

01/08/15 - Actualidades de las técnicas de superovulación y transferencia de embriones.

A pesar de que los esfuerzos de investigación en los últimos años han dado lugar a poco o ningún aumento en el número de embriones transferibles después de la superovulación, los protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular (Bo et al., 1995; 2002) y el momento de la ovulación (Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006) han permitido el tratamiento de grupos de donantes, sea cual fuere la etapa del ciclo estral en que se encontraban y ha permitido la inseminación artificial y la transferencia de embriones a tiempo fijo (IATF y TETF, respectivamente), sin necesidad de detectar celo. El propósito de este trabajo es revisar los nuevos adelantos en materia producción y transferencia de embriones in vivo e in vitro aplicados a campo.

Tratamientos de superovulación para la producción de embriones in vivo

Tradicionalmente, los tratamientos de gonadotrofina se iniciaban durante la fase lútea media, de aproximadamente 9 a 11 días después del celo (revisado en Bó et al., 1995; Mapletoft et al., 2002), cercano al tiempo de emergencia de la segunda onda folicular (Ginther et al., 1989). Sin embargo, se produjo una mayor respuesta superovulatoria cuando se iniciaron los tratamientos en el día de la emergencia de la onda folicular, en contraposición a 1 día antes, ó 1 ó 2 días después de la emergencia de la onda (Nasser et al., 1993). Por lo tanto, los protocolos de tratamiento convencionales tienen dos inconvenientes: 1) el requisito de disponer de personal capacitado dedicado a la detección de celo, y 2) la necesidad de tener todos los donantes en estro al mismo tiempo con el fin de iniciar los tratamientos en los grupos de animales. Recientemente hemos resumido los protocolos de superovulación actuales para el ganado bovino (Bó y Mapletoft, 2014).

Sincronización de la emergencia de la onda folicular para inducir la superovulación

En la década de 1990, se informó acerca de la sincronización de la emergencia de la onda folicular, en promedio 4 días después del tratamiento con progesterona y estradiol (Bó et al., 1995). Este tratamiento ha sido utilizado por los profesionales de todo el mundo para la superestimulación del ganado, pero su uso ahora ha sido restringido en varios países. Esta restricción hace que muchos profesionales de transferencia de embriones se enfrenten a un serio dilema y ha creado la necesidad de desarrollar tratamientos sin el uso de estradiol.

Una alternativa es eliminar el efecto supresor del folículo dominante por aspiración del folículo guiada por ecografía e iniciar tratamientos superestimuladorio 1 o 2 días

más tarde (Bergfelt et al., 1997). La desventaja de la aspiración folicular guiada por ecografía es que requiere un equipo de ultrasonido y personal capacitado, por lo que únicamente es apropiada cuando las donantes se encuentran en instalaciones de producción de embriones, es muy difícil de aplicar en el campo. Sin embargo permitiría utilizar la aspiración folicular para la producción in vitro de embriones y luego comenzar la superovulación para la producción in vivo de embriones dos días después.

Otra alternativa es el uso de la GnRH para inducir la ovulación del folículo dominante que sería seguido por emergencia de la onda folicular 1 a 2 días más tarde (Martínez et al., 1999). Sin embargo, la aparición de una nueva onda folicular se sincronizó solamente cuando el tratamiento causó la ovulación, y sin pre-sincronización, la primera aplicación de GnRH provoca la ovulación en menos del 60% de los animales (Martínez et al., 1999; Small et al., 2009). No es sorprendente que el tratamiento con GnRH en momentos al azar del ciclo estral, antes de iniciar tratamientos superestimuladores, dio lugar a respuestas superovulatorias más bajas que los tratamientos iniciados después de la aspiración folicular o tratamiento con estradiol (Deyo et al., 2001). Sin embargo, en un análisis retrospectivo de los datos comerciales, Hinshaw (comunicación personal; AETA 2007) no encontró diferencias en el número de embriones transferibles de donantes superestimuladas 4 días después del tratamiento con estradiol y progesterona y las superestimuladas 2 días después del tratamiento con GnRH. En otro estudio (Wock et al., 2008), tomó vacas lecheras tratadas con progesterona y fueron superestimuladas 4 días después de recibir estradiol ó 2 días después de GnRH; nuevamente no hubo diferencias significativas en el número de embriones transferibles entre los grupos. En otro análisis retrospectivo de datos comerciales (Steel y Hasler, 2009), vacas lecheras donantes superestimuladas 60 horas después de la administración de GnRH produjeron un número similar de embriones transferibles que aquéllas superestimuladas 4 días después de recibir estradiol. A su vez las vacas tratadas con estradiol produjeron más embriones que las vacas superestimuladas entre los días 8 y 12 del ciclo estral, sin ningún tratamiento de sincronización de onda.

Recientemente hemos llevado a cabo una serie de experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación después de la ovulación inducida por GnRH con el uso de dispositivos de progesterona (Bó et al., 2008; 2010). Esto se basó, en parte, en un informe anterior que indicaba que la respuesta ovulatoria a la GnRH puede ser aumentada por la administración de PGF para regresar el CL en el momento de la inserción de un dispositivo con progesterona que se mantuvo colocado durante 7 a 10 días (Small et al., 2009). En ese estudio, la ovulación y la emergencia de la onda se dieron consistentemente 1 a 2 días

después de la administración de GnRH, lo que indica que este abordaje podría ser utilizado en grupos de donantes con ciclos al azar. El protocolo recomendado iniciado en etapas al azar del ciclo estral consiste en la administración de PGF en el momento de la inserción de un dispositivo con progesterona para inducir la regresión del cuerpo lúteo y provocar el desarrollo de un folículo persistente. Siete días más tarde (con el dispositivo con progesterona aún colocado), se administra GnRH para inducir la ovulación y la emergencia de la onda folicular, y se inician tratamientos con FSH 36 horas después. Aunque este protocolo se diseñó para 4 días de FSH, un protocolo con 5 días de superestimulación se puede lograr simplemente retrasando la administración de la segunda dosis de PGF y la retirada del dispositivo con progesterona en un día. Aparentemente la alternativa de FSH por 5 días sería más aplicable a vacas lecheras.

En general, en esta serie de experimentos, más de 95% de los animales ovularon con la primera administración de GnRH (con la emergencia esperada de la onda folicular) y la respuesta superovulatoria y los números de óvulos/embriones y su calidad fueron similares a los obtenidos cuando la onda folicular se sincronizaba con estradiol. En un trabajo reciente se comparó este tratamiento con el que se administra GnRH 48 h después de la inserción de un dispositivo con progesterona y se comienza la superovulación 48 h después (Hinshaw et al., 2015). A pesar que el tratamiento donde la GnRH se coloca 7 días después de la inserción del dispositivo con progesterona produjo 2 embriones más en promedio (14.8 ± 1.5 vs. 12.7 ± 1.5), las diferencias no fueron significativas.

Superovulación durante la primera onda folicular

Otra alternativa es inducir la ovulación e iniciar tratamientos superestimuladores en el momento de emergencia de la primera onda folicular. La emergencia de la onda folicular es siempre en el momento de la ovulación (Ginther et al., 1989), y experimentos llevados a cabo en ganado bovino (Nasser et al., 1993) y ovejas (Menchaca et al., 2002) han demostrado que es posible inducir la superovulación de folículos en la primera onda folicular. Adams et al. (1994) también informó que no había diferencias en la respuesta a la superovulación cuando se iniciaron los tratamientos con FSH en el momento de aparición de la primera o la segunda onda folicular. Sin embargo, el éxito tras el inicio de los tratamientos superestimuladores en el momento de aparición de la primera onda folicular se basa en la determinación del momento de la ovulación o la detección precisa del celo, ya que se espera que la ovulación ocurra 1 día después.

Para evitar la necesidad de detectar celo y ovulación en donantes Nelore (*Bos indicus*), Nasser et al. (2011) indujeron la ovulación sincronizada con un protocolo diseñado para IATF. Se iniciaron tratamientos con FSH en el momento esperado de

la ovulación (y la aparición de la primera onda folicular). Las respuestas a la superovulación no fueron distintas a las de un grupo contemporáneo superestimulado 4 días después del tratamiento con estradiol. Sin embargo, el número de embriones transferibles dependió del uso concomitante de un dispositivo de progesterona durante la superestimulación ya que en el grupo donde no se utilizó un dispositivo se obtuvieron solo ovocitos infertilizados.

Tratamientos prolongados

Durante una onda folicular normal, los folículos subordinados regresan debido a la disminución de las concentraciones de FSH circulantes, causadas por las secreciones (estradiol e inhibina) de la cohorte y especialmente del folículo dominante (Adams et al., 1992). Los folículos pequeños requieren FSH para continuar su crecimiento, y la evidencia sugiere que los folículos de tamaño tan reducido como de 1 mm de diámetro comenzarán su crecimiento bajo la influencia de FSH (revisado por Adams et al., 2008). Quizás todo lo que se requiere para reclutar los folículos para la superestimulación es hacer que estos folículos muy pequeños crezcan a un diámetro de 3 ó 4 mm, momento en el cual se puede iniciar el protocolo de tratamiento superestimulador común de 4 ó 5 días. Si se supone una tasa de crecimiento de 1 a 2 mm por día, esto debería llevar de 2 a 3 días, es decir, añadir 2 a 3 días al protocolo de tratamiento de superestimulación.

Por tanto, utilizando con éxito este abordaje, superestimulamos donantes en etapas al azar del ciclo estral, sin tener en cuenta la presencia de un folículo dominante (Bó et al., 2008). Se administraron pequeñas dosis de FSH dos veces al día durante 2 días y después se inició el protocolo de tratamiento con FSH normal sin un aumento de la cantidad total de FSH administrada. Como una alternativa, los 2 días de pre-tratamiento con FSH podían ser reemplazados por una sola inyección de eCG. En un estudio, la administración de 500 UI de eCG 2 días antes de iniciar tratamientos con FSH aumentó la respuesta a la superovulación en donantes de razas de carne (Caccia et al., 2000). Sobre todo en donantes de razas de carne que previamente habían producido un número de embriones no satisfactorios (citado en Bó et al., 2008).

Más recientemente, se ha investigado el efecto de prolongar el protocolo de tratamiento superestimulador tradicional de 4 días a 7 días (García Guerra et al., 2012). Alargar el protocolo de tratamiento de FSH a 7 días, sin aumentar la cantidad total de FSH administrada, aumenta el número de ovulaciones y la sincronía de las ovulaciones, y tendió a aumentar el número medio total de óvulos/embriones, óvulos fertilizados y embriones transferibles. En otras palabras, el protocolo de tratamiento superestimulador prolongado resultó en que más folículos llegaran a un tamaño ovulatorio y adquirieran la capacidad de ovular con

un mayor número de ovulaciones, y sin disminución de la calidad de los ovocitos/embriones. Se concluyó que los protocolos de tratamiento prolongados con FSH pueden ser una estrategia eficaz para reclutar pequeños folículos en la cohorte folicular disponible para superestimulación, mientras que proporcionan el tiempo adicional necesario para que estos folículos lleguen a un tamaño ovulatorio y adquieran la capacidad de ovular. Además, estos resultados sugieren que los protocolos de tratamiento superestimuladorios tradicionales de 4 días pueden no proporcionar un tiempo adecuado para que todos los folículos dentro de la cohorte adquieran la capacidad de ovular.

Reducción del número de tratamientos con fsh en un protocolo de superestimulación

Debido a que la vida media de la FSH hipofisaria se ha demostrado que es de 5 horas en la vaca (Laster, 1972), los protocolos tradicionales de tratamiento superestimuladorio consisten en aplicar dos inyecciones diarias de FSH hipofisaria, durante 4 ó 5 días (Mapletoft y Bó, 2012). Esto requiere atención frecuente por parte del personal de la granja y aumenta la posibilidad de errores debido a la falta de cumplimiento. Además, los tratamientos dos veces al día pueden causar un estrés no deseado en las vacas donantes con una disminución de la respuesta superovulatoria, y/o alteración del pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982). Por lo tanto, cabe esperar que los protocolos simplificados reduzcan la manipulación de las donantes y mejoren su respuesta, sobre todo en animales menos dóciles.

Hace más de 15 años, se informó que una sola administración subcutánea de FSH en vacas de razas de carne con alta condición corporal (> 3 de 5) daba lugar a una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo de tratamiento tradicional durante 4 días (Bó et al., 1994). Sin embargo, los resultados no eran repetibles en vacas Holando, que tenían menos tejido adiposo (Hockley et al., 1992). En un estudio posterior en vacas Holando, la inyección única se dividió en dos dosis, con el 75% de la dosis de FSH administrada por vía subcutánea en el primer día de tratamiento y el 25% restante administrada 48 horas después, cuando se administra normalmente PGF (Lovie et al., 1994). Aunque se mejoró la respuesta superovulatoria, los resultados numéricos fueron menores que con el protocolo de inyecciones dos veces al día.

Una alternativa para inducir una respuesta superovulatoria repetible con una única inyección de FSH sería combinar el extracto de hipófisis con agentes que causan la liberación lenta de la hormona durante varios días. Estos agentes se conocen comúnmente como polímeros, son biodegradables y no reactivos en los tejidos, lo que facilita su uso en animales (Sutherland, 1991). Recientemente hemos

completado una serie de experimentos en los que la FSH diluida en una solución de ácido hialurónico al 2% se administró como una única inyección intramuscular, para evitar los efectos de la condición corporal. En general, el protocolo de inyección única dio como resultado un número similar de óvulos/embriones que el protocolo tradicional de FSH dos veces al día (Tríbulo et al., 2011). Sin embargo, el ácido hialurónico al 2% es muy viscoso y difícil de mezclar con FSH, especialmente en el campo. Especulamos que, aunque las preparaciones más diluidas de ácido hialurónico fueran menos eficaces que una única inyección, su uso podría mejorarse al dividir las inyecciones con 48 horas de diferencia, como habíamos mostrado previamente con inyecciones subcutáneas de FSH. El protocolo dividido de tratamiento intramuscular consistió en diluir FSH en polvo liofilizado con 10 ml de una solución de ácido hialurónico y administrar dos tercios de la dosis total de FSH en el primer día, seguido de una segunda inyección con el tercio restante de la dosis total de FSH 48 horas más tarde, momento en que normalmente se administra PGF.

Se diseñó un experimento para comparar la eficacia del protocolo de inyección intramuscular dividida de FSH en dos concentraciones diferentes de ácido hialurónico, 1% y 0,5%, (MAP-5, Vetoquinol, Canadá) con el protocolo de inyección intramuscular dos veces al día durante 4 días en el ganado bovino (Tríbulo et al., 2012). En general, el número de embriones transferibles no difirió entre los grupos de tratamiento (control: $4,0 \pm 0,8$; 1% ácido hialurónico: $5,0 \pm 0,9$; 0,5% ácido hialurónico: $6,1 \pm 1,3$). Se concluyó que, en el ganado bovino, la división de la dosis de FSH diluida en ácido hialurónico en dos inyecciones intramusculares con 48 horas de separación resulta en una respuesta superovulatoria comparable al protocolo de 8 inyecciones intramusculares dos veces al día. Por otra parte, las soluciones menos concentradas de ácido hialurónico no son difíciles de mezclar con FSH, incluso bajo condiciones de campo.

Manipulación del desarrollo folicular en vacas productoras de embriones in vitro

La producción in vitro de embriones junto con la técnica de obtención de ovocitos por aspiración folicular guiada por ultrasonografía, conocida mundialmente como OPU, son biotecnologías reproductivas que han tenido un avance significativo en los últimos 10 años. Gracias a la optimización de los procesos, en especial, la obtención de ovocitos por medio de OPU, la producción in vitro ha avanzado considerablemente al permitir la obtención repetida de ovocitos de una donante de alto valor genético y el aumento significativo de su descendencia. Esta tecnología está muy desarrollada en Brasil, donde se produce el 80% de los embriones in vitro que se transfieren en el mundo (Perry, 2014). El factor racial es un factor que influye el éxito de la OPU. Animales cebuinos (*Bos indicus*) presentan un mayor

número de folículos reclutados por onda en comparación con las vacas *Bos taurus*. Esta observación ha sido reportada por diversos autores que igualmente observaron que la tasa de recuperación de ovocitos es superior en los animales cebuínos al ser comparados con animales taurinos, bajo los mismos protocolos (Dayan et al., 2000; Pontes et al., 2009; Baruselli et al., 2012). Asimismo datos de campo de nuestro laboratorio demuestran que también las razas sintéticas con influencia de sangre *Bos indicus* producen un número significativamente mayor de ovocitos viables y embriones producidos que las razas *Bos taurus* (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la raza de la donante sobre la cantidad de ovocitos viables aspirados por punción folicular y embriones producidos in vitro. (Medias \pm SEM)

Raza	n	Total Ovocitos Viables	Embriones
Brahman	51	15.7 \pm 1.5 ^a	7.4 \pm 0.9 ^a
Brangus Negro	244	19.9 \pm 1.3 ^a	6.7 \pm 0.6 ^a
Brangus Colorado	71	19.9 \pm 1.5 ^a	6.6 \pm 0.7 ^a
Braford	310	18.9 \pm 0.7 ^a	5.8 \pm 0.3 ^{ab}
Bonsmara	79	13.6 \pm 1.1 ^{ab}	4.2 \pm 0.5 ^{ab}
Holstein	344	12.1 \pm 0.4 ^b	3.0 \pm 0.2 ^b
Angus	30	9.8 \pm 1.4 ^b	2.8 \pm 0.5 ^b
Total	1,129	16.4 \pm 0.3	5.1 \pm 0.2

ab medias dentro de la misma columna con distintas letras difieren (P<0.05)

Se realizó una serie de trabajos con el objetivo de evaluar el efecto de tratamientos de sincronización de la onda folicular y superestimulación sobre el número y calidad de los complejos cumulus-ovocitos (COCs) aspirados por ultrasonografía

transvaginal (OPU) en vacas *Bos taurus* y cruce *Bos taurus* con *Bos indicus* (3/8 *Bos indicus*, 5/8 *Bos taurus*; Ongarato et al., 2015). En el experimento 1, vacas Brangus (n = 13) y Angus (n = 32) fueron distribuidas en 2 grupos. En el Día 0, las donantes en el Grupo 1 recibieron 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) y 50 mg de progesterona (P4) por vía intramuscular y las donantes en el Grupo 2 (control) no recibieron ningún tratamiento hormonal. En el Día 6 se realizó la OPU y clasificación de los COCs obtenidos. La media del número de folículos aspirados, COCs recuperados y COCs viables fue mayor en el grupo de vacas tratadas (P<0.05) que en la no tratadas. Además el número de folículos aspirados, COCs recuperados y COCs viables fue mayor en las donantes Brangus que en las Angus (P<0,05). En el experimento 2, vacas Brangus (n=15) y Angus (n = 15) fueron distribuidas en 4 grupos. Grupos 1 y 2 recibieron 2,5 mg de BE y 50 mg P4 intramuscular en el Día 0 y los grupos 3 y 4 fueron sometidos a remoción del folículo dominante (DFR) el Día 3. Todas las vacas recibieron PGF en el día 4 y aquellas en los Grupos 1 y 3 recibieron también 800 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG), los Grupos 2 y 4 recibieron 160 mg FSH (Folltropin-V, Vetoquinol, Canadá) dos veces al día en dosis iguales durante 2 días. La OPU se realizó el día 7. No hubo diferencias significativas entre los métodos de sincronización, sin embargo las vacas estimuladas con FSH tuvieron un número mayor de COCs que las tratadas con eCG (P<0.05). En el experimento 3, fueron utilizadas vacas Angus (n=30), distribuidas aleatoriamente en tres grupos en un diseño cruzado. Todas las donantes fueron sometidas a DFR y recibieron 500 µg de PGF en el día 0. Las vacas del Grupo 1 recibieron 160 mg de FSH dividida en cuatro inyecciones dos veces al día (es decir, Días 1 y 2); las del Grupo 2 recibieron 160 mg de FSH diluida en 4 ml de una solución al 0.5% de ácido Hialurónico (MAP-5) dada en una sola inyección intramuscular en la nalga el día 1 y las del Grupo 3 fueron vacas sin ningún tratamiento de FSH. La OPU fue realizada en el día 4. Los resultados se encuentran indicados en la Tabla 2. El número total de folículos aspirados, COCs recuperados y COCs viables fueron mayores en los Grupos 1 y 2 en relación al Grupo 3 (P<0.05). En conclusión, los tratamientos de sincronización de la onda folicular y la superestimulación aumentan el número de folículos aspirados y COCs obtenidos por sesión de OPU en vacas *Bos taurus*.

Tabla 2. Número (Medias ± EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables y blastocitos totales y Grado 1 producidos en donantes Angus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH en dosis múltiples, una sola inyección de FSH diluida en MAP 5 (50 MG) o no tratadas con FSH (Control) antes la OPU.

Variable	Tasa de concepción	Valor P	Porcentaje (%)
Calidad del CL			
1	1377/3750		36,65
2	142/380	0,45	37,36
3	13/43		30,23
Total	1532/4173		36,71
Numero de CL			
1	1643/3995	0,25	36,62
?2	69/178		38,76
Total	1712/4173		41
Categoría de la receptora			
Vacas	654/1834	0,21	35,65
Vaquillonas	220/518		42,47
Total	874/2352		37,15
Condición Corporal			
2	74/225 ^a		32,88
2,5	502/1434 ^a		35
3	570/1467 ^a	0,01	38,85
3 5	193/532		36,27

a,b Medias dentro de la misma columna con distinta letra difieren ($P < 0,05$).

Las conclusiones más importantes estos trabajos fueron: 1) la sincronización de emergencia de la onda folicular incrementó el número de COCs obtenidos por OPU- 2) El número de folículos aspirados y COCs obtenidos por OPU es mayor en los animales cruce *Bos taurus* x *Bos indicus* que en los *Bos taurus*; 3) tanto el tratamiento con BE+P4 ó la DFR son igualmente eficientes para la sincronización del crecimiento de una onda y posterior OPU; 4) el tratamiento superestimulatório con FSH aumentó el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por OPU en vacas *Bos taurus*; y 5) La superestimulación con una sola inyección intramuscular de FSH diluida en MAP-5 produjo un número de ovocitos recuperados y blastocitos producidos in vitro similar al tratamiento con inyecciones de FSH cada 12 horas.

Similares resultados se han encontrado recientemente en un experimento realizado en Brasil con vacas Holstein (Vieira et al., 2014). Un total de 30 vacas Holstein (15 lactación y 15 no lactantes) fueron bloqueadas por el estado de lactación a uno de dos grupos (control o FSH), en un diseño cruzado. Todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona y 2 mg de EB (Día 0). Vacas en el grupo de control no recibieron tratamiento adicional, mientras que las vacas en el grupo FSH recibieron una dosis total de 200 mg de FSH (Folltropin-V, Vetoquinol) en los días 4 y 5 en cuatro dosis decrecientes con 12 h de diferencia (57, 57, 43 y 43 mg). En el Día 7, se retiró el dispositivo con progesterona y se realizó la OPU (40 h después de la última inyección de FSH en el grupo tratado con FSH). No hubo diferencias entre los grupos ($P = 0,92$) en el número de folículos que se aspiraron por sesión de OPU ($17,2 \pm 1,3$ vs. $17,1 \pm 1,1$ en el control y las vacas tratadas FSH, respectivamente); sin embargo, las vacas tratadas FSH tuvieron una mayor tasa de producción de blastocitos (34,5%, 89/258 vs. 19,8%, 55/278; $P < 0,001$) y más embriones transferibles por sesión de OPU que las del grupo control ($3,0 \pm 0,5$ vs. $1,8 \pm 0,4$; $P = 0,02$). Independientemente del tratamiento, las vacas no lactantes tuvieron una tasa de blastocitos más alta (41,9%, 106/253 vs. 13,4%, 38/283; $P = 0,001$) y produjeron embriones más transferibles por sesión OPU ($3,5 \pm 0,5$ vs. $1,3 \pm 0,3$; $P = 0,003$) que las vacas lactantes. Por lo tanto, superestimulación de donantes Holstein con FSH antes de la OPU aumentó la eficiencia de la producción in vitro de embriones. Además, las donantes no lactantes tuvieron mayor porcentaje de desarrollo in vitro de blastocitos y produjeron más embriones por sesión OPU de vacas lactantes. En un trabajo posterior, también se comprobó que se obtienen los mismos resultados si en vez de usar cuatro dosis múltiples se utiliza un sola inyección de 200 mg de FSH diluida en una solución de ácido hialurónico al 0.5% (MAP-5; Silveira et al., 2014).

Programas de sincronización de receptoras de embriones bovinos

Uno de los factores que ha impedido por muchos años la utilización masiva de la técnica de transferencia de embriones es la detección de celos, principalmente en el ganado *Bos indicus* (Bó et al, 2002). El desarrollo de protocolos efectivos de sincronización de la ovulación para evitar la detección de celos ha traído como consecuencia el desarrollo de métodos de sincronización de la ovulación para facilitar la transferencia de embriones en forma sistemática, o también llamada transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF; Bó et al., 2002).

Los tratamientos más utilizados para la TETF consisten en administrar 2 mg de EB por vía intramuscular junto con la inserción de un dispositivo con progesterona, en lo que nosotros denominamos el Día 0. En el Día 5 se coloca una dosis lúteolítica de PGF intramuscular y se aplican 400 IU de eCG intramuscular. En el Día 8 se extrae el dispositivo y 24 h después se administra 1 mg de EB intramuscular. En el Día 17, se realiza TETF a todas las receptoras que tienen un CL (Bó et al., 2002, 2004). Este protocolo resulta en una tasa de aprovechamiento del 85% y una tasa de concepción del 50%, por lo que se aprovecha al máximo el uso de las receptoras de que se disponen en un establecimiento y sin afectar las tasas de preñez.

Como la aplicación del protocolo de TETF necesita de varios tratamientos (Día 0, Día 5, Día 8 y Día 9), se desarrollaron trabajos para simplificar estos protocolos (Bó et al., 2012). El protocolo que es más usado actualmente consiste en administrar 2 mg de EB por vía intramuscular junto con la inserción de un dispositivo con progesterona, en lo que nosotros denominamos el Día 0. En el Día 8 se realiza la remoción del dispositivo con progesterona y se colocan tres inyecciones por vía intramuscular: una dosis lúteolítica de PGF; 400 IU de eCG y 0.5 mg de cipionato de estradiol (ECP; Bó et al., 2012).

La GnRH también ha sido utilizada en programas de sincronización de la ovulación para TETF (Hinshaw et al., 1999). En los tratamientos de receptoras se inserta un dispositivo con progesterona entre los Días 0 y 7; se coloca GnRH en los Días 0 y 9 y una dosis luteolítica de PGF cuando se remueve el dispositivo con progesterona. Luego todos animales que tienen un CL en la Día 16 (7 días después de la segunda GnRH) son transferidos con embriones producidos in vivo o in vitro. También en estos protocolos se puede utilizar eCG para estimular el desarrollo folicular (Mayor et al., 2008).

Estudios recientes también han sugerido que la reducción del período de dominancia del folículo ovulatorio (retirando el dispositivo con progesterona 5 días después de la inserción) y el aumento del tiempo de proestro (entre la remoción del dispositivo y la GnRH) puede mejorar la preñez por IATF (Bridges et al, 2008). Este

tratamiento se denomina Co-Synch de 5 días y ha resultado en una proporción comparable de receptoras de embriones aptas para ser transferidas y similares tasas de concepción que los protocolos que utilizan estradiol y dispositivos por 7 u 8 días (Bó et al., 2012). La cuestión práctica interesante de este protocolo es que tiene la misma duración que el protocolo de superovulación. El tratamiento consiste en insertar un dispositivo con progesterona entre los Días 0 y 5. Se coloca la primera GnRH en el Día 0 y la segunda GnRH en el Día 8 (72 h después de la remoción del dispositivo) y una dosis luteolítica de PGF cuando se remueve el dispositivo con progesterona y 400 UI de eCG en el mismo momento. En vacas es recomendable además repetir la dosis de PGF 12 h después de la primera. Luego todos animales que tienen un CL en la Día 15 (7 días después de la segunda GnRH) son transferidos con embriones producidos in vivo o in vitro.

Factores que afectan la preñez en programas de transferencia de embriones in vitro

Se realizó un experimento para evaluar la influencia de distintos factores sobre el establecimiento de la preñez en receptoras de embriones producidos in vitro transferidas a tiempo fijo. Se analizaron los datos de 4214 transferencias de embriones producidos in vitro por el laboratorio Biogen Argentina S.A. en el periodo comprendido entre Noviembre de 2012 y Diciembre de 2014. Por la diversidad de los tratamientos de sincronización utilizados, estos fueron agrupados para su análisis en tres grandes grupos: 1) tratamientos con dispositivos con progesterona y EB como inductor de la ovulación; 2) tratamientos con dispositivos con progesterona y ECP como inductor de la ovulación y 3) tratamientos con dispositivos con progesterona y GNRH como inductor de la ovulación.

Los primeros dos son los tratamientos descritos en la sección anterior. El tercer tratamiento consistió en la inserción de un dispositivo con progesterona por 5 o 6 días, con o sin una dosis de GnRH en el Día 0; una dosis luteolítica PGF y 500 UI de eCG en el día de la remoción del dispositivo y una segunda GnRH a las 56 h más tarde. En las receptoras que recibieron GnRH en el Día 0 se administró una segunda dosis de PGF 12 h después.

Todas las receptoras fueron evaluadas por ultrasonografía transrectal para evaluar el estado reproductivo al inicio del tratamiento de sincronización. Solo las receptoras que tenían un CL o folículo >10 milímetros de diámetro fueron sincronizadas. El día de la transferencia las receptoras fueron evaluadas nuevamente por ultrasonografía para corroborar la presencia o ausencia de uno o más CL, tamaño y lado del mismo (derecho o izquierdo). Las receptoras que tenían uno o más CL >14 mm de diámetro recibieron un embrión, en el cuerno uterino ipsilateral al CL. El operario, lugar de la siembra (alta, en el tercio anterior o

próximo al ovario; media en el tercio medio del útero y baja en el tercio posterior o distal del útero) y la dificultad (calificación subjetiva del procedimiento en tres niveles: buena regular o mala) con que se realizó la misma fue registrado. También se registró la condición corporal de las receptoras en la escala 1 al 5 (1 emaciada-5 obesa). El diagnóstico de preñez se realizó por ultrasonografía a los 30 días de la TETF.

El análisis estadístico se realizó por regresión logística ajustando un modelo lineal mixto con una distribución binomial y un enlace logit del program Infostat (UNC; 2014). La variable dependiente fue tasa de preñez y las variables independientes fueron clasificadas en 3 tipos: 1) las que dependen de la receptora y el ambiente (Tabla 3): campo, cantidad de CL, calidad del CL (1: > 18 mm, 2: de >16 y 14 y

De los parámetros relacionados con la receptora y su medio ambiente (Tabla 3), no hubo diferencias significativas para los efectos: calidad de CL ($P = 0,46$); cantidad de CL ($P = 0,26$) y categoría de la receptora ($P = 0,21$). Se encontraron efectos significativos del campo ($P = 0,01$, no tabulado) y condición corporal ($P = 0,01$).

De los parámetros relacionados con el tratamiento de sincronización no hubo diferencias significativas para el momento en que se aplicó eCG (final: 84/209; 40,2% vs. mitad: 874/2291; 38,1%; $P = 0,35$). Aunque las receptoras tratadas con ECP (232/483; 48,0%) se preñaron más ($P = 0,01$) que las tratadas con EB (679/1888; 36,0%) o GnRH (47/129; 36,4%). Estas diferencias deben ser tomadas con cautela porque el campo influyó significativamente los resultados y no todos los tratamientos estuvieron representados en todos los campos. Por último, los factores relacionados con la transferencia que no resultaron significativos fueron día del ciclo de la receptora en que se realizó la transferencia ($P = 0,36$), estadio del embrión ($P = 0,62$) y operador ($P = 0,57$).

Estos resultados demuestran que hay una gran cantidad de factores involucrados en la obtención de una preñez con embriones. Todos estos factores deben ser tenidos en cuenta para poder tener éxito en un programa comercial.

Consideraciones finales

El uso de protocolos que controlan el desarrollo folicular y la ovulación tiene la ventaja de permitir la aplicación de técnicas de reproducción asistida sin la necesidad de detectar celo. Estos tratamientos han demostrado ser prácticos y fáciles de realizar por el personal de campo. En los esquemas de superovulación, el estradiol es muy eficaz en la sincronización de la emergencia de la onda folicular, pero no está disponible en muchos países. Aunque la administración de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular produce resultados variables, la

pre-sincronización con un dispositivo que libera progesterona se ha demostrado que mejora la respuesta a la GnRH, permitiendo superestimulación durante la primera onda folicular después de la ovulación, con resultados que no difieren de los obtenidos con la utilización de estradiol. Protocolos alargados de tratamiento de superestimulación permiten que transcurra el tiempo necesario para que estos folículos adquieran la capacidad de ovular. Por otra parte, los protocolos de tratamiento de 4 días no otorgan suficiente tiempo para que todos los folículos desarrollen la capacidad de ovular. Por último, con el uso de una formulación de liberación lenta con ácido hialurónico se ha demostrado que es posible inducir una respuesta superovulatoria repetible después de dos inyecciones intramusculares de FSH, sin afectar negativamente el número de embriones transferibles. Con respecto a la producción in vitro de embriones, los animales con influencia cebú se adaptan muy bien a esta tecnología porque tiene un alto número de folículos en las ondas foliculares que permiten la obtención de un alto número de COCs por OPU. En cambio en los animales *Bos taurus*, la sincronización del comienzo de una onda folicular y el uso de FSH aumenta las posibilidades de obtener un mayor número de COCs por OPU y blastocitos in vitro.

En la sincronización de receptoras, también la incorporación de los protocolos que controlan la dinámica folicular y la ovulación ofrecen la ventaja de poder programar los tratamientos rápidamente y en momentos predeterminados y lo más importante es que no dependen de la pericia y exactitud en la observación de celos. Con estos protocolos es posible programar las donantes y receptoras y realizar el manejo de acuerdo con nuestra conveniencia, ya que es más predecible el número de receptoras necesarias facilitando el manejo del campo y de los profesionales involucrados. Por supuesto, otros factores relacionados con la receptora y su medio ambiente y la técnica de transferencia deben ser tenidos en cuenta para poder tener suceso.

Fuente: IRAC ? www.iracbiogen.com.ar/
