

PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES: EFECTO DEL CELO SOBRE LA PREÑEZ Y PÉRDIDAS EMBRIONARIAS Y FETALES EN BOVINOS

Insemination and embryo transfer programs: Effect of estrous on pregnancy and embryonic and fetal losses in bovine

Andrés Vera-Cedeño^{1,3,4} * , Gabriel A. Bó^{1, 2, 3} 

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

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

³ Maestría en Reproducción Bovina, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

⁴ Instituto de Reproducción Animal (IRAE), Ecuador.

* Corresponding author:
Andrés Vera Cedeño,
e-mail:
mvandresj@gmail.com

Recibido: 07/04/2022

Aceptado: 11/05/2022

Publicado: 31/07/2022

ABSTRACT

The primary objective of implementing embryo transfer in meat operations is to accelerate the rate of genetic progress in the herd. Among the main factors that affect the use of these technologies are related to the nutrition, the management and the synchronization of the estrus. As a result of research conducted in the last 20 years, the use of the receptor has increased through the application of protocols that synchronize ovulation and allow the transfer of embryos without the need for oestrus detection, generally known as fixed-time embryo transfer. (FTET). Although these protocols have functioned well for several years, attention has recently been directed to the effect of estrus expression and estradiol concentrations during pre-ovulatory follicle growth on embryonic growth and pregnancy. The experiments reviewed in this document demonstrate that oestrus expression is positively associated with high pregnancy rates and reduced pregnancy losses in recipients receiving frozen / thawed bovine embryos produced in vitro and in vivo.

Keywords: embryo-fetal losses, oestrus, receptors

RESUMEN

El objetivo principal de implementar la transferencia de embriones en las operaciones de carne es acelerar la tasa de progreso genético en el rebaño. Entre los principales factores que afectan el uso de estas tecnologías están relacionados con la nutrición, el manejo y la sincronización del estro. Como resultado de la investigación realizada en los últimos 20 años, la utilización del receptor ha aumentado mediante la aplicación de protocolos que sincronizan la ovulación y permiten la transferencia de embriones sin la necesidad de detección de estro, generalmente conocida como transferencia de embriones de tiempo fijo (FTET). Aunque estos protocolos han funcionado adecuadamente durante varios años, se ha dirigido recientemente la atención al efecto de la expresión del estro y las concentraciones de estradiol durante el crecimiento del folículo preovulatorio en el crecimiento embrionario y el embarazo. Los experimentos revisados en este documento demuestran que la expresión del estro está asociada positivamente con altas tasas de embarazo y pérdidas reducidas de embarazo en receptores que reciben embriones bovinos congelados / descongelados producidos in vitro e in vivo.

Palabras clave: pérdidas embrio-fetales, estro, receptores.

INTRODUCCION

El objetivo principal de un programa de transferencia de embriones es aumentar el valor genético de la descendencia producida en un rebaño determinado. La nutrición, el manejo y la eficiencia en la detección de estro están entre los factores que afectan el uso de estas tecnologías (Mapletoft y Bó, 2016). Los protocolos que sincronizan el estro y la ovulación han permitido la transferencia de embriones en un tiempo predeterminado, sin el requisito de detección de estro. Estos protocolos generalmente se denominan transferencia embrionaria de tiempo fijo (FTET; Bó et al., 2002, 2012a). Aunque los esfuerzos para sincronizar la ovulación han resultado en que las vacas ovulan en un intervalo de tiempo más corto en comparación con los animales en bicicleta no tratados, a menudo ocurre la ovulación sin expresión de estro. El objetivo de este manuscrito es revisar brevemente los protocolos que se utilizan para sincronizar la ovulación y analizar cómo la expresión del estro puede afectar el embarazo en los receptores de embriones.

TRATAMIENTOS DE SINCRONIZACIÓN CONVENCIONALES PARA RECEPTORES DE EMBRIONES EN AMÉRICA DEL SUR

Aunque la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) se ha utilizado con mayor frecuencia para la sincronización del estro, el requisito de detección del estro y la variabilidad en el intervalo entre el tratamiento y el estro y la ovulación han afectado negativamente su desempeño en los programas de transferencia de embriones, especialmente en el ganado *Bos indicus* (revisado en Bó et al., 2002).

Para evitar las limitaciones asociadas con la detección de estro, los tratamientos que sincronizan el tiempo de la ovulación, que se desarrollaron originalmente para IA de tiempo fijo, se han utilizado para FTET. Estos tratamientos generalmente se dividen en aquellos que están basados en GnRH (Ambrose et al., 1999) y aquellos que están basados en estradiol (Bó et al., 2002). En cualquier caso, los protocolos del receptor incluyen la inserción de un dispositivo de liberación 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 aparición de ondas foliculares y la ovulación de receptores en América del Sur (Baruselli et al., 2010).

El protocolo simplificado que se usa con mayor frecuencia 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, y PGF_{2α} en el momento de la inserción y extracción del dispositivo P4 si está impregnado con > 1 g de P4 y solo en la extracción del dispositivo P4 cuando contiene < 1 g de P4. El dispositivo P4 generalmente se retira el día 7 u 8 y se administran 300 o 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) en ese momento (Bó et al., 2002).

La ovulación es inducida por la administración de 0.5 o 1 mg de cipionato de estradiol (ECP) en el momento de la extracción del dispositivo P4 y todos los receptores con un 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, del 75 al 85% de los receptores tratados con este protocolo reciben un embrión (en comparación con el 50% o menos con la sincronización PGF_{2α}), las concentraciones de P4 son altas en el momento de la transferencia de embriones y el embarazo por transferencia de embriones (P / ET) generalmente excede 50%, cuando tanto los embriones como los receptores son de alta calidad (revisado en Bó et al., 2002; Baruselli et al., 2010, 2011).

PROTOCOLOS QUE PROLONGAN EL PERÍODO PROESTRO

Estudios recientes han sugerido que reducir la duración de la exposición del dispositivo de liberación de P4 a 5 días y aumentar el intervalo desde la extracción del dispositivo P4 a GnRH y AI a tiempo fijo a 3 días puede mejorar el embarazo por AI (P / AI) como en comparación con el protocolo tradicional del dispositivo GnRH / P4 de 7 días en ganado de carne (Bridges et al., 2008). Además, se sugirió que una reducción en la duración 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, altera la capacidad esteroideogénica del folículo dominante antes de la ovulación y CL resultante, y disminuye la capacidad del útero para apoyar el desarrollo del embrión (revisado en Bridges et al., 2013).

Utilizando un protocolo modificado de 5 días Co-Synch + CIDR (sin GnRH en la inserción del dispositivo P4, PGF_{2α} en la eliminación de P4 el día 5 y GnRH el día 8) Sala et al. (2016) informaron tasas de P / ET similares con embriones producidos in vitro a los de receptores sincronizados con dos tratamientos con PGF_{2α} con 14 días de diferencia y detección de estro. En base a estos hallazgos, evaluamos la efectividad de un protocolo de tratamiento de 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 la ECP en la extracción del dispositivo. El protocolo para el ALCA se denominó J-Synch (de la Mata y Bó, 2012). Este protocolo de tratamiento ha dado como resultado tasas más altas de P / AI en novillas de carne de res en comparación con el protocolo convencional en el que se retira el dispositivo P4 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 rendimiento del protocolo J-Synch en programas de transferencia de embriones (Menchaca et al., 2015, 2016). Los experimentos se realizaron en Uruguay con 3.782 receptores de carne de vacuno *Bos taurus* en ciclo que recibieron embriones FTET Holstein producidos in vitro con semen clasificado por sexo. El primer experimento comparó las tasas de embarazo obtenidas con el protocolo J-Synch con el protocolo convencional de estradiol / P4 para FTET.

Todos los receptores recibieron un dispositivo P4 (0.5 g de progesterona, DIB 0.5, Zoetis, Uruguay) más 2 mg de EB (Gonadiol, Zoetis) im el día 0. En el grupo J-Synch (n = 464), el DIB se eliminó el día 6 y se administraron 500 µg de cloprostenol (PGF_{2α}, Ciclado DL, Zoetis) y 400 UI de eCG (Novormon, Zoetis) im y análogo de GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina, Gonasyn GDR, Zoetis) 72 h más tarde. En el tratamiento convencional (n = 481), el DIB se eliminó el día 7 y se administraron PGF_{2α}, eCG y 0,5 mg de ECP (Cipiosyn, Zoetis) i.m. al mismo tiempo. El segundo experimento comparó

GnRH vs. EB para inducir la ovulación en el protocolo J-Synch. El protocolo J-Synch se realizó como se describió anteriormente con GnRH administrado a las 72 h ($n = 456$) o 1 mg EB administrado a las 60 h después de la extracción del dispositivo P4 ($n = 461$). En el experimento 3, evaluamos el efecto del tiempo de administración de GnRH en el protocolo J-Synch (GnRH se administró a las 60 h ($n = 452$) o 72 h ($n = 466$) después de la extracción del dispositivo).

Para todos los experimentos, los receptores recibieron embriones producidos *in vitro* en el día 16-17 por FTET, y el P / ET se determinó por ultrasonografía 40-50 días después. En general, la tasa P / ET fue mayor en el J-Synch (49.4%, 229/464) que en el grupo de protocolo de sincronización convencional (41.0%, 197/481; $P < 0.05$) independientemente de si GnRH se administró a las 72 h (58.8%, 230/391) o EB se administró a las 60 h (54.7%, 227/415); o si GnRH se administró a las 60 h (47.8%, 216/452) o 72 h (50.4%, 235/466). Sin embargo, los resultados sugieren que prolongar la exposición al estradiol endógeno antes de la ovulación, como ocurre con el protocolo J-Synch, mejoró la P / ET con embriones producidos *in vitro*. También fue notable que, en un cuarto estudio, en el que las vacas ($n = 581$) fueron tratadas con el protocolo J-Synch (como se describió anteriormente), pero a algunos receptores se les permitió ovular espontáneamente ($n = 532$), P / ET fue mayor para los receptores 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 embarazo en algunas vacas. Por lo tanto, esperar la expresión natural del estro puede mejorar P / ET.

EXPRESIÓN DEL ESTRO, ESTRADIOL PREOVULATORIO Y ESTABLECIMIENTO DEL EMBARAZO.

El estro se define como el período en el que una mujer es sexualmente receptiva y se debe al 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 los eventos necesarios para el crecimiento, el alargamiento, la supervivencia y el apego del concepto están influenciados por la coordinación de los eventos que conducen a una disminución en las concentraciones de P4 y un aumento en las concentraciones de estradiol antes del inicio del estro (Bridges et al., 2013).

Además, se ha informado que las concentraciones preovulatorias de estradiol tienen un impacto positivo en el desarrollo posterior de conceptos, y se ha informado que las vacas que exhiben estro tienen una mayor longitud de conceptos en el día 19 de gestación en comparación con las que no exhiben estro (Davoodi et al., 2016).

Se ha demostrado anteriormente que la aparición de estro en los programas del ALCA se asocia positivamente con P / AI en *Bos taurus* (Richardson et al., 2016) y en el ganado vacuno *Bos taurus* x *Bos indicus* (Bó et al., 2017), y con el diámetro del folículo dominante en FTAI, el diámetro del CL posterior, las concentraciones de P4 en la fase lútea y P / AI en el ganado vacuno *Bos indicus* (Sá Filho et al., 2011). Además, el diámetro del folículo dominante en el momento del ALCI se ha asociado

con el éxito del embarazo tanto en *Bos taurus* (Lamb et al., 2001; Perry et al., 2004, 2005, 2007) como en *Bos indicus* (Sa Filho et al., 2010). Sin embargo, cuando las vacas de carne de posparto se inseminaron en base al estro permanente, el tamaño del folículo ovulatorio no tuvo influencia en el éxito del embarazo (Perry et al., 2005), lo que indica nuevamente que las altas concentraciones de estradiol producidas por el folículo ovulatorio dominante son esenciales para una P / IA alta. (Perry et al., 2014). Más específicamente, la madurez folicular puede afectar la fertilidad a través de la preparación del ovocito para el desarrollo del embrión, la preparación de células foliculares para la luteinización y / o la preparación del ambiente uterino para el establecimiento del embarazo. Por lo tanto, la expresión de estro puede afectar a P / ET en receptores sincronizados con protocolos FTET.

Se ha demostrado previamente que la expresión del estro en los receptores *Bos indicus* x *Bos taurus* tratados con el protocolo Ovsynch dio como resultado un mayor diámetro del folículo ovulatorio, área CL posterior y concentraciones de P4 y mayor P / ET que en aquellos que no mostraron estro (Baruselli et al., 2003). Las razones de la mayor P / ET en los receptores que muestran celo es que estuvieron expuestos a mayores concentraciones de estradiol que aquellos que fueron inducidos a ovular con GnRH antes de mostrar celo y las mayores concentraciones de P4 en el momento de FTET. En un estudio reciente que involucra la transferencia recíproca de embriones entre vacas donantes y receptores inducidos a ovular un folículo dominante grande o pequeño con GnRH, reveló resultados interesantes (Atkins et al., 2013). En el estudio de Atkins et al. (2013), los embriones individuales ($n = 354$) que se obtuvieron de vacas inducidas para ovular un folículo grande o pequeño con GnRH se transfirieron a receptores que también fueron inducidos a ovular un folículo pequeño o grande con GnRH.

El mantenimiento del embarazo de 7 a 27 días de gestación se mejoró con el aumento de las concentraciones séricas de estradiol en el momento del tratamiento con GnRH y la concentración de P4 7 días después en las vacas receptoras. Sin embargo, este estudio también mostró que el diámetro del folículo no era tan importante, ya que las receptoras con folículos grandes tenían las tasas de embarazo más bajas, lo que indica que el estradiol producido por un nuevo folículo dominante en crecimiento beneficiará el embarazo más que un folículo dominante grande y envejecido que ya ha reducido producción de estradiol en el momento de la ovulación inducida por GnRH (Bridges et al., 2014). En otro estudio, las vacas donantes y receptoras se dividieron retrospectivamente en función de sus concentraciones plasmáticas de estradiol en la ovulación inducida (Jinks et al., 2013).

En este estudio, las concentraciones circulantes de estradiol de las vacas receptoras, no del donante, se relacionaron con tasas de preñez más altas, lo que indica que el beneficio primario de las concentraciones de estradiol preovulatorio aumentadas está mediado por alteraciones en el ambiente uterino de las vacas receptoras. Finalmente, se realizaron otros dos estudios en los que se administraron tratamientos con 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 AI aumentó la P / AI en vacas inducidas a ovular un pequeño folículo dominante (<12.2 mm) con GnRH. Madsen et al. (2015)

trataron vacas ovariectomizadas con dispositivos CIDR (1.38 g de P4, Zoetis, EE. UU.)

Para imitar la fase lútea y luego se trataron con 2.5 mg de ECP 12 h después de la extracción de CIDR, 1.2 mg EB 36 h después de la extracción de CIDR o ningún tratamiento (CON) para imitar un período preovulatorio. La ovulación se simuló con una inyección de GnRH 48 h después de la extracción de CIDR y los embriones se transfirieron 7 días después. El embarazo se mantuvo mediante la administración de P4 inyectable desde los días 3 a 6 y luego dispositivos CIDR hasta el día 29. Las vacas que recibieron tratamientos con estradiol tuvieron una mayor supervivencia embrionaria y P / ET en comparación con los animales control (4, 29 y 21% para CON, EB y ECP, respectivamente; Madsen et al., 2015).

EXPRESIÓN DE ESTRO Y TASAS DE EMBARAZO EN RECEPTORES TRATADOS CON PROTOCOLOS FTET BASADOS EN ESTRADIOL / P4

Después de revisar los estudios previos, el efecto (s) de las concentraciones de estradiol y la expresión del estro en las tasas de embarazo en las receptoras en América del Sur no está claro, ya que la mayoría son tratados con protocolos basados en estradiol / P4. Además, parece importante diferenciar si las vacas son inducidas a ovular con EB o ECP; las concentraciones plasmáticas de estradiol-17 β resultantes serían mucho más altas durante un período de tiempo más corto en vacas tratadas con EB en lugar de ECP (revisado en Bó et al., 2013). En ese sentido, los resultados anteriores de nuestro laboratorio (Bó et al., 2011) y otros (Looney et al., 2010) no han mostrado efectos significativos de la expresión de estro en P / ET en receptoras que reciben EB en comparación con el estradiol-17 β de acción más corta para inducir la ovulación.

Un análisis retrospectivo de varios experimentos realizados en 13 granjas lecheras comerciales diferentes en Brasil utilizando un protocolo basado en estradiol / P4 pero con ECP en lugar de EB para inducir la ovulación reveló una asociación positiva entre la expresión del estro y la fertilidad (Pereira et al., 2016). Pereira et al. (2016) observaron que las vacas lecheras lactantes fueron inseminadas artificialmente (n = 5430) o utilizadas como receptoras (n = 2003). Todas las vacas fueron tratadas con un CIDR (Zoetis, Brasil) y 2 mg de EB en el día 0, 25 mg de dinoprost (Lutalyse, Zoetis) en el día 7, y la eliminación de CIDR y 1 mg de ECP (Zoetis) en el día 9. Las vacas fueron FTAI el día 11 o FTET con embriones frescos producidos in vitro el día 18. Se detectó el estro usando dispositivos de cabeza de cola (Estrotec, Rockway Inc., Spring Valley, WI) y se determinó el embarazo en los días 32 y 60 de gestación. La expresión del estro influyó positivamente (P <0.01) P / AI en el día 32 de gestación (estro 38.9%, 1785/4584 vs. no estro 25.5%, 222/846) y P / ET (estro 46.2%, 645/1397 vs. sin estro 32.7%, 193/606). Además, la pérdida de preñez hasta el día 60 fue menor (P <0.01) en vacas que expresaron celo en FTAI (celo 14.4%, 255/1785 vs. no celo 20.1%, 43/222) y FTET (celo 18.6%, 120/645 vs no estro 22.7%, 43/193). También se informaron resultados similares con vaquillas cruzadas Bos indicus x Bos taurus; La manifestación del comportamiento del estro hasta 3 días después de la extracción del dispositivo P4 aumentó la probabilidad de embarazo en las receptoras que reciben

embriones de PIV (Frade et al., 2014). Las vaquillas que expresan celo en pie tuvieron mayor P / ET que las vaquillas que no expresaron celo (62.4%, 106/170 vs. 47.0%, 31/66; P \leq 0.01). Además, las vaquillas que quedaron embarazadas tuvieron mayores concentraciones de P4 circulante en FTET (2.8 \pm 0.14 ng / ml; n = 137) que aquellas que no quedaron embarazadas (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 pre-ovulatoria y la exposición posterior a P4 alta en el diestro influyeron positivamente en el éxito del embarazo después de FTET.

El posible inconveniente práctico de estos resultados fue que hacer la transferencia de embriones solo en los receptoras que expresan celo reduciría la proporción de receptoras transferidos / tratados, lo que se ha demostrado como uno de los principales beneficios de utilizar los programas FTET en los receptoras en América del Sur (Bó et al., 2002, 2011; Baruselli et al., 2010, 2011).

Se realizaron otros dos estudios en Argentina para confirmar que la expresión del estro tenía un efecto positivo sobre P / FTET y el mantenimiento del embarazo en receptoras tratadas con protocolos basados en estradiol / P4. Un objetivo secundario fue evaluar si la administración de GnRH en el momento esperado del estro a los receptoras que no muestran estro aumentaría la proporción de receptoras transferidos y embarazadas. En el primer experimento, 729 vacas de carne no lactantes (Bonsmara x Bos indicus, Brangus y Braford) recibieron un dispositivo DIB de 0,5 g (Zoetis, Argentina) más 2 mg de EB el día 0 y el día 8, se extrajeron los DIB y 400 Se administraron UI de eCG (Novormon 5000, Zoetis) más 0.5 mg de ECP (Cipiosyn, Zoetis) y 500 μ g de cloprostenol (Ciclase DL, Zoetis) (Cedeño et al.2017). Todas las vacas fueron pintadas con cola (CeloTest, Biotay S.A., Argentina) para la detección del estro (> 30.0% de pérdida de pintura = estro). Todos los receptoras que no mostraban estro por 48 h (pérdida de pintura \leq 30.0%) se dividieron aleatoriamente para recibir GnRH (100 μ g de acetato de gonadorelina; Gonasyn GDR, Zoetis) o ningún tratamiento. Se volvió a detectar el estro 56 h después de la extracción del dispositivo P4 y se registró. El día 17, las vacas fueron examinadas por ultrasonografía y aquellas con un CL \geq 18 mm (grado 1), \geq 16 y <18 mm (grado 2) y \geq 14 y <16 mm de diámetro (grado 3) recibieron in vivo, embriones frescos congelados / descongelados o producidos in vitro por transferencia no quirúrgica. La proporción general de destinatarios transferidos fue del 88,1% (583/729) y el P/ET global del 46,0% (268/583). La proporción de receptoras en estro a las 48 y 56 h después de la extracción del dispositivo P4 fue del 87,6% y P / ET fue mayor (P <0,05) en los receptoras que muestran estro (48,3%, 250/518) que en los que no muestran estro (30,1 %; 22/73; Tabla 1). Cuando se consideró el diámetro de CL en el momento de FTET, P / ET no difirió en los receptoras que muestran estro que tenían un CL \geq 18 mm o entre 16 y 18 mm; sin embargo, P / ET fue menor en aquellos que no muestran estro, incluso en aquellos con un CL \geq 18 mm de diámetro en el momento de FTET (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 y <18	≥14 y <16	
Si Celos	48,9% ^a (183/374)	44,9% ^{ab} (40/89)	14,3% ^c (1/7)	48,3% ^a (250/518)
No Celos	47,9% ^b (35/73)	29,5% ^b (13/44)	0% ^d (0/4)	30,1% ^b (22/73)
Total	48,8% ^a (218/447)	40,0% ^a (53/113)	9,1% ^b (1/11)	

^{abcd} 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 receptores que no expresaron celo a las 48 h después de la extracción de DIB, P / ET fue significativamente mayor (P <0.05) en aquellos tratados con GnRH (34/74, 46.0%) que en aquellos no tratados con GnRH (12/46, 26.0%). Sin embargo, cuando se consideró la expresión del celo a las 56 h después de la extracción de DIB, la P / ET fue mayor en aquellos que mostraban celo, independientemente de que recibieran GnRH (26/48, 54.2%) que en aquellos que no mostraban celo (15/43, 34.9%); y aunque los números fueron bajos, el tratamiento con GnRH no pareció aumentar la P / ET en receptores que no mostraron celo (GnRH: 38.0%, 8/21 vs. no GnRH: 31,8%, 7/22).

Se realizó un segundo estudio con vacas de carne cruzada no lactantes (205 Brangus y 198 Braford; Cedeño et al., 2018). En el día 0, todos los animales recibieron un dispositivo DIB 0.5 más 2 mg de EB y luego los receptores fueron asignados aleatoriamente en dos grupos de tratamiento. En los receptores tratados con el protocolo convencional de sincronización de estradiol / P4, los dispositivos P4 se retiraron el día 8 y también recibieron PGF2α, eCG y ECP al mismo tiempo. En receptores tratados con el protocolo J-Synch, los dispositivos P4 se retiraron el día 6 y recibieron PGF2α y eCG al mismo tiempo. Todos los receptores fueron pintados con cola y aquellos que no mostraban celo a las 48 h (grupo convencional) o 62 h (grupo de sincronización J) recibieron GnRH en ese momento. Los receptores fueron nuevamente ejecutados a través del conducto para observación de pintura de cola y registro 8 h más tarde en ambos grupos de tratamiento. Todas las vacas con CL recibieron un embrión producido in vitro por FTET 7 días después de un tratamiento de celo o GnRH observado. La proporción general de receptores transferidos fue del 86.5% (352/407) y el P / ET general fue del 37.8% (133/352). Aunque la proporción de receptores transferidos 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 P / ET entre los dos protocolos 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 P / ET y pérdidas de embarazo entre los receptores que mostraron celo, independientemente del grupo de tratamiento. Los receptores que mostraban celo tenían una P/ET significativamente más alta (P <0.05) que aquellos que no mostraban celo (Tabla 2). Además, los receptores que no

muestran celo tuvieron una mayor tasa de pérdidas embrionarias / fetales entre 30 y 60 días (P = 0.004) de gestación y, en consecuencia, una menor P / ET a los 60 días y una menor tasa de parto (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
Si celo	38,3% (62/162)	40,0% (62/155)	39,1% ^a (124/317)
No Celos	22,2% (4/18)	29,4% (5/17)	25,7% ^b (9/35)

^{ab} Indican diferencias significativas entre las columnas con diferentes superíndices (P<0.05).

Los resultados no confirmaron estudios previos en los que las tasas de P / ET fueron del 8,5% con el protocolo J-Synch (Menchaca et al., 2015). De hecho, la pequeña diferencia a favor del grupo J-Synch fue anulada por la mayor proporción de receptores que fueron transferidos al grupo convencional. Las diferencias en la proporción de receptores transferidos / tratados podrían deberse a una mayor tasa de ovulación en 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 P / ET entre los receptores que muestran celo y aquellos que no muestran celo, lo que sugiere que la expresión de celo en los programas FTET está vinculada a un entorno uterino que favorece el desarrollo embrionario (revisado por Bridges et al., 2013 y Perry, 2017) Como se indicó anteriormente, aunque los receptores recibieron ECP en el momento de la extracción del dispositivo P4, aquellos que manifestaron celo probablemente tenían concentraciones plasmáticas de estradiol más altas como resultado de la administración de ECP y del desarrollo del folículo ovulatorio que aquellos que no muestran celo. Por lo tanto, los receptores que mostraron celo tenían suficiente exposición al estradiol para los cambios requeridos en el entorno uterino para el crecimiento embrionario, la supervivencia y el establecimiento del embarazo (Bridges et al., 2013).

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)	Perdidas gestación (30 a 60 días)	Perdidas de gestación (60 días al parto)	Tasa de parición
Estro	39,1% ^a (124/317)	37,0% ^a (117/317)	5,6% ^a (7/124)	20,5% ^c (24/117)	29,3% ^a (93/317)
No	25,7% ^b (9/35)	8,6% ^b (3/35)	66,7% ^b (6/9)	66,7% ^d (2/3)	2,9% ^b (1/35)
Estro	38,0% (133/35)	34,1% (120/352)	9,8% (13/133)	21,7% (26/120)	26,7% (94/352)

^{ab} Incidan diferencias significativas entre las columnas ($P < 0,01$).

^{cd} Indican tendencias a diferir ($P < 0,06$).

Este último estudio y el de Pereira et al. (2016) ambos mostraron una tasa significativamente mayor de pérdida de embarazo en las receptoras que no muestran estro. Sorprendentemente, las pérdidas de embarazo después de 60 días también fueron mayores en las receptoras que no muestran estro. Se han informado pérdidas embrionarias / fetales de hasta el 17.2% desde el día 32 hasta el día 60 del embarazo en vaquillas lecheras (García Guerra et al., 2016) y entre 0 y 34,5% en vacas de carne (Tribulo et al., 2017) portadores de embriones de FIV. Sin embargo, ninguno de estos informes relacionó la expresión del estro con las pérdidas del embarazo desde los 60 días de gestación hasta el término. Durante este período hay un crecimiento continuo del feto y también cambios dramáticos en la placenta para satisfacer las crecientes demandas nutricionales del feto en crecimiento (revisado por Wiltbank et al., 2017). Las estimaciones de pérdida de embarazo durante este período podrían variar de 3-5% en receptores que llevan embriones derivados in vivo hasta tanto como 20% en receptores que llevan embriones producidos in vitro (Bó y Cedeño, 2018, IRAC, Córdoba, Argentina, inéditos datos). Los factores asociados con una mayor pérdida de embarazo en este período no se han estudiado en detalle; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de varios agentes infecciosos que pueden afectar el embarazo durante este período de tiempo. El hermanamiento se identificó en un estudio como uno de los principales contribuyentes a la pérdida del embarazo durante este período (López Gatius et al., 2004). Sin embargo, este no es el caso en el estudio descrito actualmente porque todos los receptores recibieron embriones individuales. Aunque otras razones pueden estar relacionadas con el embrión producido in vitro en sí mismo (Miles et al., 2005), esto no explicaría las diferencias observadas entre los receptores que mostraron o no celo. Obviamente, se requieren más estudios para confirmar estos hallazgos.

CONCLUSION

Los protocolos desarrollados para FTET en los últimos 20 años han brindado a los profesionales la mayor oportunidad de transferir una gran cantidad de embriones en los rebaños receptores y han sido fundamentales para el desarrollo de la industria derivada de embriones de FIV a gran escala en América del Sur. Aunque las tasas generales de embarazo se han considerado adecuadas para la mayoría de los profesionales, existen factores como la expresión del estro que deben considerarse para los programas de transferencia de embriones exitosos, especialmente en los protocolos en los que

se usa ECP para inducir la ovulación o no se administra estradiol en el momento momento de la extracción del dispositivo P4.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Los autores de este trabajo prepararon el artículo y contribuyeron de manera similar con las figuras y referencias del mismo, y todos realizaron los ajustes finales y la supervisión de la escritura del artículo.

REFERENCES

- Allrich RD. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1994;77(9):2738-2744. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77216-7
- Ambrose JD, Drost M, Monson RL, et al. 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.* 1999;82(11):2369-2376. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75487-1
- Atkins JA, Smith MF, MacNeil MD, et al. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(2):722-733. doi:10.2527/jas.2012-5368
- Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Berber RCA, Valentim R, Carvalho Filho AF, Costa Neto WP. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo Ovsynch para inováção em tempo fixo. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003; 40:96-106.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Nasser LF, Rodrigues CA, Bó GA. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(1):67-74. doi:10.1071/RD09214
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JN, et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology.* 2011;76(9):1583-1593. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.006.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology.* 2002;57(1):53-72. doi:10.1016/s0093-691x(01)00657-4

- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. *Anim Reprod*, 2012a; 9:312-317.
- Bó GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod Fertil Dev*. 2011;24(1):272-277. doi:10.1071/RD11918.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim Reprod*, 2013; 10:137-142.
- Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*. 2016;86(1):388-396. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.053
- Bó GA, Cedeño A, Tribulo A, Andrada S, Tribulo R, Mapletoft RJ. 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*, 2017; 29:111. (Abstract).
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2alpha from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*. 2008;69(7):843-851. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.011
- Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH. Triennial Reproduction Symposium: deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J Anim Sci*. 2013;91(7):3002-3013. doi:10.2527/jas.2013-5882
- Bridges GA, Mussard ML, Helser LA, Day ML. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology*. 2014;81(4):632-638. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.11.020
- Cedeño A, Tribulo A, Andrada S, Barajas JL, Fonseca J, Ruiz A, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ, Bó GA. 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*, 2017; 29:159-160. (Abstract).
- Cedeño A, Tribulo P, Tribulo A, Barajas JL, Ortega JA, Andrada JS, Lozano D, Monguillot I, Brandan A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Effect of synchronization treatment and estrus expression on conception rates and pregnancy losses in recipients receiving in vitro produced embryos. *Reprod Fertil Dev*, 2018; 30:181. (Abstract).
- Davoodi S, Cooke RF, Fernandes AC, Cappellozza BI, Vasconcelos JL, Cerri RL. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology*. 2016;85(4):645-655. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.10.002
- de la Mata JJ, Bó GA. 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*, 2012; 55:17-23.
- Frade MC, Frade C, Cordeiro MB, et al. 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*. 2014;151(3-4):85-90. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.09.005
- García-Guerra A, Sala RV, Carrenho-Sala L, et al. Postovulatory treatment with GnRH on day 5 reduces pregnancy loss in recipients receiving an in vitro produced expanded blastocyst. *Theriogenology*. 2020;141:202-210. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.010
- Hinshaw RH. 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, et al. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J Anim Sci*. 2013;91(3):1176-1185. doi:10.2527/jas.2012-5611
- Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci*. 2001;79(9):2253-2259. doi:10.2527/2001.7992253x
- Looney CR, Stutts KJ, Novicke AK, Chiles KC, Tijernia SE, Miranda AR, Romo S, Forrest DW. 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. 2010; pp. 17-22.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Hunter RH. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*. 2004;39(6):429-433. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00533.x
- Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Anim Reprod Sci*. 2015;158:96-103. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.05.006
- Mapletoft RJ, Bó GA. 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). 2016.
- Menchaca A, Dutra S, Carrau JM, Sapriza F, Salazar J, de la Mata JJ, Bó GA. Improvement of pregnancy rates by using the 6-day J-Synch protocol in recipient cows transferred with in vitro produced embryos. *Anim Reprod*, 2015; 12:653 (Abstract).
- Menchaca A, Dutra S, Carrau JM, Sapriza F, Bó GA. 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. Effects of embryo culture on angiogenesis and

- morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biol Reprod.* 2005;73(4):663-671. doi:10.1095/biolreprod.105.040808
- Pereira MHC, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J Dairy Sci.* 2016;99(3):2237-2247. doi:10.3168/jds.2015-9903
 - Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, Macneil MD, Geary TW. Effect of ovulatory follicle size on pregnancy rates and fetal mortality in beef heifers. *J Anim Sci*, 2004; 82(suppl.1):102 (Abstract).
 - Perry GA, Smith MF, Lucy MC, et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(14):5268-5273. doi:10.1073/pnas.0501700102
 - Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci.* 2007;85(3):684-689. doi:10.2527/jas.2006-519
 - Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD, Cushman RA. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest Anim Endocrinol.* 2014;48:15-20. doi:10.1016/j.domaniend.2014.02.001
 - Perry GA. 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. 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.* 2016;166:133-140. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.01.013
 - Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JE, Perry GA, Baruselli PS. 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 indicus* cows. *Anim Reprod Sci.* 2010;120(1-4):23-30. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.03.007
 - Sá Filho MF, Santos JE, Ferreira RM, Sales JN, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology.* 2011;76(3):455-463. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.022
 - Sala RV, Carrenho-Sala LC, Fosado M, Tosta LCC, Tosta RD, Stoll M, Moreno JF, Monteiro BM, Baruselli PS, Garcia-Guerra A, Wiltbank MC. Comparison of methods for synchronizing recipients of in vitro produced embryos. *Reprod Fertil Dev*, 2016; 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. Factors affecting pregnancy rates and embryo/fetal losses in recipients receiving in-vitro-produced embryos by fixed-time embryo transfer. *Reprod Fertil Dev.* 2017; 29:160 (Abstract).
 - Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PLJ, Melo LF, Ochoa JC, Sartori R. 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.