





EVOLUTION OF KNOWLEDGE ABOUT OVARIAN PHYSIOLOGY AND ITS CONTRIBUTION TO THE APPLICATION OF REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGIES IN SOUTH AMERICA

Evolución del conocimiento sobre la fisiología ovárica y su contribución a la aplicación de las biotecnologías reproductivas en Sudamérica

Reuben J. Mapletoft^{1*}, Gabriel A. Bó², Pietro S. Baruselli³, Alejo Menchaca⁴, Roberto Sartori⁵

- ¹ Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá S7N 5B4
- ² Instituto de Reproducción Animal Córdoba y Universidad Nacional de Villa María, Córdoba, Argentina
- ³ Departamento de Reproducción Animal, Universidad de São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brasil
- ⁴ Instituto de Reproducción Animal Uruguay Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay.
- ⁵ Departamento de Ciencia Animal, Universidad de São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brasil

* Corresponding author:
Reuben Mapletoft, e-mail:
reuben.mapletoft@usask.ca

Recibido: 07/04/2022

Aceptado: 11/05/2022

Publicado: 31/07/2022

ABSTRACT

As our understanding of ovarian function in cattle has improved, our ability to control it has also increased. Luteal function in cattle has been studied in detail, and prostaglandin F_{2α} has been used for several years for elective induction of luteal regression. More recently, follicular wave dynamics have been studied and protocols have been designed to induce follicular wave emergence and ovulation, and the need to detect oestrus has even been eliminated. The addition of progesterone, estradiol, GnRH and equine chorionic gonadotropin (eCG) releasing devices has provided opportunities for fixed-time AI (IATF) and possibilities for achieving higher pregnancy rates. In embryo transfer programs, these same treatments have eliminated the need to detect oestrus, allowing fixed-time embryo transfer (TETF) and the initiation of superstimulatory treatments regardless of the day of the estrous cycle. Taken together, the new protocols have facilitated the application of assisted reproductive technologies, and this is especially true in South America. Over the past 20 years, the use of AI in South America has increased, due in large part to the use of the IATF. The use of the IATF has been multiplied by more than 10 times in Brazil, with more than 11 million treatments in 2016, which represents 85% of all AI. Similar trends are occurring in Argentina and Uruguay. In vivo embryo production produced by superovulation (DIV) has remained relatively stable over the years, but in vitro embryo production (PIV) has increased dramatically in the last 10 to 15 years, especially in Brazil, where More than 300,000 PIV embryos were produced in 2010. Worldwide, over 990,000 bovine PIV embryos were produced in 2017, of which more than 90% were produced in South America. The use of assisted reproductive technologies has facilitated the spread of genetic improvements and increased reproductive performance; These practices are spreading to many South American countries.

Keywords: Physiology, South America, pregnancy, FTAI, FTET.

RESUMEN

A medida que ha mejorado nuestra comprensión de la función ovárica en el ganado bovino, también ha aumentado nuestra capacidad de control de la misma. La función luteal en el ganado bovino se ha estudiado en detalle, y la prostaglandina F_{2α} se ha utilizado durante varios años para la inducción electiva de regresión luteal. Más recientemente, se ha estudiado la dinámica de las ondas foliculares y se han diseñado protocolos para inducir la emergencia de las ondas foliculares y la ovulación, e incluso se ha eliminado la necesidad de detectar el estro. La adición de dispositivos liberadores de progesterona, estradiol, GnRH y gonadotrofina coriónica equina (eCG) ha brindado oportunidades para la IA a tiempo fijo (IATF) y posibilidades para lograr mayores tasas de preñez. En los programas de transferencia de embriones, estos mismos tratamientos han eliminado la necesidad de detectar el estro, lo que permite la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) y el inicio de tratamientos superestimuladores sin importar el día del ciclo estral. En conjunto, los nuevos protocolos han facilitado la aplicación de tecnologías de reproducción asistida, y esto es especialmente cierto en América del Sur. En los últimos 20 años, el uso de la IA en América del Sur ha aumentado, debido en gran parte al uso de la IATF. Se ha multiplicado por más de 10 veces el uso de la IATF en Brasil, con más de 11 millones de tratamientos en 2016, lo que representa el 85% de toda la IA. Tendencias similares están ocurriendo en Argentina y Uruguay. La producción de embriones in vivo producidos por

superovulación (DIV) se ha mantenido relativamente estable a lo largo de los años, pero la producción de embriones in vitro (PIV) ha aumentado dramáticamente en los últimos 10 a 15 años, especialmente en Brasil, donde se produjeron más de 300.000 embriones PIV en 2010. En el mundo, en 2017 se produjeron más de 990,000 embriones PIV bovinos, de los cuales más del % se produjeron en América del Sur. El uso de tecnologías de reproducción asistida ha facilitado la diseminación de mejoras genéticas y un mayor rendimiento reproductivo; estas prácticas se están extendiendo a muchos países sudamericanos.

Palabras clave: Fisiología, Suramérica, preñez, IATF, TETF.

INTRODUCCIÓN

El aumento del conocimiento de la fisiología ovárica en el ganado bovino en los últimos 50 años ha proporcionado abordajes para la manipulación de la función ovárica. Los protocolos diseñados para controlar la función luteal y folicular han mejorado la sincronización del estro y han permitido la IA a tiempo fijo (IATF) y la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF), y el inicio de tratamientos superestimuladores en cualquier estadio del ciclo estral.

Los profesionales que trabajan con bovinos de todo el mundo ahora están usando estas tecnologías reproductivas, y este es especialmente el caso en América del Sur. Esta revisión describirá brevemente los avances en nuestra comprensión de la fisiología ovárica en el ganado bovino y discutirá cómo esto ha afectado la aplicación de las biotecnologías de reproducción asistida en América del Sur, con especial énfasis en Brasil, Argentina y Uruguay, donde se está realizando gran parte de la investigación y la aplicación práctica.

UNA BREVE RESEÑA DE LOS CONOCIMIENTOS RECIENTES SOBRE FISIOLÓGIA OVÁRICA EN GANADO BOVINO.

Los folículos ováricos en el ganado bovino crecen en forma de onda. Una onda folicular consiste en la aparición sincrónica de un grupo de folículos antrales de 4 a 5 mm de diámetro, seguido a los 2 o 3 días por la selección de un folículo para convertirse en dominante, mientras que los subordinados se vuelven atrésicos (Ginther et al., 1989a). Los ciclos estrales en el ganado bovino están compuestos por 2 o 3 ondas foliculares (Ginther et al., 1989b), aunque se han reportado ciclos de 4 ondas en las razas *B. indicus* (Bó et al., 2003). En los ciclos de 2 y 3 ondas, la emergencia de la primera onda folicular se produce el día de la ovulación (Día 0). Debido a la presencia del CL de medio ciclo, el folículo dominante de la primera onda regresa, y una segunda onda emerge en los días 9 o 10 en ciclos de 2 ondas, y los días 8 o 9 en ciclos de 3 ondas, con la tercera onda que emerge en los días 15 o 16. Las ondas foliculares se producen en vaquillonas prácticamente desde el nacimiento y en vacas preñadas y en el periodo posparto, antes de la primera ovulación (revisado en Adams, 1999).

El reclutamiento de ondas foliculares y la selección del folículo dominante se basan en la capacidad de respuesta diferencial de los folículos antrales a FSH y LH (revisado en Adams, 1999). Los aumentos de FSH circulante son seguidos en 1 a 2 días por la aparición de un grupo de folículos de 4 a 5 mm de diámetro. La FSH se suprime por el estradiol y la inhibina producida por los folículos de la onda (especialmente el futuro folículo dominante), lo que lleva a la selección de un folículo dominante aproximadamente 3 días después de la aparición de la onda. El folículo dominante adquiere más receptoras de LH en sus células de la granulosa que sus subordinados y es capaz de cambiar su dependencia de FSH a LH durante el período de

baja FSH; continúa creciendo mientras que los folículos subordinados que requieren FSH sufren regresión (Ginther et al., 2001). La supresión de la LH por la progesterona del CL hace que el folículo dominante de la primera onda (y de la segunda onda en ciclos de 3 ondas) finalmente cese sus funciones metabólicas y regrese, lo que conduce a un nuevo aumento de FSH y la aparición de una nueva onda folicular (Adams, 1999). La regresión luteal produce un aumento de la frecuencia de los pulsos de LH, un aumento del crecimiento del folículo dominante, concentraciones elevadas de estradiol, el pico preovulatorio de LH y la ovulación.

El número de ondas foliculares en el ganado bovino depende de la duración de la dominancia folicular en la primera onda; es 3 días más largo y el inicio de la regresión se produce más tarde durante los ciclos de 2 ondas que en los ciclos de 3 ondas. Sin embargo, el inicio de la luteólisis ocurre antes en los ciclos de 2 ondas, lo que da como resultado un intervalo interovulatorio de 20 días, en comparación con los 23 días en los ciclos de 3 ondas (Adams, 1999; Sartori et al., 2004). Aparentemente la razón de la diferencia en la duración de la dominancia folicular en la primera onda está relacionada con menores niveles de progesterona producidos por el CL en las vacas de dos ondas. El folículo dominante presente en el momento de la luteólisis se convierte en el folículo ovulatorio, y la aparición de la siguiente onda ocurre en el momento de la ovulación subsiguiente (Kastelic y Ginther, 1991).

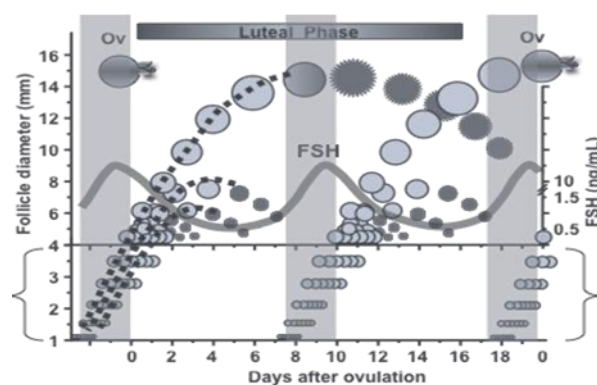


Figura 1. Un patrón de onda folicular ovárica de dos ondas detectado en folículos de hasta 1 mm de diámetro. Los folículos pequeños (1 a 3 mm) ilustran el surgimiento de la onda 2,5 días antes de lo que se detectó previamente (es decir, de 4 a 5 mm). Hay que tener en cuenta que la tasa de crecimiento del folículo destinado a convertirse en dominante (línea de puntos) es similar a la de otros en la onda hasta aproximadamente 5 días después del surgimiento de la onda a 1 mm, y tiene una ventaja de tamaño sobre los destinados a ser subordinados tan pequeños como 1 mm en tamaño (Adams et al., 2008). Agradecimiento a GP Adams. Follicle diameter (mm) = diámetro folicular (mm). Days after ovulation = días después de la ovulación.

La dinámica de la onda folicular como se describe se ha limitado a los folículos ≥ 4 mm debido a la resolución de los primeros equipos de ultrasonido. Sin embargo, los equipos más nuevos han permitido la identificación del futuro folículo dominante con un diámetro de 1 mm, lo que sugiere que los folículos de 1 a 3 mm también se desarrollan en forma de ondas (Fig. 1). Adams et al. (2008) señalaron que, a nivel microscópico, no hay una distinción morfológica entre los folículos de 1 a 3 mm y los de más de 3 mm, y que, a nivel celular, ambas categorías de tamaño no solo expresan receptoras de FSH, sino que también tienen un nivel similar de expresión de los receptores de FSH por célula de la granulosa (revisado en Bao y Garverick, 1998). También se ha reportado que estos pequeños folículos antrales responden a elevaciones transitorias de la FSH en circulación y que su crecimiento progresa a lo largo de un período que abarca todo el aumento de FSH que ocurre en cada onda folicular. Por lo tanto, los folículos de 1 a 3 mm pueden ser un componente importante de las ondas foliculares. Esto tiene implicaciones para la optimización de los tratamientos superestimuladores en el ganado bovino (García Guerra et al., 2015).

Existen varias diferencias en la función reproductiva entre las razas de ganado *B. Indicus* y *B. Taurus*, y éstas deben considerarse al diseñar programas de reproducción asistida. La nutrición, el anestro posparto y la edad de inicio de la pubertad son especialmente importantes en el ganado *B. indicus*. También tienen un período de estro más corto, a menudo expresado durante la noche, y aunque la dominancia folicular es similar, los diámetros máximos del folículo dominante y el CL son más pequeños (Bó et al., 2003), al igual que los diámetros del folículo dominante en el momento de la selección y ovulación (Sartori et al., 2001; Sartorelli et al., 2005; Gimenes et al., 2008). Además, las razas *B. indicus* tienden a ser más sensibles a las hormonas esteroides, que deben considerarse al diseñar programas de sincronización del estro (Bó et al., 2003). Sin embargo, las razas *B. indicus* también tienen mayores recuentos de folículos antrales (Batista et al., 2014; Sartori et al., 2016^o), lo que tiene implicaciones importantes para la obtención de ovocitos por OPU en los programas de PIV.

SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL O TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.

Prostaglandina F2 α

La prostaglandina F2 α (PGF) se ha convertido en el tratamiento más común para la inducción electiva de la regresión luteal y la sincronización del estro en el ganado bovino (revisado en Odde, 1990). Sin embargo, las vacas deben estar ciclando y la PGF no inducirá luteólisis durante los primeros 5 días del ciclo (Seguin, 1987). Además, la aparición del estro puede ocurrir durante varios días. El tratamiento cuando el folículo dominante está casi maduro dará lugar a la ovulación en 2 o 3 días, mientras que el tratamiento cuando ya no sea viable el folículo dominante dará lugar a la ovulación del folículo dominante de la siguiente onda, 4 a 5 días después (Kastelic et al., 1990). En un esquema de sincronización con dos dosis de PGF, se recomienda un intervalo de 11 días para garantizar que todos los bovinos tengan un CL sensible a PGF en el momento del segundo tratamiento. Aunque se ha encontrado que un intervalo de 11 días es aceptable para las vaquillonas (Selk et al., 1988), se han reportado tasas de

concepción más altas en vacas lecheras lactantes con un intervalo de 14 días (Folman et al., 1990). La mayoría de los métodos de sincronización del estro utilizan PGF para provocar la regresión del CL.

Las tasas de preñez aceptables en la transferencia de embriones dependen parcialmente de la aparición del estro en la receptora, que debe ocurrir con una sincronía no mayor a 24 horas con la del estro de la donante o con el estadio de desarrollo del embrión (Bó et al., 2012). Las tasas de preñez no difieren si las receptoras se seleccionan después de la detección del estro natural, en animales no tratados o que en animales sincronizados. Como el estro en las donantes se producirá de 36 a 48 horas después del tratamiento con PGF, las receptoras deben recibir tratamiento de 12 a 24 horas antes que las donantes (Bó y Mapletoft, 2014).

Progesteronas

La progesterona altera la función ovárica en el ganado al suprimir el estro y prevenir la ovulación, principalmente al suprimir la liberación del pico preovulatorio de LH. Como la progesterona no suprime la secreción de FSH, las ondas foliculares continúan emergiendo en presencia de un CL funcional (Adams, 1999). Las progesteronas administradas por intervalos que exceden la vida de un CL dan como resultado un estro sincrónico al retirarse, pero la fertilidad suele ser baja porque los dispositivos que liberan progesterona exógena producen niveles subluteales de progesterona que son menos supresoras de la pulsatilidad de LH que la progesterona endógena. La alta frecuencia de los pulsos de LH resultante conduce a un folículo "dominante persistente" (Savio et al., 1993) con un ovocito envejecido o pre-activado que puede ser infértil (Revah y Butler, 1996).

Los dispositivos de liberación de progesterona ahora se utilizan para sincronizar el estro en el ganado (Mapletoft et al., 2003), y existen varios productos de este tipo disponibles en Brasil y Argentina con diferentes cargas útiles de progesterona para diferentes clases de ganado. Los dispositivos de progesterona normalmente se retiran después de 7 u 8 días y la PGF se administra en ese momento (o 24 horas antes); el estro ocurre de 48 a 72 horas después. Debido al corto período de tratamiento, no se producen folículos persistentes y la fertilidad después de la IA suele ser normal. Los dispositivos de progesterona son muy adecuados para los diversos protocolos utilizados para sincronizar el desarrollo folicular y la ovulación (Mapletoft et al., 2003).

Como los protocolos diseñados para la sincronización del estro dependen de la detección del estro, los resultados suelen ser decepcionantes, ya que la detección del estro requiere mucho tiempo y es imprecisa (Washburn et al., 2002). Si bien pueden obtenerse tasas de concepción aceptables después de la detección del estro, las tasas de preñez son bajas debido a las bajas tasas de detección de los estros. La eficiencia de detección del estro también afecta el uso de tecnologías de reproducción asistida, por ejemplo, cuando se usa PGF para sincronizar receptoras que están ciclando con un protocolo de 2 inyecciones, se espera que el 80% muestre signos de estro dentro de los 5 días del segundo tratamiento. Sin embargo, debido a la ineficiente detección del estro, menos del 50% recibe un embrión (Bó et al., 2012).

El problema puede ser mayor si las receptoras son *B. indicus* o cruza *B. indicus* en un sistema pastoril (Sartori y Barros, 2011). Una alternativa es eliminar la necesidad de detectar el estro mediante la aplicación de protocolos de tiempo fijo (Baruselli et al., 2010; Bó et al., 2013).

MANIPULACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA PARA LA IA A TIEMPO FIJO O LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES A TIEMPO FIJO

Ablación folicular con ultrasonido.

La ablación transvaginal guiada por ultrasonido de los folículos antrales da lugar a la aparición de una nueva onda folicular en aproximadamente 1,5 días al eliminar los efectos supresores de los productos foliculares (p. ej., estradiol e inhibina) sobre la liberación de FSH (Bergfelt et al., 1994). Aunque la ablación del folículo en combinación con PGF es eficaz para sincronizar la emergencia de la onda folicular y la ovulación, no es práctica.

Estradiol y progesterona

El valerato de estradiol se usó originalmente al comienzo de un protocolo de progesterona de 9 días para causar la luteólisis inducida por el útero (Wiltbank et al., 1965), pero también se ha demostrado que suprime los folículos antrales (Bó et al., 1995). El mecanismo de la atresia folicular inducida por estrógenos parece ser sistémico e implica la supresión de la FSH. Una vez que el estradiol administrado de forma exógena se metaboliza, hay un aumento de FSH y crece una nueva onda folicular. La administración de 2,5 a 5 mg de estradiol-17 β (E-17 β ; revisado en Bó et al., 2002) o 2 mg de benzoato de estradiol (EB; Martínez et al., 2005) o valerato de estradiol (EV; Colazo et al., 2005) en el ganado bovino tratado con progesterona resulta en la aparición de una onda folicular en 3 a 5 días.

En los protocolos de sincronización desarrollados inicialmente, se administraba 2 mg de EB en el momento de la inserción de un dispositivo con progesterona que se extraía 7 días después, en el momento de la administración de PGF (Mapletoft et al., 2003). Se administró una dosis de 1 mg de EB 24 horas después para inducir un pico preovulatorio de LH a las 16 a 18 horas (Martínez et al., 2007) y la ovulación aproximadamente 30 horas después. Esto permitió la IATF con tasas de preñez aceptables. Como alternativa, la administración de 0,5 a 1,0 mg de cipionato de estradiol (ECP; Colazo et al., 2003) en el momento del retiro del dispositivo con progesterona, con IATF a las 48 a 56 horas más tarde, se usa a menudo en América del Sur (Sales et al., 2012; Martins et al., 2017). Se ha demostrado que las tasas de preñez después de la IATF han mejorado en las vaquillonas y vacas con cría, especialmente en las cruza de *B. indicus*, cuando se administran 300 a 400 UI de eCG en el momento del retiro del dispositivo con progesterona (Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2012; 2016). La administración de eCG estimula el crecimiento y la maduración del folículo dominante y aumenta la producción de progesterona en el CL subsiguiente (*B. taurus*, Nuñez-Olivera et al., 2014; *B. indicus*, Baruselli et al., 2004). Los tratamientos con estradiol, progesterona y eCG también son muy útiles para la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) con una mayor proporción de receptoras seleccionados

para la transferencia de embriones y mayores tasas de preñez después de la transferencia (Baruselli et al., 2010; Bó et al., 2012; Rodrigues et al., 2010).

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

El tratamiento con GnRH del ganado bovino con un folículo dominante en crecimiento, inducirá la ovulación y la aparición de una nueva onda folicular de 1 a 2 días después (Macmillan y Thatcher, 1991) al inducir la liberación de LH, pero solo cuando ocurre la ovulación (Martínez et al., 1999). Pursley et al. (1995) han desarrollado un protocolo de sincronización de la ovulación para IATF en ganado lechero lactante que utiliza GnRH, protocolo llamado Ovsynch. La administración de GnRH era seguida a los 7 días por PGF y una segunda GnRH a las 48 horas, con IATF 16 a 18 horas después. Más recientemente, se ha demostrado que la preñez por IA (P/IA) mejora en el ganado lechero lactante si el intervalo de la PGF a la segunda GnRH se incrementa a 56 horas (Ovsynch-56; Brusveen et al., 2008) y más recientemente aún que la fertilidad aumenta en vacas multíparas si se administra una segunda PGF a las 24 horas de la primera. El protocolo Ovsynch ha sido más eficaz en vacas lecheras lactantes que en vaquillonas (Seguin, 1997). Se ha informado que las tasas de ovulación después de la primera GnRH son mayores en las vacas que en las vaquillonas y un mayor porcentaje de vaquillonas muestra estro temprano, lo que resulta en una reducción de la fertilidad después de la IATF (Wiltbank, 1997).

La etapa de desarrollo del folículo dominante (Martínez et al., 1999) y la etapa del ciclo estral (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2000) afecta la respuesta a la primera GnRH. Si el folículo dominante es inmaduro o post-maduro, la ovulación puede no ocurrir y no surgirá una nueva onda folicular. El ganado responde más consistentemente entre los días 5 y 12 del ciclo estral, por lo que a menudo se usa un tratamiento de pre-sincronización con 2 inyecciones de PGF antes de la administración de la primera GnRH (Moreira et al., 2001). Se han desarrollado varios otros protocolos de pre-sincronización para mejorar la P/IA después del uso del protocolo Ovsynch (Stevenson, 2011). Alternativamente, el uso de un dispositivo con progesterona en el momento de la primera GnRH también mejoró la P/IA en vaquillonas de carne (Martínez et al., 2002), vacas de carne (Lamb et al., 2001) y vacas lecheras anovulatorias (Stevenson et al., 2006; Bisinotto et al., 2013). El tratamiento con eCG en el momento del retiro del dispositivo con progesterona también ha mejorado las tasas de preñez en vacas de carne que no ciclaban (Bó et al., 2016).

Más recientemente, se ha desarrollado un protocolo llamado Co-Synch de 5 días para el ganado de carne en América del Norte, con P/IA mayores que los obtenidos con el protocolo Co-Synch de 7 días, que es el más tradicional (Bridges et al., 2008; revisado en Día, 2015). La base fisiológica de este protocolo es reducir el período de inserción del dispositivo con progesterona a 5 días, evitando el desarrollo de folículos persistentes en el ganado que no ovula a la primera GnRH, y luego alargando el período de estro a 72 horas para permitir un mayor desarrollo del folículo dominante y mayores niveles de estrógenos circulantes antes de la ovulación. Sin embargo, se requieren dos inyecciones de PGF con este protocolo para inducir la regresión luteal en animales que ovulan a la primera GnRH. Se han diseñado varios estudios subsiguientes para

eliminar la necesidad de manejo adicional de animales asociado con dos inyecciones de PGF, pero los resultados han sido inconsistentes, posiblemente debido a la respuesta inconsistente a la primera GnRH en vaquillonas. Rabaglino et al. (2010) no encontraron diferencias en P/IA, si se administraron una o dos inyecciones de PGF, mientras que Peterson et al. (2011) informaron que las vaquillonas a las que se administraron dos inyecciones de PGF solían tener tasas de P/IA mayores. Colazo y Ambrose (2011) eliminaron la administración inicial de GnRH en el protocolo de 5 días sin afectar negativamente a la fertilidad. Sin embargo, en un estudio con un gran número de vaquillonas, Lima et al. (2013) encontraron que la P/IA fue mayor en las vaquillonas que recibieron GnRH en el momento de la inserción del dispositivo con progesterona y dos inyecciones de PGF después del retiro del dispositivo con progesterona (en los días 5 y 6) que en las vaquillonas que no recibieron la GnRH inicial, ya sea que reciban una o dos inyecciones de PGF.

Más recientemente, Kasimanickam et al. (2014) informaron que la GnRH inicial aumentó las tasas de P/IA en las vaquillonas de carne, pero no en vaquillonas lecheras, y que la P/IA en las vaquillonas lecheras no fue diferente sea que recibieran una o dos inyecciones de PGF. Quizás, es simplemente una cuestión de poder estadístico. En Argentina, se ha desarrollado un protocolo basado en estradiol con una exposición reducida a la progesterona y un proestro alargado, llamado J-Synch (revisado en Bó et al., 2016; de la Mata et al., 2018). Este protocolo tiene la ventaja de que no se requiere un tratamiento inicial de GnRH y, posteriormente, dos inyecciones de PGF. El uso de un protocolo de 6 días J-Synch ha dado como resultado una mayor P/IA en vaquillonas que el protocolo convencional de 8 días basado en cipionato de estradiol (Bó et al., 2016). Los protocolos basados en GnRH también son eficaces en la sincronización de la ovulación en receptoras (Bó et al., 2012). En vaquillonas cruzadas *B. indicus* x *B. taurus*, la tasa general de preñez fue mayor en las receptoras tratadas con un protocolo de 7 días basado en GnRH que con PGF solo, porque más receptoras tenían un CL el día de la transferencia de embriones (Baruselli et al., 2010). La inclusión de un dispositivo con progesterona en un protocolo de 7 días basado en GnRH en receptoras de embriones también ha resultado en mayores tasas de preñez (Beal, 1999). En un ensayo de campo que incluyó a 1637 receptoras tratadas con GnRH más un dispositivo con progesterona (CIDR) y sin detección de estro, la tasa general de preñez después de la transferencia de embriones a receptoras con un CL fue de 59,9%. Los efectos beneficiosos del protocolo J-Synch sobre la fertilidad se confirmaron recientemente en un programa de sincronización de receptoras (Bó et al., 2016).

MANIPULACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA PARA LA SUPERESTIMULACIÓN

El objetivo de los tratamientos superestimuladores en el ganado bovino es obtener el número máximo de embriones viables, estimulando el crecimiento de los folículos antrales y la ovulación de ovocitos competentes (Bó y Mapletoft, 2014). Dos factores muy importantes que influyen en la variabilidad en la respuesta superestimuladora son el número intrínseco de folículos antrales en las donantes y la etapa de desarrollo folicular en el momento de iniciar los tratamientos con FSH. La respuesta se puede predecir mediante los recuentos de folículos antrales realizados con ecografía (Singh et al., 2004;

Ireland et al., 2008), o la medición de las concentraciones circulantes de hormona antimülleriana (AMH; *B. taurus*, Rico et al., 2009; Ireland et al., 2011; *B. indicus*, Batista et al., 2014). Los altos recuentos de folículos antrales resultaron en más ovulaciones y un mayor número de embriones transferibles que los bajos recuentos de folículos antrales (Ireland et al., 2007). De manera similar, el cuartil superior de los valores circulantes de hormona antimülleriana (AMH) se asoció con una mayor respuesta superovulatoria que el cuartil más bajo (Souza et al., 2014).

El protocolo convencional de inicio de la superestimulación durante la mitad del ciclo se ha basado en evidencias anecdóticas y experimentales que sugieren una mayor respuesta superovulatoria cuando los tratamientos con FSH se iniciaron entre los días 8 y 12 del ciclo (Bó y Mapletoft, 2014). Ahora se sabe que la mitad del ciclo es el tiempo aproximado de emergencia de la segunda onda folicular (Ginther et al., 1989b). Sin embargo, el día de la emergencia de la segunda onda varía según el tipo de onda (1 o 2 días después en ciclos de 2 ondas que en ciclos de 3 ondas). En este sentido, Nasser et al. (1993) mostraron que la respuesta superovulatoria fue mayor cuando se iniciaron los tratamientos con FSH en el momento de la emergencia de la onda folicular; la asincronía de 1 día redujo la respuesta. La necesidad de esperar hasta la mitad del ciclo para iniciar el tratamiento con FSH implica vigilar el estro, una demora obligatoria y la imposibilidad de agrupar a las donantes. Una alternativa es superestimar a las donantes luego de la sincronización de la emergencia de la onda folicular (Bó et al., 1995; 2002; 2014).

Ablación folicular

La ablación folicular guiada por ultrasonido transvaginal seguida de tratamientos con FSH 1 o 2 días más tarde es muy eficaz (Bergfelt et al., 1997), pero requiere habilidades y equipos especializados y es difícil de aplicar en el campo. Sin embargo, la aspiración de folículos para OPU/IVF sincronizará la emergencia de la onda y, por lo tanto, se podrían producir embriones tanto *in vitro* como *in vivo*, a partir de la misma donante (Surjus et al., 2014).

Estradiol y progesterona

El enfoque preferido para la sincronización de la emergencia de la onda folicular antes de la superestimulación es la administración de 5 mg de E-17 β más 100 mg de progesterona y la inserción de un dispositivo con progesterona 4 días antes de iniciar los tratamientos con FSH. Los resultados experimentales (Bó et al., 1996) y comerciales (Bó et al., 2002) han demostrado que la producción de embriones después de este tratamiento en etapas desconocidas del ciclo estral es comparable a la iniciada 8 a 12 días después del estro observado. Al sincronizar la emergencia de la onda folicular, está disponible la extensión total del ciclo estral para hacer el tratamiento y se eliminó la necesidad de detectar el estro y esperar de 8 a 12 días para iniciar los tratamientos con FSH. Aunque el E-17 \square y el benzoato de estradiol están disponibles en la mayoría, si no en todos, los países de América del Sur, este no es el caso en muchos otros países del mundo que requieren el uso de alternativas para sincronizar la emergencia de la onda folicular antes de la superestimulación

GnRH

Los intentos de sincronizar la emergencia de la onda folicular en donantes de embriones con GnRH no tuvieron éxito inicialmente; sin embargo, los datos de campo posteriores fueron más prometedores. En estos casos, la GnRH se administró entre 1,5 y 3,0 días después de la inserción de un dispositivo con progesterona, que puede haber aumentado la probabilidad de aparición de un folículo sensible a la LH. De hecho, Bó et al. (2008) informaron sobre el uso estratégico de PGF, un dispositivo con progesterona y GnRH para inducir la ovulación antes de iniciar los tratamientos con FSH. Básicamente, se indujo un folículo persistente mediante el tratamiento con PGF en el momento de la inserción del dispositivo con progesterona. Después de la administración de GnRH 7 días después; la ovulación se produjo en más del 95% de los animales. La superestimulación iniciada 36 horas después de administrar la GnRH (con el dispositivo con progesterona en su lugar) dio lugar a una respuesta superovulatoria que no difería de los controles. Más recientemente, Hinshaw et al. (2015) informaron que no hubo diferencias en la respuesta superovulatoria si la GnRH se administró 2 o 7 días después de la inserción de un dispositivo con progesterona.

LA APLICACIÓN DE ESTAS TECNOLOGÍAS EN SUDAMÉRICA.

Los países sudamericanos son líderes mundiales en la producción de carne vacuna, mientras que solo Uruguay y posiblemente Argentina, tienen industrias lácteas lo suficientemente grandes como para superar las demandas locales. En 2016, los países de América Latina tenían aproximadamente 359 millones de cabezas de ganado bovino (que representan el 24% de la población ganadera mundial) y produjeron 15,1 millones de toneladas de carne vacuna (FAO, 2018). Brasil tenía 218,2 millones de reses y produjo 9,3 millones de toneladas de carne en 2016. De los principales países productores de carne en América del Sur, Brasil (60,8% del total), Argentina (14,7%) y Uruguay (3,3%) también se destacan en el desarrollo y la aplicación de biotecnologías de reproducción asistida. A través de programas de capacitación y educación continua, en muchos de los cuales uno o más de los autores han participado, estas tecnologías se utilizan cada vez más en otros países de América del Sur. Es a través de estos esfuerzos, en asociación con la industria farmacéutica, que la revolución reproductiva en rumiantes en América del Sur se ha generalizado.

No es posible en este manuscrito discutir todas las contribuciones de los científicos sudamericanos a la mejor comprensión de la reproducción bovina, especialmente en las razas *B. indicus*, ni describir en detalle la aplicación de biotecnologías reproductivas en sus rodeos de cría. Sin embargo, la lista de referencias en este manuscrito (y en muchas otras publicaciones similares) proporciona nombres de muchos ciudadanos sudamericanos que han hecho contribuciones importantes. Brasil y Argentina, en particular, son muy activos en investigación, educación continua y capacitación de estudiantes de posgrado en biotecnologías reproductivas, especialmente en ganado bovino.

La aplicación de las tecnologías de reproducción asistida (Sartori et al., 2016b), y el estado de las industrias de

transferencia de embriones (Viana et al., 2017) e IA (Baruselli et al., 2017) en Brasil se han revisado recientemente. Por lo tanto, este documento se centrará en Brasil, reconociendo que se están produciendo avances similares en otros países de América del Sur, especialmente en Argentina y Uruguay. La industria de la transferencia comercial de embriones comenzó en América del Norte a principios de la década de 1970, y la tecnología pronto se extendió a América del Sur (Mapletoft, 2013). Si bien los números de embriones bovinos derivados in vivo (DIV) se mantuvieron modestos durante varios años, Brasil y Argentina se clasificaron sistemáticamente entre los cinco primeros países fuera de Norteamérica y Europa. Perry (2017) informó que en 2016 se produjeron en todo el mundo más de 632,000 DIV y 666,000 de embriones bovinos producidos in vitro (PIV). América del Norte representó más del 52% de los embriones DIV, pero América del Sur representó más del 57% de los embriones PIV. El uso de la PIV en Brasil ha aumentado rápidamente desde 2000, impulsado principalmente por razas *B. indicus* que tienen un gran número de folículos antrales de los cuales se pueden recuperar grandes números de ovocitos de alta calidad, sin sobreestimulación. Viana et al. (2017) informaron que la transferencia de embriones representó el 19,7% de todos los terneros "Cebú" registrados en Brasil entre 2005 y 2015. La producción de embriones in vitro en Brasil aumentó un 184,0% entre 2005 y 2016, mientras que la cantidad de embriones de DIV disminuyó un 73,7% (Fig. 2; Viana, comunicación personal).

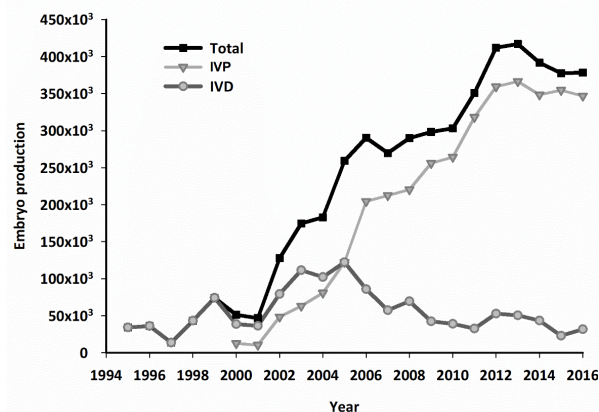


Figura 2. Producción de embriones bovinos en Brasil desde 1995 hasta 2016. Los números de embriones producidos se muestran como total (embriones in vivo e in vitro combinados); PIV (embriones producidos in vitro; OPU/FIV); DIV (embriones producidos in vivo; superovulación y recolección). Hay que tener en cuenta que a partir de 2005 los números de embriones PIV superaron los números de embriones DIV y los números de embriones DIV comenzaron a disminuir. Agradecimiento al Dr. JHM Viana. Embryo production = Producción de embriones Year = Año

Se ha informado que los embriones PIV en forma comercial en Brasil ha pasado por tres fases (Sartori et al., 2016b). La fase inicial involucró el uso de donantes probadas de alto mérito genético tanto en ganado bovino como en ganado lechero, y el número de embriones DIV y PIV aumentó de manera similar. La segunda fase de crecimiento ocurrió entre 2003 y 2010, impulsada principalmente por la necesidad de producir toros de reemplazo. En 2005, en el pico de esta fase, el 90,0% de

la PIV se encontraba en razas de carne y la raza Nelore representaba el 82.7% de todos los embriones. La tercera fase ha involucrado el uso de semen sexado y se asocia con un cambio en la PIV de razas Bos taurus de carne a las razas lecheras. En 2014, la PIV en razas lecheras aumentó en un 46,5% (69,0% del total), superando por primera vez a las razas de carne.

Un ejemplo similar de la aplicación de tecnologías de reproducción asistida implica la utilización de IATF en la cría de ganado. La mayoría de los rodeos de carne en Brasil están compuestos por B. indicus o cruza con B. indicus, mientras que Argentina y Uruguay tienden a tener más razas de B. taurus y sus cruza. Cabe destacar que las razas B. indicus tienden a tener largos períodos de anestro postparto y puntuaciones bajas de condición corporal en sistemas pastoriles, con un intervalo mayor desde el parto hasta la concepción y baja fertilidad (Bó et al., 2003). En un sistema de producción de vacas y terneros en sistemas pastoriles, los protocolos de sincronización son necesarios para producir preñeces por IA durante una corta temporada de servicio y, debido a problemas con la detección del estro, se ha incorporado la IATF (Bó et al., 2013; 2016). Los objetivos de la reproducción han sido inseminar temprano en la temporada de servicio, seguido del diagnóstico ecográfico precoz de la preñez y la re-inseminación del ganado vacío tan pronto como sea posible (Baruselli et al., 2017).

Debido a que los preparados de estradiol han estado disponibles en América del Sur, la mayoría de los protocolos de IATF incluyen el estradiol como un medio para sincronizar la emergencia de la onda folicular y la ovulación (Bó et al., 2013). Como la ciclicidad y la condición corporal del rodeo son en general bajas, generalmente se incluyen en los protocolos de sincronización los dispositivos con progesterona y la eCG (Baruselli et al., 2012; Bó et al., 2016). Para minimizar el manejo de los animales y el efecto supresor de la progesterona sobre el crecimiento del foliculo en las vaquillonas B. indicus, la PGF se administra a menudo al comienzo del protocolo, y la ECP se administra al momento de la extracción del dispositivo con progesterona (en lugar de EB 1 día después) con IATF 48 horas después. Los protocolos de 6, 7, 8 o 9 días de tratamiento con progesterona han dado como resultado una P/IA similar, y se han utilizado con éxito protocolos acortados, con proestro alargado, tanto con estradiol como con GnRH (Bó et al., 2016). La administración de PGF en el día 7 (1 día antes del retiro del dispositivo con progesterona) en vacas lecheras ha aumentado el P/IA después de IATF o TETF en algunos trabajos (Pereira et al., 2013) pero no en otros realizados por los autores de esta revisión. Se han demostrado los beneficios de la eCG en los protocolos de tratamiento de TETF para receptoras cruzada (Baruselli et al., 2010; Bó et al., 2012) y en vacas lecheras de alta producción (Rodrigues et al., 2010).

También se han desarrollado protocolos de re-sincronización para reducir el intervalo entre la IATF y la re-inseminación de animales no preñados (Bó et al., 2016). Tradicionalmente, la resincronización se realizó al momento del diagnóstico de preñez 28 a 32 días después de la IATF, con un intervalo de reproducción de aproximadamente 40 días. Dos protocolos recientes, desarrollados en Brasil, que comienzan antes del diagnóstico de preñez (14 o 22 días después de la IATF) han reducido el intervalo entre la IATF y la re-inseminación a 24 y

32 días, respectivamente (revisado en Baruselli et al., 2017). La novedad del protocolo de 24 días es el uso de la ecografía Doppler 22 días después de la IATF para el diagnóstico de preñez; un área de CL de $\geq 2 \text{ cm}^2$ y/o un flujo de sangre al CL de $\geq 25\%$ son suficientes para realizar un diagnóstico positivo de preñez. Los protocolos de re-sincronización han llevado a la adopción de esquemas de manejo exclusivamente para IATF, eliminando la necesidad de toros de repaso. En un estudio, se logró una tasa de preñez acumulada del 87,4% después de tres IATF en una temporada de reproducción de 64 días lo cual fue mayor que la obtenida con el repaso con toros después de una IATF (Baruselli et al., 2017).

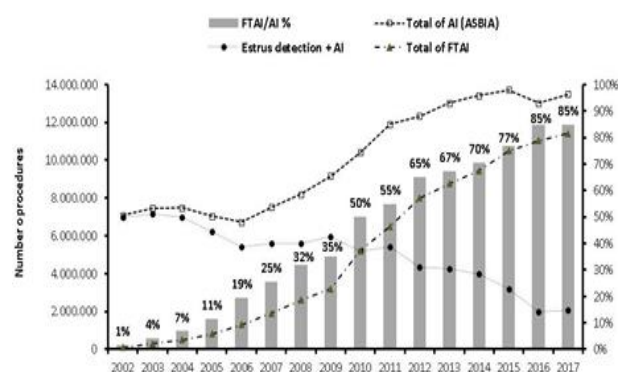


Figura 3. Ilustración del mayor uso de la inseminación artificial (IA) y de la IATF en Brasil. Los números de IA son IA a detección del estro, mientras que los números de IATF son una estimación basada en el número de protocolos vendidos (información proporcionada por las compañías farmacéuticas en el sector) y el número total de IAs se basa en los números de pajuelas vendidas (*ASBIA, 2017). Los datos fueron organizados por el Departamento de Reprodução Animal-FMVZ-USP, São Paulo, Brasil, 2017. Adaptado de Baruselli et al., 2017. *ASBIA (Asociación Brasileña de Inseminación Artificial). Number of procedures = Número de procedimientos FTAI/AI = IATF/IA Estrus detection + AI = IA a la detección de estro.

Los datos también indican que la IATF está aumentando el uso de la IA, especialmente con los toros B. indicus en vacas B. indicus en Brasil. Ha habido un aumento de más de 10 veces en el uso de la IATF en Brasil, de ~ 1 millón de protocolos en 2005 (11% de todas las IA) a 10,5 millones de protocolos en 2015 (77% de todas las IA; Sartori et al., 2016b), y un aumento adicional a más de 11 millones de IATF en 2016 (Baruselli et al., 2017; Fig. 3). Actualmente, los procedimientos de IATF representan el 85% de la IA realizada en Brasil. Además, la proporción de vacas lecheras no inseminadas a los 70 días de lactación ha disminuido, lo que resulta en más vacas preñadas a los 103 días de lactación (DIM) y una disminución de aproximadamente 35 días de vaca vacía (Sartori et al., 2016b). Los informes de la industria de Argentina y Uruguay para la temporada de reproducción 2016/17 indican una tendencia similar, especialmente en el ganado de carne (3 millones y 300,000 IATF, respectivamente, que representan aproximadamente el 10-15% de sus rodeos de reproducción). En total, más de 15 millones de bovinos fueron inseminados por IATF en estos tres países durante el año pasado. Baruselli et al. (2017) sugirió que la adopción de esta tecnología es un

excelente ejemplo de un cambio tecnológico en el sector productivo que surge de los avances científicos en el sector académico.

Beneficios financieros de la revolución reproductiva en los rumiantes en Brasil

Se estima que el impacto de la IATF en las industrias láctea y de carne bovina en Brasil es de ~ U\$D800 millones de ingresos adicionales por año (Baruselli et al., 2017). El uso de la IATF ha dado como resultado que aproximadamente 3.500 veterinarios se involucren directamente con ~ U\$D175 millones de actividad económica, y ha habido un aumento del 8% en la producción de terneros, lo que representa un ingreso adicional de ~ U\$D253 millones. Por lo tanto, la IATF en Brasil ha aumentado los ingresos en la cadena de producción de carne bovina en más de 500 millones de U\$D al año. En la industria láctea, la IATF ha agregado U\$D278 millones por año al reducir los intervalos entre partos y al aumentar el uso de toros genéticamente superiores. Se estima que la IATF redujo el intervalo entre partos en 30 días y aumentó la producción anual de leche en un 10%, lo que dio como resultado unos U\$D234 millones de ingresos adicionales por año para los productores de leche.

CONSIDERACIONES FUTURAS PARA EL DESARROLLO CONTINUO DE LA INDUSTRIA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

A pesar del progreso considerable realizado en la aplicación de tecnologías de transferencia de embriones bovinos en América del Sur en las últimas dos décadas, especialmente con la PIV en Brasil, la selección de donantes se ha apoyado en gran medida en los rasgos fenotípicos. Para obtener una ganancia genética real, los intervalos generacionales deben acortarse, la intensidad de la selección debe aumentarse y la precisión de la selección debe mejorarse (Smith 1988). Las técnicas genómicas ahora se han convertido en esenciales para la selección de donantes (machos y hembras) utilizados en la transferencia de embriones (Ponsart et al. 2014). En la industria láctea, el progreso genético se ha acelerado mediante el uso de la transferencia de embriones combinada con la selección genómica. Esto podría tener un impacto aún mayor en la industria de la carne bovina, ya que los rasgos genómicos para la producción de carne bovina están desarrollados, por lo menos para la raza Angus y Nelore.

Aunque el uso de embriones de PIV en América del Sur ha aumentado mucho en los últimos 15 años, una limitación importante ha sido que la mayoría de los embriones de PIV tenían que ser transferidos de nuevo. La criopreservación de embriones de PIV, especialmente en las razas B. indicus, ha sido muy difícil y los resultados muy variables. Aunque las mejoras en las condiciones de cultivo y los sistemas de clasificación de embriones probablemente aumentarán el éxito en la criopreservación, una publicación reciente de Sanches et al. (2016) sugiere que la transferencia directa de embriones PIV es posible. Con los avances continuos en esta tecnología, el uso de embriones de PIV criopreservados sin duda aumentará.

Los espermatozoides seleccionados por sexo en la producción de embriones de PIV tienen ventajas obvias, especialmente con el reciente aumento en el uso de PIV en la generación de embriones para ganado de leche. Sin embargo, Siqueira et al.

(2017) han informado recientemente que el uso de espermatozoides sexados por el sistema inverso (llamado en inglés reverse sorting) en la producción de embriones de PIV produjo una alteración en la programación embrionaria que causó un efecto en la producción de leche de esos animales en la edad adulta. Por lo tanto, los beneficios del uso del semen sexado en la producción de embriones PIV podrían compensarse con eventos de programación adversos. No se sabe si las técnicas más convencionales de producción de semen sexado y las nuevas tecnologías de sexado como el SexedUltra tienen efectos similares y si este efecto se puede superar. Obviamente, este hallazgo plantea preocupaciones que deben ser resueltas.

CONCLUSIONES

La capacidad de controlar la aparición de la onda folicular y la ovulación en el ganado bovino eliminó la necesidad de detectar el estro, lo que permite la IATF y el TETF, y el inicio de la superestimulación de las donantes de embriones en horarios predeterminados. Además, la utilización de eCG en estos protocolos ha incrementado las tasas de preñez, especialmente en el ganado que experimenta anestro posparto. Los profesionales de la reproducción en la mayoría de los países sudamericanos están utilizando estos protocolos que han facilitado la aplicación de tecnologías de reproducción asistida. La utilización de IATF ha dado lugar a grandes aumentos en el uso de la IA, y la adaptación de estos protocolos para TETF ha aumentado el uso de la transferencia de embriones bovinos, especialmente con embriones de PIV. Actualmente, los procedimientos de IATF representan el 85% de toda la IA realizada en Brasil, y una tendencia similar se está viendo en Argentina y Uruguay. Aunque la cantidad de embriones DIV ha tendido a disminuir, especialmente en Brasil, la PIV ha aumentado mucho, con más del 47% de todos los embriones PIV en el mundo producido en América del Sur. Ha habido un cambio notable en el uso de la PIV de razas de carne a razas lecheras en Brasil, con solo una modesta disminución en la producción de embriones. En conjunto, la aplicación exitosa de tecnologías de reproducción asistida en América del Sur está dando lugar a la difusión de nuevas y mejores líneas genéticas y al aumento del rendimiento reproductivo en todas las clases de ganado bovino, con un aumento correspondiente en la actividad económica.

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

REFERENCIAS

- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 2008; 69(1):72-80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.026

- Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*, 1999. 54:17-32.
- Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci*, 1998. 76:1903–1921.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, 2004. 82–83:479–486.
- Baruselli PS, RM Ferreira, Filho MF, Nasser LFT, Rodrigues CA, Bó GA. Bovine embryo transfer recipient synchronization and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev*, 2010. 22:67–74.
- Baruselli PS, Sa´ Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF, Bó GA. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Dom Anim*, 2012. 47(Suppl 4):134–141.
- Baruselli P, Ferreira R, Colli M, Elliff F, Filho M, Vieira L, Gonzales de Freitas B. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim Reprod*, 2017. 14:558-571.
- Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sa Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RNVR, Renno FP, Baruselli PS. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Dom Anim*, 2014. 49:448–452.
- Beal WB. Streamlining embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA; 1999. pp 78-85.
- Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 1994. 42:895-907.
- Bergfelt DR, Bó GA, Mapletoft RJ, Adams GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci*, 1997. 49:1-12.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Martinez N, Greco LF, Barbosa LFSP, Bueno PP, Scagion LFS, Thatcher WW, Santos JEP. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *J Dairy Sci*, 2013. 96:2214-2225.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 1995. 43:31-40.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of progestogen plus E-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 1996. 45:897-910.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 2002. 57:53-72.
- Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 2003. 78:307-326.
- Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, 2008. 69:81-87.
- Bó G A, 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*, 2012. 24:272–277.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim Reprod*, 2013. 10:137-143.
- Bó Gabriel A, Mapletoft Reuben J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 2014. 81:38-48.
- Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. 2016 Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, 86 388-396.
- Bridges GA, Helsler LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 2008. 69:843-851.
- Brusveen DJ, Cunha AP, Silva CD, Cunha PM, Sterry RA, Silva EPB, Guenther JN, Wiltbank MC. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2008. 91:1044-1052.
- Colazo MG, Martínez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, 2003. 60:855-865.
- Colazo MG, Martínez MF, Small JA, Kastelic JP, Burnley CA, Ward D, Mapletoft RJ. Effects of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology*, 2005. 63:1454-1468.
- Colazo MG, Ambrose DJ. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology*, 2011. 76:578-588.
- Day ML. State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim Reprod*, 2015. 12:473-478.
- Folman Y, Kaim M, Herz Z, Rosenberg M. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J Dairy Sci*, 1990. 73:2817-2825.
- García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Adams GP, Singh J, Mapletoft RJ. Lengthened superstimulatory treatment in cows: evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology*, 2015. 84:467-476.
- Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Junior JRS, Souza AH, Madureira EH, Tricia LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JBP, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2008. Follicle

- deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, 69:852-858.
- Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 1989a. 20:187-200.
 - Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert*, 1989b. 87:223-230
 - Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biol Reprod*, 2001. 65:345-350.
 - Hinshaw RH, Switzer ML, Mapletoft RJ, Bó GA. A comparison of 2 approaches for the use of GnRH to synchronize follicle wave emergence for superovulation. *Reprod Fertil Dev*, 2015. 27:263. (abstr).
 - Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 2007. 22:1687-1695.
 - Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod*, 2008. 79:1219-1225.
 - Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2011. 23:1-14.
 - Kasimanickam RK, Firth P, Schuenemann GM, Whitlock BK, Gay JM, Moore DA, Hall JB, Whittier WD. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2 α in a 5-day progesterone-based CO-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology*, 2014. 81:797-804.
 - Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ. Effect of day of prostaglandin F2 α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci*, 1990. 23:169-180.
 - Kastelic JP, Ginther OJ. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci*, 1991. 26:13-24.
 - Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci*, 2001. 79:2253-2259.
 - Lima F, Ribeiro ES, Bisinotto RS, Greco RF, Martinez N, Amstalden M, Thatcher WW, Santos JEP. Hormonal manipulations in the 5-day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J Dairy Sci*, 2013. 96:7054-7065.
 - Macmillan KL, Thatcher WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, 1991. 45:883-889.
 - Mapletoft RJ, Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J Anim Sci*, 2003. 81(E Suppl 2): E28-E36.
 - Mapletoft RJ. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim Reprod*, 2013. 10:168-173.
 - Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci*, 1999. 57:23-33.
 - Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook RB, Olson WO, Mapletoft RJ. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, 2002. 57:1049-59.
 - Martínez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M, Mapletoft RJ. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci*, 2005. 86:37-52.
 - Martínez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. *Domest Anim Endo*, 2007. 33:77-90.
 - Martins T, Talamoni JP, Sponchiado M, Maio JRG, Nogueira GP, Pugliesi G, Binelli M. Impact of estradiol cypionate prior to TAI and progesterone supplementation at initial diestrus on ovarian and fertility responses in beef cows. *Theriogenology*, 2017. 104:156-163.
 - Moreira F, de la Sota RL, Diaz T, Thatcher WW. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J Anim Sci*, 2000. 78:1568-1576.
 - Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Schouten MJ, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2001. 84:1646-1659.
 - Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 1993. 40:713-724.
 - Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Bó GA, Piaggio J, Menchaca A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol-based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim Reprod Sci*, 2014. 146:111-116
 - Odde KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci*, 1990. 68:817-830.
 - Pereira MHC, Sanches CP, Guida TG, Rodrigues ADP, Aragon FL, Veras MB, Borges PT, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM. Timing of prostaglandin F2 α treatment in an estrogen-based protocol for timed AI or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2013. 96:2837-46.
 - Perry G. 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2017. 35(4):8-23.

- Peterson C, Alkar A, Smith S, Kerr S, Hall JB, Moore D, Kasimanickam, R. Effects of one versus two doses of prostaglandin F2 α on AI pregnancy rates in a 5-day progesterone-based, CO-Synch protocol in crossbred beef heifers. *Theriogenology*, 2011. 75:1536–1542.
- Ponsart C, Le Bourhis D, Knijn H, Fritz S, Guyader-Joly C, Otter T, Lacaze S, Charreaux F, Schibler L, Dupassieux D, Mullaart E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod Fert Dev*, 2014. 26:12-21.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 1995. 44:15-923.
- Rabagliano MB, Risco C, Thatcher MJ, Kim IH, Santos JE, Thatcher WW. Application of one injection of prostaglandin F2 α in the five-day Co-Synch + CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *J Dairy Sci*, 2010. 93:1050–1058.
- Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, 1996;106:39-47.
- Rico C, Fabre S, Medigue C, Clemente ND, Clement F, Bontoux M, Touze J-L, Dupont M, Briant E, Remy B, Beckers J-F, Monniaux D. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*, 2009. 80:50-59.
- Rodrigues CA, Teixeira AA, Ferreira RM, Ayres H, Mancilha RF, Souza AH, Baruselli PS. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Anim Reprod Sci*, 2010. 118:110–117.
- Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JRG, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, 2012. 78:510–516.
- Sanches B V, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Colombo Pereira MH, Gaitkoski D, Basso AC, Arnold DR, Seneda MM. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*, 2016. 85:1147-1151.
- Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, 2005. 63:2382–2394.
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*, 2001. 65:1403-1409.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci*, 2004. 87:905–920.
- Sartori R, Barros CM. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 2011. 124:244-250.
- Sartori R, Gimenes LU, Monteiro Jr PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 2016a. 86:32-40.
- Sartori R, Prata AB, Figueiredo ACS, Sanches BV, Pontes GCS, Viana JHM, Pontes JH, Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Dode MAN, Monteiro Jr PLJ, Baruselli PS. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Anim Reprod*, 2016b. 13:300-312.
- Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil*, 1993. 98:77-84.
- Seguin B. 1987. Control of the reproductive cycle in dairy cattle. *Proc Ann Mtg Soc Therio*, pp. 300-8.
- Seguin B. Strategies for estrus control to improve dairy reproductive performance. *Proc Ann Mtg Soc Therio*, 1997. pp.320-331.
- Selk GE, Fink MS, Peake CA. Estrus synchronization of cattle using eleven day or fourteen day prostaglandin protocols. *Anim Sci Res Ag Expt Station, Oklahoma State Univ. MP, USA*. 1988. 125:34-37.
- Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict superovulatory response in cattle. *Theriogenology*, 2004. 62:227-43.
- Siqueira LGB, Dikmen S, Ortega MS, Hansen PJ. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen. *J Dairy Sci*, 2017. 100:5899-5908.
- Smith C. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 1988;29:203-212.
- Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high producing dairy cows. *J Dairy Sci*, 2014. 98:169–178.
- Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wiltbank MC. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci*, 2006. 89:2567-2578.
- Stevenson JS. Alternative programs to presynchronize estrous cycles in dairy cattle before timed artificial insemination program. *J Dairy Sci*, 2011. 94:205-217.
- Surjus RS, Prata AB, Borsato M, Mattos FC, Martins da Silveira MC, Mourão GB, Pires AV, Wiltbank MC, Sartori R. In vivo embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reprod Fert Dev*, 2014. 26:527-532.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 1999. 52:1067–1078.
- Viana J, Cristina F, Siqueira G. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod*, 2017. 14:476-481.
- Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci*, 2002. 85:244-251.

- Wiltbank JN, Zimmerman DR, Ingalls JE, Rowden WW. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. *J Anim Sci*, 1965. 24: 990-994.
- Wiltbank MC. How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. *Proc Ann Mtg Soc Therio*, 1997. pp. 83-97.