría en Reproducción Bovina, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>4</sup>Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM), Calceta, Manabí, Ecuador.

## Resumen

El objetivo principal de implementar la transferencia de embriones en las ganaderías de carne bovina es acelerar la tasa de progreso genético en los mismos. Entre los principales factores que afectan el uso de estas tecnologías se encuentran la nutrición, la gestión y la sincronización del celo. Como resultado de la investigación llevada a cabo en los últimos 20 años, la utilización de las receptoras para esta técnica se ha incrementado mediante la aplicación de protocolos que sincronizan la ovulación que permiten la transferencia de embriones sin la necesidad de detección de celo, técnica generalmente conocida como transferencia de embriones de tiempo fijo (FTET). Aunque estos protocolos han funcionado adecuadamente durante varios años, la atención reciente se ha dirigido al efecto de la expresión del celo y las concentraciones de estradiol durante el crecimiento del folículo preovulatorio sobre el crecimiento embrionario y la preñez. Los experimentos revisados en este documento demuestran que la expresión del celo se asocia positivamente con altas tasas de preñez y reducidas pérdidas de gestación en las receptoras que reciben embriones bovinos congelados/descongelados producidos *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: pérdidas embrionarias y fetales, celo, receptoras.

## Introducción

El principal objetivo de un programa de transferencia de embriones es aumentar el valor genético de la descendencia producida en una ganadería. La nutrición, el manejo y la eficiencia en la detección del celo se encuentran entre los factores que afectan el uso de estas tecnologías (Mapletoft y Bó, 2016). Los protocolos que sincronizan el celo y la ovulación han permitido a la transferencia de embriones ser aplicada en un tiempo predeterminado, sin el requisito de la detección de celo. Estos protocolos generalmente se conocen como transferencia de embriones de tiempo fijo (TETF; Bó *et al.*, 2002, 2012a). Aunque los esfuerzos para sincronizar la ovulación han resultado en la ovulación de las vacas en un intervalo de tiempo más corto en comparación con los animales en ciclos estrales no tratados, a menudo ocurre que la esta sincronización resulta en animales que se encuentran sin expresión de celo. El objetivo de este manuscrito es revisar brevemente los protocolos que se utilizan para sincronizar la ovulación, y discutir cómo la expresión del celo puede afectar la preñez en programas de sincronización de receptoras para la transferencia de embriones.

## **Principales tratamientos convencionales de sincronización para embriones en Sudamérica**

Aunque la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) se ha utilizado con mayor frecuencia para la sincronización del celo, el requerimiento de la detección del celo y la variabilidad en el intervalo entre el tratamiento, el celo y la ovulación han afectado negativamente su rendimiento en programas de transferencia de embriones, especialmente en bovinos *Bos taurus* (revisado en Bó *et al.*, 2002).

Para evitar las limitaciones asociadas con la detección de celo, se han utilizado tratamientos que sincronizan el momento de la ovulación para efectuar la FTET, que se desarrollaron originalmente para efectuar la IA a tiempo fijo. Estos tratamientos generalmente se dividen en aquellos que están basados en el tratamiento con GnRH (Ambrose *et al.*, 1999) y aquellos que están basados en la aplicación de estradiol (Bó *et al.*, 2002). En cualquier caso, los protocolos de sincronización de receptoras incluyen la inserción de un dispositivo liberador de progesterona (P4) durante 7 u 8 días (Hinshaw, 1999; Bó *et al.*, 2002).

Los tratamientos basados en estradiol y P4 (estradiol/P4) son los protocolos más utilizados para sincronizar la emergencia de la onda folicular y la ovulación de las receptoras en América del Sur (Baruselli *et al.*, 2010). El protocolo más simplificado y que ha sido utilizado más comúnmente en la actualidad consiste en la inserción de un dispositivo liberador de P4 y la administración de 2 mg de benzoato de estradiol (EB) en el día 0, PGF<sub>2α</sub> en el momento de la inserción y extracción del dispositivo P4 si está impregnado con > 1 g de P4 y solo en el momento de la remoción del dispositivo P4 si el mismo contiene <1 g de P4. El dispositivo P4 generalmente se remueve en el día 7 u 8 y se administran 300 o 400 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ese momento (Bó *et al.*, 2002). Posteriormente, la ovulación es inducida por la administración de 0,5 o 1 mg de cipionato de estradiol (ECP) en el momento de la remoción de los dispositivos P4 y todas las receptoras con cuerpo lúteo (CL) reciben un embrión 9 días después (es decir, 7 días después del tiempo esperado de celo; Baruselli *et al.* 2010, 2011; Bó *et al.* 2012a, b).

En general, el 75 a 85% de las receptoras tratadas con este protocolo reciben un embrión (comparado con 50% o menos con sincronización PGF<sub>2α</sub>), con estos protocolos las concentraciones de P4 son altas en el momento de la transferencia embrionaria y la preñez por transferencia de embriones (P/ET) con estos tratamientos generalmente exceden el 50%, cuando los embriones y las receptoras son de alta calidad (revisado en Bó *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*, 2010, 2011).

### **Protocolos que prolongan el periodo del proestro**

Estudios recientes han sugerido que el efecto de reducir la duración de la exposición del dispositivo liberador de P4 a 5 días y aumentar el intervalo entre la remoción del dispositivo P4 y la GnRH y la IA a 3 días, puede mejorar las tasas de preñez por IA (P/AI) comparado con el protocolo convencional o tradicional de 7 días de dispositivo GnRH/P4 en el ganado de carne (Bridges *et al.*, 2008). Además, se sugirió que una reducción en la longitud de la fase de crecimiento del folículo ovulatorio antes de la ovulación, como ocurre en algunos animales tratados con los protocolos convencionales de 7 días de P4, altera la capacidad esteroidogénica del folículo dominante antes de la ovulación y la del CL resultante, y por ende disminuye la

capacidad del útero para ayudar en el desarrollo embrionario (revisado en Bridges *et al.*, 2013). Utilizando un protocolo Co-Synch + CIDR modificado de 5 días (sin GnRH en la inserción del dispositivo P4, PGF2 $\alpha$  en la remoción del dispositivo de P4 en el día 5 y GnRH en el día 8) Sala *et al.* (2016) informaron tasas similares de P/ET con embriones producidos in vitro en las receptoras sincronizadas con dos tratamientos con PGF2 $\alpha$  por 14 días de intervalos y detección de celo. En base a estos hallazgos, evaluamos la efectividad de un protocolo de tratamiento con estradiol/P4 en el que la exposición al dispositivo P4 se redujo a 6 días y el proestro se alargó mediante la administración de GnRH 72 h después de la extracción del dispositivo P4 en lugar de ECP al retirar el dispositivo. El protocolo para la IATF se llamó J-Synch (de la Mata y Bó, 2012). Este protocolo ha resultado en mayores tasas de P/IA en vaquillas de carne en comparación con el protocolo convencional en el que el dispositivo P4 se elimina el día 7 y se administra ECP en ese momento (Bó *et al.*, 2016).

Recientemente se han llevado a cabo una serie de estudios para evaluar el efecto del protocolo J-Synch en programas de transferencia de embriones (Menchaca *et al.*, 2015, 2016). Los experimentos se llevaron a cabo en Uruguay en 3.782 vacas *Bos taurus* las cuales fueron sincronizadas para recibir un embrión de la raza Holstein por TETF producidos in vitro y con semen sexado. En el primer experimento se comparó las tasas de preñez obtenidas con el protocolo J-Synch y con el protocolo convencional (estradiol/P4) en el programa de TETF. El protocolo J-Synch se realizó como se describió anteriormente con GnRH administrada a las 72 h (n=456) o 1 mg de EB administrado a las 60 h después de la remoción del dispositivo de P4 (n=461). En el experimento 3, se evaluó el efecto del tiempo de administración de la GnRH en el protocolo J-Synch (la GnRH se administró a las 60 h; n=452 o 72 h; n=466) después de la eliminación del dispositivo. Para todos los experimentos, las receptoras recibieron embriones producidos in vitro el día 16-17 a través de TETF, y la preñez a la transferencia de embriones (P/TE) se determinó mediante ultrasonografía 40-50 días después. En general, la tasa de P/TE fue mayor en las receptoras del grupo J-Synch (49,4%, 229/464) que las del grupo convencional (41,0%, 197/481; P <0,05) independientemente de si se administró GnRH a las 72 h (58,8%, 230/391) o EB a las 60 h (54,7%, 227/415); o si se administró GnRH a las 60 h (47,8%, 216/452) o 72 h (50,4%, 235/466). Sin embargo, los resultados sugieren que la prolongación de la exposición al estradiol endógeno antes de la ovulación, como ocurre con el protocolo J-Synch, mejora la P/TE con embriones producidos in vitro. También fue notable en un cuarto estudio, en el que las vacas (n=581) fueron tratadas con el protocolo J-Synch (como se describió anteriormente), pero se permitió que algunas receptoras ovularan espontáneamente (sin GnRH; n=532), la P/TE fue mayor en las receptoras que no recibieron GnRH (57,5%, 306/532 vs. 51,5%, 299/58; P <0,05). Los resultados sugieren que acortar el período de crecimiento de los folículos ovulatorios con GnRH puede afectar negativamente las posibilidades de preñez en algunas vacas. Por lo tanto, esperar la expresión natural del celo puede mejorar P/TE.

### **Expresión del celo, estradiol preovulatorio y el establecimiento de la preñez**

El celo se define como el período en el que una hembra es sexualmente receptiva al macho y se debe a un aumento de las concentraciones circulantes de estradiol en un momento en que las concentraciones de P4 son bajas (Allrich, 1994). Además, se ha sugerido que la progresión de eventos requeridos para el crecimiento, alargamiento, supervivencia y fijación del conceptus se ven influenciados por la coordinación de

eventos que conducen a una disminución de las concentraciones de P4 y un aumento en las concentraciones de estradiol antes del inicio del celo (Bridges *et al.*, 2013). Se ha informado que las concentraciones de estradiol preovulatorio tienen un impacto positivo en el desarrollo posterior de conceptus, y se ha informado también que las vacas que exhiben signos de celo tienen un conceptus de mayor longitud en el día 19 de gestación en comparación con aquellas que no muestran signos de celo (Davoodi *et al.*, 2016).

Se ha demostrado anteriormente que la manifestación del celo en los programas de IATF está asociada positivamente con la preñez a la inseminación (P/AI) en el ganado *Bos taurus* (Richardson *et al.*, 2016) y en el ganado de carne *Bos taurus* x *Bos indicus* (Bó *et al.*, 2017), asociado con el diámetro del folículo dominante en los programas de IATF, el diámetro del CL posterior, con las concentraciones de P4 en la fase lútea y la P/IA en el ganado de carne *Bos indicus* (Sá Filho *et al.*, 2011). Además, el diámetro del folículo dominante en el momento de la IATF se ha asociado con el éxito de la preñez tanto en el ganado *Bos taurus* (Lamb *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004, 2005, 2007) como en los *Bos indicus* (Sá Filho *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando fueron inseminadas vacas de carne con posparto temprano fueron inseminadas basándose en los signos del celo, el tamaño del folículo ovulatorio no influyó en el éxito de la preñez (Perry *et al.*, 2005), lo que indica que las altas concentraciones de estradiol producidas por el folículo ovulatorio dominante son esenciales (Perry *et al.*, 2014). Más específicamente, la madurez del folículo puede afectar la fertilidad a través de la preparación de un ovocito más competente para el desarrollo del embrión, la preparación de células foliculares para la luteinización y/o la preparación del ambiente uterino para el establecimiento de la preñez. Por lo tanto, la expresión del celo puede afectar la P/TE en receptoras sincronizados con protocolos de TETF.

Se ha demostrado previamente que la expresión del celo en las receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* tratadas con el protocolo Ovsynch resultó en un mayor diámetro del folículo dominante ovulatorio, con las concentraciones subsecuentes de P4 y el diámetro y área del CL y a una mayor P/TE que en aquellas receptoras que no mostraron celo (Baruselli *et al.*, 2003). Las razones para obtener una mayor P/TE en las receptoras que muestran celo es que estas estuvieron expuestas a concentraciones de estradiol más altas que aquellas que fueron inducidas a ovular con GnRH antes de mostrar celo y por ende con concentraciones más altas de P4 en el momento de la TE. En un estudio reciente que involucró la transferencia de embriones entre vacas donantes y receptoras inducidas para ovular un folículo dominante grande o pequeño con la aplicación de GnRH, reveló resultados interesantes (Atkins *et al.*, 2013). En el estudio de Atkins *et al.* (2013), los embriones (n=354) que se obtuvieron de las vacas inducidas para ovular un folículo grande o pequeño con GnRH se transfirieron en receptoras que también fueron inducidas a ovular un folículo grande o pequeño con la aplicación de GnRH. El mantenimiento de la preñez de 7 a 27 días de gestación se mejoró por el aumento de las concentraciones séricas de estradiol en el momento del tratamiento con GnRH y las concentraciones de P4 7 días después en las receptoras. Sin embargo, este estudio también se demostró que el diámetro del folículo no era tan importante, ya que las receptoras con folículos grandes tuvieron tasas de preñez más bajas, lo que indica que el estradiol producido por un nuevo folículo dominante en crecimiento beneficiará más a la preñez que un folículo grande envejecido que ya ha reducido la producción de estradiol en el momento de la ovulación inducida por la aplicación de GnRH (Bridges *et al.*, 2014).

En otro estudio, las vacas donantes y receptoras se dividieron retrospectivamente en función de las concentraciones plasmáticas de estradiol, producto de una ovulación

inducida (Jinks *et al.*, 2013). En este estudio, las concentraciones circulantes de estradiol de las receptoras, no de las donantes, se relacionaron con tasas de preñez más altas, lo que indica que el beneficio principal del aumento de las concentraciones de estradiol preovulatorio está mediado por alteraciones en el entorno uterino de las receptoras. Finalmente, se realizaron otros dos estudios en los que se administraron tratamientos de estradiol para aumentar las concentraciones circulantes de estradiol antes de la ovulación. Jinks *et al.* (2013) informaron que la administración de 0,5 mg de ECP 24 h antes de la IA aumentó la P/IA en las vacas inducidas a ovular con GnRH un folículo dominante pequeño (<12,2 mm). Madsen *et al.*, (2015) trataron vacas ovariectomizadas con dispositivos CIDR (1,38 g de P4, Zoetis, EEUU) para mimetizar la fase lútea, y luego se trataron con 2,5 mg de ECP 12 h después de la remoción del CIDR y 1,2 mg EB 36 h después de la remoción del dispositivo o ningún tratamiento (CON) para imitar un período preovulatorio en estos animales. La ovulación se simuló con una inyección de GnRH 48 h después de la remoción del CIDR y luego se transfirieron los embriones 7 días después del celo. La preñez se mantuvo mediante la administración de P4 inyectable de días 3 a 6 y luego de la remoción del dispositivo de progesterona hasta el día 29 de gestación. Las vacas que recibieron tratamientos con estradiol tuvieron mayor supervivencia embrionaria y P/TE en comparación con las vacas del grupo control (4, 29 y 21% para el grupo control, benzoato de estradiol y cipionato de estradiol, respectivamente; Madsen *et al.*, 2015).

#### **Expresión del celo y las tasas de preñez en las receptoras tratados con protocolos de TETF con estradiol y P4**

A pesar de revisar los estudios previos, el efecto (s) de las concentraciones de estradiol y la expresión del celo en las tasas de preñez en las receptoras sincronizadas en América del Sur no están todavía claro, ya que la mayoría de los programas se efectúan con protocolos basados en estradiol/P4. Además, parece importante diferenciar si las vacas son inducidas a ovular con EB o ECP; puesto que las concentraciones plasmáticas resultantes de estradiol-17 $\beta$  serían mucho más altas durante un período de tiempo más corto en las vacas tratadas con EB que en las tratadas con ECP (revisado en Bó *et al.*, 2013). En ese sentido, los resultados previos de nuestro grupo (Bó *et al.*, 2012b) y de otros (Looney *et al.*, 2010) no han mostrado efectos significativos en cuanto a la expresión del celo y el efecto sobre la P/TE en receptoras que recibieron EB en comparación con el estradiol-17 $\beta$  de acción más breve para inducir la ovulación.

Un análisis retrospectivo de varios experimentos realizados en 13 campos lecheros comerciales de diferentes estados en Brasil utilizando un protocolo basado en estradiol y P4 pero con ECP en lugar de EB para inducir la ovulación, reveló una asociación positiva entre la expresión del celo y la fertilidad (Pereira *et al.*, 2016). Este estudio efectuado Pereira *et al.* (2016) lo realizaron en vacas lecheras lactantes las cuales fueron inseminadas artificialmente (n=5430) o usadas como receptoras de embriones (n=2003). Todas las vacas fueron tratadas con un CIDR (Zoetis, Brasil) y 2 mg de EB el día 0, 25 mg de Dinoprost (Lutalyse, Zoetis) en el día 7, y la remoción de CIDR más 1 mg de ECP (Zoetis) el día 9. Las vacas fueron IATF en el día 11 o recibieron TETF con embriones frescos producidos *in vitro* el día 18. Se detectó celo con dispositivos detectores de monta (Estrotec, Rockway Inc., Spring Valley, WI) y se determinó la preñez a los 32 y 60 días de gestación. La expresión del celo influyó positivamente (P<0,01) sobre P/AI a los 32 del diagnóstico de gestación (si celo 38,9%, 1785/4584 vs. no celo 25,5%, 222/846) y sobre la P/TE (si celo 46,2%, 645/1397 vs. no celo 32,7%, 193/606). Además, las pérdidas de gestación en el día 60 fueron menores (P<0,01) en las vacas que expresaron celo en la IATF (si celo 14,4%, 255/1785 versus no celo

20,1%, 43/222) y en las TETF (si celo 18,6%, 120/645 vs. no celo 22,7%, 43/193). Resultados similares han sido reportados en vaquillas cruza *Bos indicus* x *Bos taurus*; donde la manifestación del celo hasta 3 días después de la remoción del dispositivo de P4 aumentó la probabilidad de preñez en las receptoras que recibieron embriones producidos in vitro (Frade *et al.*, 2014). Las vaquillas que expresaban celo tuvieron una mayor P/TE que las vaquillas que no expresaron celo (62,4%, 106/170 vs. 47,0%, 31/66;  $P \leq 0,01$ ). Además, las vaquillonas que quedaron preñadas tuvieron mayores concentraciones circulantes de P4 en el día de la TETF ( $2,8 \pm 0,14$  ng / ml;  $n = 137$ ) que aquellas que no quedaron preñadas ( $2,2 \pm 0,18$  ng/ml;  $n=99$ ;  $P=0,04$ ; Frade *et al.*, 2014). Por lo tanto, la exposición secuencial a mayores concentraciones de estradiol durante la fase preovulatoria y la posterior exposición a niveles altos de P4 en el diestro influyeron positivamente en el éxito de las preñeces después de un programa de TETF.

El posible inconveniente práctico de estos resultados podría ser que la transferencia de embriones solo será realizada en las receptoras que expresan celo, lo cual reduciría la proporción de receptoras transferidos/tratados (menor tasa de aprovechamiento), pero se ha demostrado como uno de los principales beneficios para mejorar la tasa de preñez en los programas de TETF de receptoras en Sudamérica (Bó *et al.*, 2002, 2012b; Baruselli *et al.*, 2010, 2011).

Otros dos trabajos fueron realizados en Argentina por Cedeño *et al.*, (2017) con la finalidad de confirmar de que la expresión del celo tenía un efecto positivo sobre P/TE y el mantenimiento de las gestaciones en receptoras tratadas con protocolos basados en estradiol/P4. Un objetivo secundario de estos trabajos fue evaluar si la administración de GnRH en el momento de la manifestación del celo a las receptoras que no mostraban celo aumentaría la proporción de receptoras transferidas y preñadas. En el primer experimento, se usaron 729 vacas de carne sin cría al pie (Bonsmara x *Bos indicus*, Brangus y Braford) donde todas recibieron un dispositivo DIB 0,5 g (Zoetis, Argentina) más 2 mg de EB en el día 0 y en el día 8, se removieron los DIB y se aplicó 400 UI de eCG (Novormon 5000, Zoetis) más 0,5 mg de ECP (Cipiosyn, Zoetis) y 500 µg de cloprostenol (Ciclase DL, Zoetis; Cedeño *et al.*, 2017). Todas las vacas fueron pintadas en la base de la cola o zona sacrocoxígea (CeloTest, Biotay S.A., Argentina) para la detección visual de la manifestación del celo ( $> 30,0\%$  de pérdida de pintura = en celo). Todas las receptoras que no mostraron celo a las 48 h (pérdida de pintura  $\leq 30,0\%$ ) se dividieron aleatoriamente para recibir GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina, Gonasyn GDR, Zoetis) o ningún tratamiento. El celo fue nuevamente detectado y registrado a las 56 h después de la remoción del dispositivo de P4. En el día 17, todas las vacas fueron examinadas por ultrasonografía transrectal y aquellas con CL  $\geq 18$  mm (grado 1),  $\geq 16$  y  $< 18$  mm (grado 2) y  $\geq 14$  y  $< 16$  mm de diámetro (grado 3) recibieron un embrión producido in vivo, embriones frescos congelados/descongelados in vivo o producidos in vitro frescos mediante la técnica de la transferencia no quirúrgica. La proporción general de receptoras transferidas fue del 88,1% (583/729) y la P/TE general fue del 46,0% (268/583). La proporción de receptoras en celo a las 48 y 56 h después de la extracción del dispositivo de P4 fue del 87,6% y la P/TE fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las receptoras que mostraron celo (48,3%, 250/518) que en las que no mostraron celo (30,1 %; 22/73; Tabla 1). Cuando se consideró el diámetro del CL en el momento de la TETF, la P/TE no difirió en las receptoras que mostraron celo y que tenían un CL  $\geq 18$  mm o entre 16 y 18 mm; sin embargo la P/TE fue menor en aquellas que no mostraron celo, incluso en aquellas con CL  $\geq 18$  mm de diámetro en el momento de la TETF ( $P < 0,05$ ; Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la expresión del celo y el diámetro del CL en el momento de la TETF sobre la P/TE en receptoras de carne tratadas con protocolos de sincronización con estradiol y P4 \*.

	Diámetro del CL (mm)			Total
	≥18	≥16 & <18	≥14 & <16	
<b>Si Celos</b>	48,9% <sup>a</sup> (183/374)	44,9% <sup>ab</sup> (40/89)	14,3% <sup>c</sup> (1/7)	48,3% <sup>a</sup> (250/518)
<b>No Celos</b>	47,9% <sup>b</sup> (35/73)	29,5% <sup>b</sup> (13/44)	0% <sup>d</sup> (0/4)	30,1% <sup>b</sup> (22/73)
<b>Total</b>	48,8% <sup>a</sup> (218/447)	40,0% <sup>a</sup> (53/113)	9,1% <sup>b</sup> (1/11)	

<sup>abcd</sup> Indican diferencias significativas entre las filas y las columnas (P<0,05). \* Todas las vacas recibieron 400 IU de eCG, 500 µg de cloprostenol y 0,5 mg de ECP en la remoción del dispositivo de P4 y se observó la expresión del celo (es decir, pérdida de pintura de la base de la cola) 48-56 h más tarde.

Cuando se consideró el tratamiento con GnRH en receptoras que no expresaron celo a las 48 h después de la remoción del DIB, la P/TE fue significativamente mayor (P<0,05) en aquellas tratadas con GnRH (34/74, 46,0%) que en aquellas no tratadas con GnRH (12/46, 26,0%). Sin embargo, cuando se consideró la expresión del celo a las 56 h después de la remoción del DIB, la P/TE fue mayor en las receptoras que presentaron celo, recibieran o no GnRH (26/48, 54,2%) que en las que no mostraron celo (15/43; 34,9%), y aunque los números fueron bajos, el tratamiento con GnRH no pareció aumentar la P/TE en las receptoras que no mostraron celo (GnRH: 38,0%, 8/21 vs. no GnRH: 31,8%, 7/22).

Un segundo estudio se efectuó utilizando vacas de carne cruce cebú sin cría al pie (205 Brangus y 198 Braford, Cedeño *et al.*, 2018). Sobre el día 0, todos los animales recibieron un dispositivo impregnado de progesterona DIB 0,5 más 2 mg de EB. Luego las receptoras fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos de tratamiento de sincronización (Convencional y J-Synch). En las receptoras tratadas con el protocolo de sincronización de estradiol/P4 denominado convencional, los dispositivos de P4 se removieron en el día 8 y además recibieron PGF2α, eCG y ECP al mismo tiempo. En las receptoras tratadas con el protocolo J-Synch, los dispositivos de P4 se removieron

en el día 6 y además recibieron PGF2 $\alpha$  y eCG al mismo tiempo. Todas las receptoras fueron pintadas en la cola y aquellas que no mostraron celo a las 48 h (grupo convencional) o 62 h (grupo J-Synch) recibieron GnRH en ese momento. Las receptoras se pasaron nuevamente por la manga 8 h después del primer diagnóstico de celo y aquellas que se evidenciaron sin signos de celo en ese momento (perdida de la pintura) se registraron. Todas las vacas con CL recibieron un embrión producido in vitro por TETF 7 días después del celo o del tratamiento con GnRH. La proporción general de receptoras transferidas fue del 86,5% (352/407) y la P/TE general fue del 37,8% (133/352). Aunque la proporción de receptoras transferidas fue mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo convencional 90,0% (180/201) que en el grupo J-Synch 83,5% (172/206), no se encontraron diferencias significativas en la P/TE entre los dos grupos de sincronización (Convencional: 36,6%, 66/180 vs. J-Synch 39,0%, 67/172). Sin embargo, el hallazgo más importante de este experimento fue la gran diferencia en la P/TE y las pérdidas de preñez entre las receptoras que mostraron celo, independientemente del grupo de tratamiento. Las receptoras que mostraron celo tuvieron una P/TE significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que aquellas que no mostraron celo (Tabla 2). Además, las receptoras que no mostraron celo tuvieron una mayor tasa de pérdidas embrionarias/fetales entre los 30 y 60 días ( $P=0,004$ ) de gestación y consecuentemente una menor P/TE a los 60 días y una menor tasa de partos ( $P < 0,01$ ; Tabla 3).

Tabla 2. Preñez/TE en función a la expresión del celo en receptoras tratadas con dos tratamientos de sincronización usando protocolos con estradiol y progesterona.

	Tratamientos de sincronización		
	Convencional	J-Synch	Total
<b>Si celo</b>	38,3% (62/162)	40,0% (62/155)	39,1% <sup>a</sup> (124/317)
<b>No Celos</b>	22,2% (4/18)	29,4% (5/17)	25,7% <sup>b</sup> (9/35)

<sup>ab</sup> Indican diferencia significativas entre las columnas con diferentes superíndices ( $P < 0,05$ ).

Tabla 3. Efecto de la expresión del celo sobre la P/TE a los 30 y 60 días de gestación, tasa de preñez entre los 30 a 60 días de gestación, pérdidas de preñez entre los 60 días al parto y tasas de parición en receptoras de embriones sincronizadas con protocolos con estradiol y progesterona.

	P/TE (30 días)	P/TE (60 días)	Pérdidas de gestación (30 a 60 días)	Pérdidas de gestación (60 días al parto)	Tasa de parición
<b>Estrus</b>	39,1% <sup>a</sup> (124/317)	37,0% <sup>a</sup> (117/317)	5,6% <sup>a</sup> (7/124)	20,5% <sup>c</sup> (24/117)	29,3% <sup>a</sup> (93/317)



<b>No</b>	25,7% <sup>b</sup>	8,6% <sup>b</sup>	66,7% <sup>b</sup>	66,7% <sup>d</sup>	2,9% <sup>b</sup>
<b>Estrus</b>	(9/35)	(3/35)	(6/9)	(2/3)	(1/35)
<b>Total</b>	38,0%	34,1%	9,8%	21,7%	26,7%
	(133/35)	(120/352)	(13/133)	(26/120)	(94/352)

<sup>ab</sup> Incidan diferencias significativas entre las columnas (P<0,01)

<sup>cd</sup> Indican tendencias a diferir (P<0,06)

Los resultados no son tan similares a estudios previos en los que las tasas de P/TE fueron 8,5% mayor con el protocolo J-Synch que las receptoras sincronizadas con el protocolo convencional (Menchaca *et al.*, 2015). De hecho, la pequeña diferencia a favor del grupo J-Synch fue anulada por la mayor proporción de receptoras que se transfirieron en el grupo convencional. Las diferencias en la proporción de receptoras transferidos/tratados podrían deberse a una mayor tasa de ovulación en las vacas con folículos pequeños que recibieron ECP en lugar de GnRH (Jinks *et al.*, 2013). Sin embargo, el hallazgo más interesante en los cuatro estudios revisados en esta sección fue la diferencia en la P/TE entre las receptoras que muestran celo y aquellos que no muestran celo, sugiriendo que la expresión del celo en los programas de TETF está relacionada con un ambiente uterino que favorece el desarrollo del embrión (revisado por Bridges *et al.*, 2013 y Perry, 2017). Como se indicó anteriormente, aunque las receptoras recibieron ECP en el momento de la remoción del dispositivo de P4, aquellas que manifestaron celo probablemente tenían concentraciones plasmáticas de estradiol más altas como resultado de la administración de ECP y del folículo ovulatorio en desarrollo que en aquellas que no mostraron celo. Por lo tanto, las receptoras que mostraron celo tuvieron suficiente exposición a estradiol suficiente para los cambios requeridos en el entorno uterino que benefician el crecimiento embrionario, la supervivencia y el establecimiento de la preñez (Bridges *et al.*, 2013).

Este último estudio y el de Pereira *et al.* (2016) mostraron una tasa de pérdida de gestación significativamente más alta en las receptoras que no mostraron celo. Sorprendentemente, las pérdidas de gestación después de los 60 días también fueron más altas en las receptoras que no mostraron celo. Se han reportado pérdidas embrionarias/fetales de hasta 17,2% desde el día 32 hasta el día 60 de preñez en vaquillonas de leche (García Guerra *et al.*, 2016) y entre 0 a 34,5% en vacas de carne transferidas con embriones producidos in vitro (Tribulo *et al.*, 2017). Sin embargo, ninguno de estos reportes ha relacionado a la expresión del celo con las pérdidas de las gestaciones desde los 60 días hasta el término final de la misma (parto). Se sabe que durante este período hay un crecimiento continuo del feto y también existen cambios dramáticos en la placenta para satisfacer las crecientes demandas nutricionales del feto en desarrollo (revisado por Wiltbank *et al.*, 2017). Las estimaciones de la pérdidas de preñez durante este período podrían variar entre un 3 y 5% en las receptoras que reciben TE con embriones in vivo y hasta un 20% en las receptoras que reciben TE con embriones producidos in vitro (Bó y Cedeño, 2018, IRAC, Córdoba, Argentina, datos sin publicar). Los factores asociados con el aumento de la pérdida de preñez en este período no se han estudiado con detalle; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de varios agentes infecciosos que puedan afectar la preñez durante este período de tiempo. En otro estudio la producción de gemelos por transferencia embrionaria se ha identificado como uno de los principales contribuyentes a la pérdida de preñeces durante este período (López Gatiús *et al.*, 2004). Sin embargo, este no es el caso en el estudio descrito actualmente porque todas las receptoras recibieron embriones individuales. Aunque otras razones pueden estar relacionadas con el propio embrión producido in vitro (Miles *et al.*, 2005), esto no

explicaría las diferencias observadas entre las receptoras que mostraron o no celo. Obviamente, se requieren más estudios para confirmar estos hallazgos.

### **Conclusiones finales**

Los protocolos desarrollados para realizar la TETF durante los últimos 20 años han brindado a los profesionales una oportunidad mayor de transferir gran cantidad de embriones en las receptoras, lo cual ha sido crucial para el desarrollo de la industria de la fertilización in vitro (IVF) derivada de la producción de embriones a gran escala en Sudamérica. Aunque las tasas generales de preñez se han considerado adecuadas para la mayoría de los médicos veterinarios, existen factores como la expresión del celo, que se deben considerar para programas exitosos de transferencia de embriones, especialmente en protocolos en los que se usa ECP para inducir la ovulación y en los que no se administra estradiol en el momento de la remoción del dispositivo de P4. El presente manuscrito ha revisado varios estudios que muestran una correlación positiva entre la manifestación del celo, las tasas de preñez y el mantenimiento de las gestaciones en las receptoras. El uso de parches de detección de celo o pintura sobre la base de la cola en las receptoras, ayudaría a identificar a los animales que muestran celo simplemente pasándolos a través de la manga en el momento apropiado, sin la necesidad de observaciones de celo tradicional e intensivo en cuanto a la mano de obra. Estas modificaciones se pueden implementar fácilmente en los programas de sincronización de receptoras y deberían dar como resultado general tasas de preñez más altas.

### **Agradecimientos**

Los trabajos de investigación desarrollados por nuestro grupo fueron respaldados económicamente por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología a la cual se agradece (FONCYT PICT 2017-4550), también agradecemos al Instituto de Investigación Universidad Nacional de Villa María (UNVM) y al Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC).

### **Bibliografía**

**Allrich RD.** 1994. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci*, 77:2738-2744.

**Ambrose JD, Drost RL, Monson RL, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Thatcher MJ, Kassa T, Binelli M, Hansen PJ, Chenoweth PJ, Thatcher WW.** 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro-produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci* 82: 2369-2376.

**Atkins, JA, Smith MF, MacNeil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, Geary TW.** 2013. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J Anim Sci* 91:722-733.

- Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Berber RCA, Valentim R, Carvalho Filho AF, Costa Neto WP.** 2003. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo Ovsynch para inovulação em tempo fixo. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 40:96-106.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Nasser LFT, Rodrigues C, Bó GA.** 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev*, 22:67-74.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Sá Filho MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bó GA.** 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76:1583-1593.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft, RJ.** 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57:53-72.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ.** 2012a. Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. *Anim Reprod*, 9:312-317.
- Bó GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ.** 2012b. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod Fertil Dev*, 24:272-277.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ.** 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim Reprod*, 10:137-142.
- Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A.** 2016. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, 86:388-396.
- Bó GA, Cedeño A, Tribulo A, Andrada S, Tribulo R, Mapletoft RJ.** 2017. Influence of estrus expression and treatment with GnRH on pregnancy rates in beef cattle synchronized with progesterone devices and estradiol and inseminated at a fixed time. *Reprod Fertil Dev*, 29:111. (Abstract).
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML.** 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 69:843-851.
- Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH.** 2013. Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J Anim Sci*, 91:3002-3013.
- Bridges GA, Mussard ML, Hesler LA, Day ML.** 2014. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology*, 81:632-638.

- Cedeño A, Tribulo A, Andrada S, Barajas JL, Fonseca J, Ruiz A, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ, Bó GA.** 2017. Influence of estrus expression and treatment with GnRH on pregnancy rates in recipients synchronized with progesterone devices and estradiol and transferred at a fixed time. *Reprod Fertil Dev*, 29:159-160. (Abstract).
- Cedeño A, Tríbulo P, Tríbulo A, Barajas JL, Ortega JA, Andrada JS, Lozano D, Monguillot I, Brandan A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA.** 2018. Effect of synchronization treatment and estrus expression on conception rates and pregnancy losses in recipients receiving in vitro produced embryos. *Reprod Fertil Dev*, 30:181. (Abstract).
- Davoodi S, Cooke RF, Fernandes AC, Cappellozza BI, Vasconcelos JL, Cerri RL.** 2016. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology*, 85:645-655.
- de la Mata JJ, Bó GA.** 2012. Estrus synchronization and ovulation using protocols with estradiol benzoate and GnRH and reduced periods of insertion of a progesterone releasing device in beef heifers. *Taurus*, 55:17-23.
- Frade MC, Frade C, Cordeiro MB, Sá Filho M, Mesquita FS, Nogueira GP, Binelli M, Bertan Membrive CM.** 2014. Manifestation of estrous behavior and subsequent progesterone concentration at timed-embryo transfer in cattle are positively associated with pregnancy success of recipients. *Anim Reprod Sci*, 151:85-90.
- Garcia-Guerra A, Sala RV, Baez GM, Fosado M, Melo LF, Motta JCL, Leffers L, Walleser EA, Ochoa JC, Moreno JF, Wiltbank MC.** 2016. Treatment with GnRH on Day 5 reduces pregnancy loss in heifers receiving in vitro-produced expanded blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 28:185
- Hinshaw RH.** 1999. Formulating ET contracts. *In: Proceedings Annual Meeting Society for Theriogenology, 1999, Nashville, TN, USA.* Montgomery, AL: SFT. pp. 399-404.
- Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, MacNeil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, Geary TW.** 2013. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J Anim Sci*, 91:1176-1185.
- Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE.** 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 $\alpha$  for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci*, 79:2253-2259.
- Looney CR, Stutts KJ, Novicke AK, Chiles KC, Tijernia SE, Miranda AR, Romo S, Forrest DW.** 2010. Advancements in estrus synchronization of Brahman-influenced embryo transfer recipient females. *In: Proceedings AETA & CETA/ACTE Joint Convention, 2010, Charlotte, NC, USA.* Kemptville, ON, Canada: CETA/ACTE. pp. 17-22.
- Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Garbayo JM, Hunter RHF.** 2004. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, 39:429-433.

- Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW.** 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Anim Reprod Sci*, 158:96-103.
- Mapletoft RJ, Bó GA.** 2016. Bovine embryo transfer. *In: International Veterinary Information Service (Ed.). IVIS Reviews in Veterinary Medicine.* Ithaca: International Veterinary Information Service. (www.ivis.org; Document No. R0104.1106S).
- Menchaca A, Dutra S, Carrau JM, Sapriza F, Salazar J, de la Mata JJ, Bó GA.** 2015. Improvement of pregnancy rates by using the 6-day J-Synch protocol in recipient cows transferred with in vitro produced embryos. *Anim Reprod*, 12:653. (Abstract).
- Menchaca A, Dutra S, Carrau JM, Sapriza F, Bó GA.** 2016. Improvements of the new J-Synch protocol used for fixed-time embryo transfer (FTET) in recipients transferred with in vitro produced embryos. *In: Proceedings of the 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2016, Tours, France.* Tours: ICAR. pp. 506. (Abstract).
- Miles JR, Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Farin PW.** 2005. Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biol Reprod*, 73:663-6671.
- Pereira MHC, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM.** 2016. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J Dairy Sci* 99: 2237-2247.
- Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, Macneil MD, Geary TW.** 2004. Effect of ovulatory follicle size on pregnancy rates and fetal mortality in beef heifers. *J Anim Sci*, 82(suppl.1):102. (Abstract).
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, Macneil MD, Roberts AJ, Geary TW.** 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:5268-5273.
- Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, Macneil MD, Geary TW.** 2007. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci*, 85:684-689.
- Perry GA, Swanson L, Larimore L, Perry B, Djira GD.** 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest Anim Endocrinol*, 48:15-20.
- Perry GA.** 2017. Efecto de la madurez folicular sobre el establecimiento de la preñez. *In: Proceedings XII Simposio Internacional de Reproduccion Animal, 2017, Cordoba, Argentina.* Cordoba: IRAC. pp.171-190.
- Richardson BN, Hill SL, Stevenson JS, Djira GD, Perry GA.** 2016. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. *Anim Reprod Sci*, 166:133-140.

- Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS.** 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos taurus* cows. *Anim Reprod Sci*, 120:23-30.
- Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS.** 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos taurus* cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. *Theriogenology*, 76:455-463.
- Sala RV, Carrenho-Sala LC, Fosado M, Tosta LCC, Tosta RD, Stoll M, Moreno JF, Monteiro BM, Baruselli PS, Garcia-Guerra A, Wiltbank MC.** 2016. Comparison of methods for synchronizing recipients of in vitro produced embryos. *Reprod Fertil Dev*, 28:185-185.(Abstract).
- Tribulo A, Cedeño AJ, Bernal B, Andrada S, Barajas JL, Ortega J, Oviedo J, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bó GA.** 2017. Factors affecting pregnancy rates and embryo/fetal losses in recipients receiving in-vitro-produced embryos by fixed-time embryo transfer. *Reprod Fertil Dev* 29:160 (Abstract).
- Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PLJ, Melo LF, Ochoa JC, Sartori R.** 2017. Momento y causas de la pérdida fisiológica de la preñez (no relacionada con enfermedad) en vacas lecheras lactantes y receptoras de embriones. *In: Proceedings XII Simposio Internacional de Reproduccion Animal, 2017, Córdoba, Argentina. Cordoba: IRAC. pp. 73-102.*