

RESÚMENES DE LA II REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE TECNOLOGÍAS EMBRIONARIAS

29 y 30 de mayo de 2014. Buenos Aires, Argentina.

En esta edición son publicadas dos conferencias plenarias del material presentado en la reunión anual de la SATE.

Implicancias de la dinámica folicular sobre la producción *in vitro* de embriones

Adams, G.P. y Singh, J.

Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, CANADÁ. E-mail: gregg.adams@usask.ca

Introducción

Durante la producción *in vitro* de embriones (PIV), los complejos cúmulo-ovocito (COC) son obtenidos por aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía. Los ovocitos son colectados tanto de folículos pequeños (4-6 mm) sin tratamiento hormonal como de folículos más grandes (>8 mm) luego de una estimulación con FSH. La superestimulación aumenta el número de folículos disponibles para aspirar, sin embargo el tratamiento también incrementa el costo de producción de cada blastocisto. Los COC obtenidos a partir de folículos superestimulados pueden ser madurados *in vivo* con la administración de GnRH o LH 24 hs previas a la aspiración, pero frecuentemente el tratamiento no se realiza y los COC son madurados *in vitro*. En los sistemas de producción *in vitro*, la competencia de ovocito es medida por su capacidad de desarrollarse hasta blastocisto. Sin embargo, el conocimiento de qué hace que un ovocito sea bueno permanece sin conocerse aún. El ovocito y las células que lo rodean interactúan a través de complejas señales durante las etapas finales del desarrollo folicular, por lo que la competencia de un ovocito depende del estadio de desarrollo del folículo del cual procede. El ambiente hormonal producido por el estatus folicular y luteal puede influenciar la competencia del ovocito. El objetivo de esta revisión es resaltar los principales hallazgos de diferentes estudios sobre el efecto del estatus folicular (dominante vs subordinados, fase de crecimiento vs fase estática o fase de regresión), la onda folicular y la superestimulación sobre la competencia del ovocito en el bovino.

Repaso de la dinámica folicular en el bovino

Los estudios ultrasonográficos de fines de la década del '80 establecieron que el crecimiento de los folículos >4 mm de diámetro se producía en 2 o 3 ondas durante el ciclo estral del bovino ^(2, 15, 17, 18). Al momento de la emergencia de cada onda folicular, una cohorte de veinte folículos comienza a crecer, uno de ellos es "seleccionado" para un crecimiento diferencial ("folículo dominante") mientras que el resto (subordinados) se atresia. El desarrollo, tanto del folículo dominante como de los folículos subordinados, puede ser dividido en fase de crecimiento (aumenta su diámetro), fase estática (no cambia el diámetro) y fase de regresión (reduce el diámetro) ⁽¹⁹⁾. La progesterona (P₄) producida por el cuerpo lúteo suprime la LH, por lo que el pico preovulatorio no ocurre durante el diestro (P₄ alta), por lo tanto, los folículos dominantes de ondas sucesivas se atresian, excepto el de la última onda del ciclo, al momento de la luteólisis. No obstante, si se estimula, el folículo dominante de cada onda es capaz de ovular durante su fase estática de crecimiento ⁽²¹⁾.

Competencia del ovocito durante la onda folicular

Ha sido demostrado que la capacidad del ovocito para producir un blastocisto depende del estado de desarrollo del folículo del cual procede ^(31, 35, 36). Hay una relación positiva entre la regresión folicular y la competencia del ovocito *in vivo* ^(35, 36). Ovocitos obtenidos de folículos subordinados en la fase de regresión temprana (día 5 de la onda) desarrollan mejor hacia embriones que aquellos obtenidos de folículos subordinados al final de la fase de crecimiento (día 3) o final de la fase de regresión (día 7).

¿Hay diferencia en la competencia del ovocito entre ciclos de 2 o 3 ondas foliculares? Para responder esta pregunta realizamos un estudio sobre muchos animales de un rodeo de cría (n= 172 vaquillonas y 193 vacas con cría) para evaluar si la ovulación luego de un período corto de crecimiento del folículo dominante se asocia con una mayor fertilidad que aquella que tiene lugar luego de una mayor fase de crecimiento (similar a los patrones de 2 y 3 ondas por ciclo, respectivamente) ⁽¹⁴⁾. La mayor exposición a P₄ resultó en un intervalo desde la emergencia hasta la ovulación mayor y un folículo significativamente más gran-

de que el de la exposición breve, pero no hubo efecto sobre la tasa de preñez. Además, tampoco hubo efecto del tratamiento o número de parto sobre la proporción de animales que ovuló dentro de las 36 hs post tratamiento con LH.

La P₄ tiene un efecto supresor dosis dependiente sobre las concentraciones circulantes de LH y consecuentemente sobre la fase de crecimiento del folículo dominante⁽³⁾. Un período prolongado de baja P₄ resultó en folículos dominantes más grandes, con mayor vida media^(3, 37), ovocitos envejecidos y menor fertilidad⁽³⁰⁾. En un estudio reciente, encontramos que las bajas concentraciones de P₄ (con alta pulsatilidad de LH) durante la fase de crecimiento del folículo ovulatorio no sólo resulta en un folículo más grande, sino que genera un CL mayor y que produce más P₄⁽²⁹⁾.

Además, no hubo un efecto perjudicial no beneficioso sobre la tasa de preñez. Es decir, la competencia del ovocito permaneció sin cambios. En un segundo estudio, el ambiente de baja P₄ durante la fase de crecimiento del folículo ovulatorio compensó el efecto perjudicial de un proestro corto sobre la tasa de preñez⁽¹¹⁾.

Superestimulación ovárica

La superestimulación con FSH evita la dominancia de un folículo y promueve el crecimiento de varios folículos de la onda hasta un punto en que adquieren capacidad ovulatoria y generan un ovocito competente⁽²⁴⁾. La principal limitante es la variabilidad individual en la respuesta superestimuladora^(1, 22), que tiene un impacto negativo sobre el costo de los programas de producción *in vitro* de embriones. La variación en la respuesta superestimuladora tiene baja heredabilidad⁽³⁴⁾ y la alta variación individual puede ser atribuida a factores relacionados con condiciones reproductivas, sanitarias o nutricionales, y al tipo de gonadotrofina y duración de tratamiento⁽²⁴⁾. Se han probado muchas estrategias para minimizar la variabilidad en la respuesta a la superestimulación^(1, 8). Los principales determinantes de la respuesta son el número de folículos disponibles durante la emergencia de la onda⁽³²⁾ y el momento de inicio de los tratamientos en relación a la emergencia^(1, 26). Se logra mayor respuesta cuando el tratamiento se inicia al momento de la emergencia^(8, 26).

Los protocolos de superovulación actuales incluyen tres pasos principales: 1) sincronización de una nueva onda folicular, 2) inicio del protocolo de superestimulación el día de emergencia de la onda y 3) sincronización de la ovulación múltiple^(23, 24). Los tratamientos con estradiol o la ablación física del folículo dominante son comúnmente usados para sincronizar la nueva onda folicular^(6, 9, 25). El día que se estima la emergencia, se inicia el tratamiento con FSH, administrándola dos veces al día durante 4 o 5 días^(5, 24).

Intervalo entre la última dosis de FSH y la aspiración para manipular la competencia del ovocito

La competencia del ovocito puede ser manipulada variando el intervalo entre la última dosis de FSH y la aspiración^(7, 27, 33). La tasa de producción de blastocisto es mayor cuando el COC es obtenido luego de 48 hs de la última FSH comparado con las 24 y 72 hs⁽⁷⁾. Sin embargo, un período de 48 hs no fue beneficioso en *Bos indicus*⁽²⁸⁾. Cuando se compararon períodos de 20, 44, 68 y 92 hs⁽²⁷⁾, el óptimo fue de 44 a 68 hs (tasa de blastocisto de 71 y 63%, respectivamente). Un período mayor desde la última FSH resultó en pérdida de la competencia del ovocito. En otro estudio, un período de 144 hs resultó en pérdida de la capacidad ovulatoria en el 100% de los folículos desarrollados en un ambiente de baja P₄⁽²⁰⁾.

Tratamiento superestimulador más prolongado para aumentar la competencia del ovocito

Comparamos el efecto sobre la competencia del ovocito entre un tratamiento de superestimulación convencional de 4 días y un tratamiento de 7 días^(12, 13, 16). El protocolo de 7 días resultó en un marcado aumento en la respuesta ovulatoria^(12, 16). También resultó en una mayor proporción de ovocitos maduros⁽¹⁰⁾ y produjo una mayor proporción de COC expandidos y más embriones transferibles luego de la producción *in vitro* (5,6 vs 2,5 mórulas y blastocistos por vaquillona) comparado con el protocolo de 4 días⁽¹³⁾.

Agradecimientos

Los estudios presentados en esta revisión fueron sostenidos por recursos del *Natural Science and Engineering Council of Canada* y de *EmbryoGENE*.

Bibliografía

1. Adams, G.P., 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 41, 19-24.
2. Adams, G.P., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 17-32.
3. Adams, G.P., Matteri, R.L., Ginther, O.J., 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of reproduction and fertility* 96, 627-640.
4. Adams, G.P., Nasser, L.F., Bo, G.A., Garcia, A., Del Campo, M.R., Mapletoft, R.J., 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42, 1103-1113.
5. Baruselli, P.S., de Sa Filho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F., Barros, C.M., Bo, G.A., 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65, 77-88.
6. Bergfelt DR, Lightfoot KC, GP, A., 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided follicular ablation in heifers. *Theriogenology* 42, 895-907.
7. Blondin, P., Guilbault, L.A., Sirard, M.A., 1997. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology* 48, 803-813.
8. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ (1995) Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43: 31-40.
9. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ (1994) Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41: 1555-1569.
10. Dadarwal, D., Honparkhe, M., Alce, T., Dias, F.C.F., Lessard, C., Singh, J., 2012. Effect of follicular aging on the nuclear maturation and distribution of lipid droplets in bovine oocytes, 45th Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction, Pennsylvania, USA.
11. Dadarwal, D., Mapletoft, R.J., Adams, G.P., Pfeifer, L.F., Creelman, C., Singh, J., 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 79, 859-866.
12. Dias, F.C., Costa, E., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., Kastelic, J., Dochi, O., Singh, J., 2013a. Effect of duration of the growing phase of ovulatory follicles on oocyte competence in superstimulated cattle. *Reproduction, fertility, and development* 25, 523-530.
13. Dias, F.C., Dadarwal, D., Adams, G.P., Mrigank, H., Mapletoft, R.J., Singh, J., 2013b. Length of the follicular growing phase and oocyte competence in beef heifers. *Theriogenology* 79, 1177-1183 e1171.
14. Dias, F.C., Mapletoft, R.J., Kastelic, J.P., Adams, G.P., Colazo, M.G., Stover, B.C., Dochi, O., Singh, J., 2012. Effect of length of progesterone exposure during ovu-

- latory wave development on pregnancy rate. *Theriogenology* 77, 437-444.
15. Fortune, J.E., Rivera, G.M., Evans, A.C., Turzillo, A.M., 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 65, 648-654.
 16. Garcia Guerra, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J., Maplettoft, R.J., 2012. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 78, 353-360.
 17. Ginther, O.J., Beg, M.A., Donadeu, F.X., Bergfelt, D.R., 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 78, 239-257.
 18. Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A., Kot, K., 2001. Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. *Biol Reprod* 65, 345-350.
 19. Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sc* 20, 187-200.
 20. Jaiswal, R.S., Singh, J., Nagra, H.S., Grafton, T., Ratto, M.H., Malhi, P.S., Adams, G.P., 2006. Oocyte competence under different progestational environments. *Biology of Reproduction Special issue*, 109, Abstr#166.
 21. Kastelic, J.P., Knopf, L., Ginther, O.J., 1990. Effect of Day of Prostaglandin F-2-Alpha Treatment on Selection and Development of the Ovulatory Follicle in Heifers. *Animal reproduction science* 23, 169-180.
 22. Looney, C.R., 1986. Superovulation in beef females. , 5th Annual Convention of AETA, Fort Worth, Texas., pp. 16-29.
 23. Maplettoft, R.J., Bo, G.A., 2011. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 24, 278-283.
 24. Maplettoft, R.J., Steward, K.B., Adams, G.P., 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 42, 601-611.
 25. Martinez, M.F., Kastelic, J.P., Adams, G.P., Janzen, E., McCartney, D.H., Maplettoft, R.J., 2000. Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. *Can Vet J* 41, 786-790.
 26. Nasser L, Adams GP, Bo GA, Maplettoft RJ (1993) Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40: 713-724.
 27. Nivet, A.L., Bunel, A., Labrecque, R., Belanger, J., Vigneault, C., Blondin, P., Sirard, M.A., 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 143, 165-171.
 28. Nogueira, M.F., Buratini, J., Jr., Price, C.A., Castilho, A.C., Pinto, M.G., Barros, C.M., 2007. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH *in vitro*. *Molecular reproduction and development* 74, 680-686.
 29. Pfeifer, L.F., Maplettoft, R.J., Kastelic, J.P., Small, J.A., Adams, G.P., Dionello, N.J., Singh, J., 2009. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology* 72, 1237-1250.
 30. Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *JReprod Fertil*, 106:39-47.
 31. Salamone, D.F., Adams, G.P., Maplettoft, R.J., 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* 52, 549-561.
 32. Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227-243.
 33. Sirard, M.A., Picard, L., Dery, M., Coenen, K., Blondin, P., 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 51, 699-708.
 34. Tonhati, H., Lobo, R.B., Oliveira, H.N., 1999. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology* 51, 1151-1156.
 35. Vassena, R., Adams, G.P., Maplettoft, R.J., Pierson, R.A., Singh, J., 2003a. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. *Anim Reprod Sci* 76, 25-41.
 36. Vassena, R., Maplettoft, R.J., Allodi, S., Singh, J., Adams, G.P., 2003b. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60, 923-932.
 37. Yelich, J.V., Geisert, R.D., Schmitt, R.A.M., Morgan, G.L., McCam, J.P., 1997. Persistence of the dominant follicle during melengestrol acetate administration and its regression by exogenous estrogen treatment in beef cattle. *J anim sci Mar* 1997. v. 75, 745-754.

Rol de la progesterona en el diestro sobre la función endometrial y el desarrollo del concepto en bovinos

Lonergan, P.

School of Agriculture and Food Science, Belfield, Dublin 4, Ireland. E-mail: pat.lonergan@ucd.ie

Introducción

La progesterona (P₄) juega un papel clave en los eventos reproductivos asociados con el establecimiento y mantenimiento de la preñez. El crecimiento y desarrollo del conceptus requiere de la acción de la P₄ sobre el útero para regular la función endometrial, incluyendo interacciones conceptus-madre, reconocimiento de la preñez y receptividad uterina a la implantación. Una considerable proporción de las pérdidas embrionarias pueden ser atribuidas a concentraciones de progesterona circulante inadecuadas y la subsecuente disminución en la expresión génica endometrial y secreción histotrófica en la luz uterina. De hecho, las bajas concentraciones de P₄ han sido relacionadas como factor causal de baja preñez en vacas de alta producción⁽¹⁵⁾. Concentraciones elevadas de P₄ circulante en el período post-concepción inmediato han sido asociadas con un aumento en la elongación del conceptus^(13, 23, 45), un incremento en la producción de interferón-tau⁽³²⁾ y mayores tasas de preñez en bovinos y ovinos^(3, 34, 48). Esta revisión resume los datos recientes del rol de la P₄ en la regulación de la función uterina y el desarrollo embrionario en el bovino. El lector puede también consultar otras revisiones recientes sobre el tema^(27, 47, 30, 52, 53, 21).

Interacción entre el desarrollo embrionario y el oviducto

A pesar de la clara evidencia de una interacción entre el desarrollo del conceptus y el endometrio en la preñez temprana (ver abajo), la evidencia de un diálogo recíproco durante el pasaje del embrión a través del oviducto es menos claro. Los cambios temporarios que ocurren en la expresión génica del epitelio del oviducto durante el ciclo estral⁽⁵⁾ reflejan los cambios necesarios en el embrión. Hay fuerte evidencia de un efecto del oviducto sobre la calidad del embrión a temprana edad. Por ejemplo, un breve cultivo de cigotos producidos *in vitro* en oviductos de oveja^(16, 44), vaca⁽⁴⁹⁾ e incluso ratona^(42, 43) mostró mejorar la calidad embrionaria medida en términos de morfología, expresión génica, criotolerancia y tasa de preñez luego de la transferencia. Contrariamente, hay poca evidencia de un efecto en el sentido opuesto (embrión al oviducto). Los datos limitados del efecto de las gametas sobre el oviducto provienen de especies politocas, en las que puede amplificarse cualquier efecto^(2, 17, 29). Nosotros recientemente hemos caracterizado el transcriptoma del epitelio del oviducto bovino al inicio de la activación genómica embrio-

na en el día 3 post estro de preñez en vaquillonas cíclicas (Maillo y col., no publicado). Fueron comparados embriones de 8 células y ovocitos no fertilizados colectados de la región del istmo. Mientras que se observaron grandes diferencias en la expresión génica entre el istmo y la ampolla, los datos preliminares sugieren que la presencia de embriones de 8 células no tuvo efectos en el transcriptoma del istmo, aunque un efecto local en la posición específica del embrión no puede ser descartada.

Hugentobler y col. ⁽²⁶⁾ caracterizaron los efectos de cambios en la P₄ sistémica (logrados por infusión de P₄) sobre la composición de aminoácidos, iones y sustratos energéticos de fluidos del oviducto y útero en los días 3 y 6 respectivamente del ciclo estral bovino. La P₄ aumentó la glucosa uterina, disminuyó el sulfato de oviducto y, en menor grado, el sodio del oviducto, pero no tuvo efecto sobre los iones en el útero. El efecto más marcado de la P₄ fue en las concentraciones de aminoácidos en oviducto: 9 de 20 aminoácidos aumentaron después de la suplementación, y la glicina mostró el mayor incremento dos días después, mientras que en el útero aumentó solamente la valina.

Interdependencia del embrión y el tracto reproductivo

Hasta el estadio de blastocisto, el embrión es prácticamente autónomo (ej. no necesita contacto con el tracto reproductivo materno) evidenciado por el hecho que el blastocisto puede desarrollarse *in vitro* utilizando tecnología de FIV y luego ser transferido a una receptora sincronizada. Además, basado en la misma evidencia y al hecho que el embrión recuperado de donantes superovuladas son típicamente transferidos a receptoras vacías sincronizadas, el tracto reproductivo no necesita estar expuesto al embrión antes del día 7 (incluso hasta el día 16) ⁽⁹⁾ para mantener una preñez. En contraste, el embrión post-eclosión y el conceptus preimplantación son dependientes de las sustancias de la luz uterina, denominadas histotróficas, derivadas del endometrio, particularmente de las glándulas uterinas, para el crecimiento y desarrollo. Esto es demostrado por el hecho que: 1) no ocurre la elongación post-eclosión *in vitro* ^(1, 11) y 2= la ausencia de glándulas uterinas *in vivo* resulta en una falla de elongación del blastocisto ^(25, 46).

Desde el lado de la madre, la preparación del epitelio luminal uterino para la unión del trofoectodermo e implantación en todos los mamíferos estudiados, incluyendo rumiantes, involucra cuidadosos cambios espacio-temporales en la expresión génica en el endometrio. Tanto en animales cíclicos como preñados, ocurren cambios similares en la expresión génica del endometrio hasta el inicio de la elongación del conceptus (aproximadamente día 13), sugiriendo que los mecanismos por defecto en el útero están preparados para la preñez ⁽¹⁹⁾. Incluso, como se dijo, es posible transferir un embrión a un útero sincronizado 7 días después del celo y establecerse la preñez, como se hace rutinariamente en la transferencia embrionaria comercial de bovinos. Sólo en asociación con el reconocimiento materno de la preñez, que ocurre aproximadamente el día 16 en el bovino, hay cambios significativos detectables en el perfil del transcriptoma entre endometrios de vacas cíclicas y preñadas ^(6, 19), cuando el endometrio responde a un incremento de interferón-tau (IFNT) secretado por el conceptus filamentosos.

Efecto de la P₄ sobre el endometrio y sus consecuencias para el embrión

En los últimos años se han obtenido progresos significativos en clarificar el rol del ambiente materno, en particular el papel de la P₄ en el diestro, en el establecimiento de la preñez en el bovino. Nosotros hemos demostrado que:

- Ocurren cambios significativos en el transcriptoma endometrial, tanto durante el ciclo estral como en la preñez temprana ^(18, 19). Como fuera dicho, estos cambios ocurren independientemente del estado de la preñez hasta el momento de reconocimiento de la preñez, donde los cambios en la expresión génica endometrial inducida por el conceptus son detectables ^(7, 19).
- La P₄ elevada acelera los cambios temporales normales que ocurren en el transcriptoma endometrial ⁽¹⁹⁾ y en el momento de la disminución de los receptores de P₄ en el epitelio luminal ⁽⁴⁰⁾, consecuencia de lo cual se acelera la elongación del conceptus ⁽¹³⁾ que está asociada con una mayor sobrevivencia embrionaria.
- La combinación de la producción *in vitro* de embriones con las técnicas de transferencia *in vivo* han demostrado que el efecto de la P₄ sobre el conceptus está mediado exclusivamente vía endometrio ⁽¹⁴⁾. La adición de P₄ al medio de cultivo no tiene efecto en la formación del blastocisto ^(14, 28) o elongación luego de la transferencia a receptoras sincronizadas ⁽¹⁴⁾. Más recientemente, el embrión no necesita estar en el útero durante el período de elevación de P₄ para beneficiarse de ella, o que sugiere fuertemente el efecto de la P₄ vía endometrial y la composición modificada del histotrofo ⁽¹⁴⁾.
- La reducción de las concentraciones circulantes de P₄ resulta en una modificación en el transcriptoma endometrial y un retraso en el desarrollo embrionario ^(18, 21).
- La aspiración folicular justo antes de la ovulación resultó en una reducción en el tamaño del CL y de la producción de P₄, reducción en la expresión de LHCGR en tejido luteal y una capacidad uterina comprometida para soportar la elongación posterior a la transferencia de blastocistos producidos *in vitro* ⁽³⁶⁾.
- Una suplementación breve con P₄ mediante un PRID durante los días 3 y 5 puede ser capaz de "rescatar" embriones de pobre calidad (blastocistos con bajo número de células al momento de la transferencia) ⁽³⁷⁾.
- El efecto de la suplementación exógena con P₄ es prácticamente paradójico cuando es dado al comienzo del metaestro; a pesar del efecto positivo sobre el desarrollo del conceptus puede reducir la vida media del CL endógeno ⁽³⁸⁾. Esto puede superarse mediante la administración simultánea de un factor luteotrófico como hCG o eCG para proveer un soporte luteotrófico.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de un ambiente uterino óptimo para soportar con éxito el desarrollo del conceptus. Sin embargo, el papel del desarrollo del conceptus por sí mismo en ayudar a cambios temporales y espaciales apropiados en las funciones endometriales no debería ser subestimado. Por ejemplo, dos trabajos recientes proveen fuertes evidencias que el endometrio de la vaca reacciona en forma diferente dependiendo del tipo de embrión presente ^(7, 33). En otras palabras, embriones de distinta calidad (ej. con destino de desarrollo diferente) producen señales diferentes al endometrio y generan respuesta diferente en términos de transcriptoma endometrial. En este sentido, el endometrio puede ser considerado

como un sensor biológico que es capaz de ajustar su fisiología en respuesta a la presencia del embrión cuyo desarrollo será alterado después de la implantación ⁽³³⁾.

Estrategias para manipular la P₄ durante el diestro para mejorar la fertilidad

Los efectos beneficiosos de la suplementación exógena con P₄ sobre la fertilidad han sido reconocidos desde hace tiempo ^(27, 30, 52). A pesar de los efectos positivos de la administración de P₄ a través de dispositivos intravaginales sobre el desarrollo del conceptus ^(13, 14) estudios recientes sugieren que esto podría no ser trasladable a mejoras en las tasas de preñez ^(8, Parr y col. no publicado), posiblemente debido a los efectos potencialmente negativos sobre la vida del CL ⁽³⁶⁾. Hay evidencias que sugieren que la administración de P₄ al inicio del ciclo puede comprometer la función del CL, llevando a luteólisis y mortalidad embrionaria ^(12, 23, 24). Se requiere mayores estudios.

Se han utilizado varios tratamientos para aumentar las concentraciones periféricas de P₄ luego de la IA, incluyendo aquellos que 1) aumentan la función endógena de CL existente (ej. estrategias para promover el desarrollo del folículo dominante preovulatorio, resultando en un CL más grande, 2) inducir la formación de CL accesorio (ej. administración de hCG o GnRH), o 3) aquellos que suplementan con P₄ en forma directa (ej. dispositivos intravaginales o inyecciones). Sin embargo, los resultados en términos de tasas de preñez son contradictorios o no concluyentes, y pueden reflejar: I) momento del tratamiento, II) que solamente aquellos animales con baja P₄ puede ser beneficiados o III) falta de suficiente cantidad de animales y medios estadísticos potentes en muchos estudios.

El tamaño del folículo dominante es asociado con el tamaño del CL subsecuente ⁽⁵¹⁾. CL más grandes secretan más P₄, lo que en muchos estudios está asociado con mejores tasas de preñez. Por lo tanto las estrategias que promueven el crecimiento del folículo dominante previo a la ovulación y/o estimulan el desarrollo del CL podrían incrementar las tasas de preñez ⁽⁴⁾. La eCG ha sido incorporada en protocolos de sincronización en Sudamérica por algún tiempo, y se ha reportado que mejora las tasas de preñez luego de protocolos de IATF o TETF, aunque los resultados en vacas en lactancia han sido menos prometedores que los logrados en vaquillonas o vacas para carne ⁽¹⁰⁾.

La administración de hCG para provocar la ovulación del folículo dominante y formación de un CL accesorio se ha utilizado para mejorar las tasas de preñez, con resultados variables. Los datos fueron resumidos por Lonergan ⁽³⁰⁾. En un estudio reciente a gran escala, Nascimento y col. ⁽³⁵⁾ reportaron los resultados de dos análisis donde evaluaron los efectos del tratamiento con hCG post IA sobre la fertilidad de las vacas lecheras. El primer estudio utilizó un meta-análisis combinando los resultados de 10 publicaciones que emplearon tratamientos con hCG en los días 4 a 9 post IA en vacas lecheras. En resumen, la administración de hCG aumentó la preñez por IA (Preñez/IA) en 3% (34% (752/2.213) vs. 37% (808/2.184). En otro estudio realizado en vacas Holstein (n= 2.979) provenientes de 6 rodeos comerciales recibieron hCG o no en el día 5 post IA. Las preñeces por IA fueron mayores en las vacas tratadas con hCG (40,8%; 596/1.460) que en las control (37,3%; 566/1.519). Sorprendentemente, el efecto positivo de la hCG fue limitado a las vacas de primera lactancia.

Conclusiones

La P₄ es crítica en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Tiene un papel crucial en crear las condiciones uterinas óptimas en las cuales el embrión puede desarrollar, a través de las acciones sobre el endometrio, y en la composición de los fluidos de la luz uterina. Las estrategias para aumentar la P₄ en la fase luteal temprana han arrojado resultados variables en términos de mejora de las tasas de preñez. Esta variación en los resultados puede ser debida al tipo de animal tratado (vaquillonas, vacas lecheras en lactancia, vacas carniceras), las concentraciones endógenas de P₄ en los animales y el modo de lograr el aumento de P₄.

Agradecimientos

Los autores de los trabajos han sido apoyados por becas de la Fundación de Ciencia de Irlanda y Ceva Sante Animale.

Bibliografía

1. Alexopoulos NI, Vajta G, Maddox-Hyttel P, French AJ, Trounson AO. 2005. Stereomicroscopic and histological examination of bovine embryos following extended *in vitro* culture. *Reprod Fertil Dev*, 17:799-808.
2. Alminana C, Heath PR, Wilkinson S, Sanchez-Osorio J, Cuello C, Parrilla I, Gil MA, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Fazeli A. 2012. Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PLoS One*, 7:e33625.
3. Ashworth CJ, Sales DI, Wilmut I. 1989. Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fertil*, 87:23-32.
4. Baruselli PS, Ferreira RM, Filho MF, Nasser LF, Rodrigues CA, Bo GA. 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev*, 22:67-74.
5. Bauersachs S, Rehfeld S, Ulbrich SE, Mallok S, Prella K, Wenigerkind H, Einspanier R, Blum H, Wolf E. 2004. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol*, 32:449-466.
6. Bauersachs S, Ulbrich SE, Reichenbach HD, Reichenbach M, Buttner M, Meyer HH, Spencer TE, Minten M, Sax G, Winter G, Wolf E. 2012. Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biol Reprod*, 86:46.
7. Bauersachs S, Ulbrich SE, Zakhartchenko V, Minten M, Reichenbach M, Reichenbach HD, Blum H, Spencer TE, Wolf E. 2009. The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:5681-5686.
8. Beltman ME, Lonergan P, Diskin MG, Roche JF, Crowe MA. 2009. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology*, 71:1173-1179.
9. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GC, Mitchell D. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10–16 days after oestrus. *J Reprod Fertil*, 59:205-216.
10. Bo GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ. 2011. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod Fertil Dev*, 24:272-277.
11. Brandao DO, Maddox-Hyttel P, Lovendahl P, Rumpf R, Stringfellow D, Callesen H. 2004. Post hatching development: a novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. *Biol Reprod*, 71:2048-2055.
12. Burke CR, Mihm M, Macmillan KL & Roche JF 1994 Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the oestrous cycle in heifers. *Animal Reproduction Science* 35 27-39.

13. Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Kenny DA, Roche JF, Lonergan P. 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, 20:368-375.
14. Clemente M, De La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138:507-517.
15. Diskin MG, Morris DG. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim*, 43 Suppl 2:260-267.
16. Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54:659-673.
17. Fazeli A, Affara NA, Hubank M, Holt WV. 2004. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biol Reprod*, 71:60-65.
18. Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA. 2011a. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol Reprod*, 84:266-278.
19. Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. 2009. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod*, 81:784-794.
20. Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, Mcgettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P. 2011b. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod*, 85:144-156.
21. Forde N, Lonergan P. 2012. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *J Reprod Dev*, 58:189-195.
22. Forde N, Mehta JP, Minten M, Crowe MA, Roche JF, Spencer TE, Lonergan P. 2012. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. *Biol Reprod*, 87:124.
23. Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil*, 84:437-446.
24. Ginther OJ. 1970. Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *American Journal of Veterinary Research* 31 493-496.
25. Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. 2002. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*, 124:289-300.
26. Hugentobler SA, Sreenan JM, Humpherson PG, Leese HJ, Diskin MG, Morris DG. 2010. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and glucose substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reprod Fertil Dev*, 22:684-694.
27. Inskeep EK. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci*, 82 E-Suppl:E24-39.
28. Larson JE, Krisher RL, Lamb GC. 2011. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 23:311-318.
29. Lee KF, Yao YQ, Kwok KL, Xu JS, Yeung WS. 2002. Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochem Biophys Res Commun*, 292:564-570.
30. Lonergan P. 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76:1594-1601.
31. Maillou V, Rizos D, Besenfelder U, Havlicek V, Kelly AK, Garrett M, Lonergan P. 2012. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:3865-3876.
32. Mann GE, Lamming GE. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121:175-180.
33. Mansouri-Attia N, Sandra O, Aubert J, Degrelle S, Everts RE, Giraud-Delville C, Heyman Y, Galio L, Hue I, Yang X, Tian XC, Lewin HA, Renard JP. 2009. Endometrium as an early sensor of *in vitro* embryo manipulation technologies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:5687-5692.
34. McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM, Morris DG. 2006. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*, 65:1435-1441.
35. Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, Sartori R, Wiltbank MC. 2013. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 96:2873-2882.
36. O'Hara L, Scully S, Maillou-Sevilla V, Kelly AK, Duffy P, Carter F, Forde N, Rizos D, Lonergan P. 2012. Effect of follicular aspiration just prior to ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in single-ovulating beef heifers. *Reproduction Fertility and Development*, 24:155-155.
37. O'Hara L, Forde N, Kelly AK, Lonergan P. 2014a. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on Day 14: Can supplementary progesterone rescue small embryos? *Theriogenology* 81(8): 1123-1128.
38. O'Hara L, Forde N, Carter F, Rizos D, Maillou V, Ealy AD, Kelly AK, Rodriguez P, Isaka N, Evans ACO, Lonergan P. 2014b. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development* 26(2):328-36.
39. O'Hara L, Forde N, Duffy P, Randi F, Kelly AK, Valenza A, Rodriguez P, Lonergan P. 2014c. Effect of combined exogenous progesterone with luteotrophic support via equine chorionic gonadotrophin (eCG) on corpus luteum development, circulating progesterone concentrations and embryo development in cattle. *Reproduction Fertility and Development* (in press).
40. Okumu LA, Forde N, Fahey AG, Fitzpatrick E, Roche JF, Crowe MA, Lonergan P. 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction*.
41. Rizos D, Carter F, Besenfelder U, Havlicek V, Lonergan P. 2010a. Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 93:1022-1029.
42. Rizos D, Pintado B, De La Fuente J, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2007. Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol Reprod Dev*, 74:716-723.
43. Rizos D, Ramirez MA, Pintado B, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2010b. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, 73:777-785.
44. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, 61:234-248.
45. Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE. 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 75:289-296.
46. Spencer TE, Gray CA. 2006. Sheep uterine gland knockout (UGKO) model. *Methods Mol Med*, 121:85-94.
47. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmirini M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev*, 19:65-78.
48. Stronge AJ, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, 64:1212-1224.
49. Tesfaye D, Lonergan P, Hoelker M, Rings F, Nganvongpanit K, Havlicek V, Besenfelder U, Jennen D, Tholen E, Schellander K. 2007. Suppression of connexin 43 and E-cadherin transcripts in *in vitro* derived bovine embryos following culture *in vitro* or *in vivo* in the homologous bovine oviduct. *Mol Reprod Dev*, 74:978-988.
50. Van Cleeff J, Macmillan KL, Drost M, Lucy MC & Thatcher WW. 1996. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. *Theriogenology* 46 1117-1130.
51. Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56:307-314.
52. Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB. 2011. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24:238-243.
53. Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM, Baez GM, Diskin MG. 2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal* 4:1-12.