

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.

Superestimulación y producción *in vivo* e *in vitro* de embriones bovinos

Gabriel A. Bó ^(1, 2) y Reuben J. Mapletoft ⁽³⁾

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

(2) Instituto A. P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad de Villa María, Córdoba, Argentina.

(3) Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

Introducción

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 ^(9, 10) y el momento de la ovulación ^(5, 11) 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 a tiempo fijo (IATF) en donantes, sin necesidad de detectar celo. Sin embargo, el tratamiento más comúnmente utilizado para la sincronización de emergencia de la onda folicular para inducir la superovulación implica el uso de estradiol-17 β o uno de sus ésteres, que no pueden ser utilizados en muchos países debido a preocupaciones sobre los efectos de las hormonas esteroideas en la cadena alimentaria. El propósito de este trabajo es revisar los nuevos adelantos en materia de superovulación de ganado bovino con los productos farmacéuticos disponibles.

Tradicionalmente, los tratamientos de gonadotropina se iniciaban durante la fase lútea media, de aproximadamente 9 a 11 días después del celo (revisado en ^{9, 24}), cercano al tiempo de emergencia de la segunda onda folicular ⁽¹⁸⁾. 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 ⁽²⁸⁾. 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 todas las 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 ⁽²⁵⁾.

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 ⁽⁹⁾. 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 foliculo dominante por aspiración del foliculo guiada por ecografía e iniciar tratamientos superestimuladorios 1 o 2 días más tarde ⁽⁷⁾. 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.

Otra alternativa es el uso de la GnRH para inducir la ovulación del foliculo dominante ⁽²³⁾ que sería seguido por emergencia de la onda folicular 1 a 2 días más tarde ⁽²⁶⁾. 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 ^(26, 31). No es sorprendente que el tratamiento con GnRH en momentos al azar del ciclo estral, antes de iniciar tratamientos superestimuladorios, diera lugar a respuestas superovulatorias más bajas que los tratamientos iniciados después de la aspiración folicular o tratamiento con estradiol ⁽¹⁶⁾.

Más recientemente, 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⁽³⁷⁾, tomó vacas lecheras tratadas con progesterona (n= 411) 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⁽³²⁾, vacas lecheras donantes superestimuladas 60 horas después de la administración de GnRH (n= 245) produjeron un número similar de embriones transferibles que aquellas superestimuladas 4 días después de recibir estradiol (n= 691). Obviamente, deben llevarse a cabo estudios controlados con el uso de GnRH para validar estos resultados prometedores, pero es digno de mención que, en cada uno de estos informes de éxito, un dispositivo con progesterona se insertó al menos 2 días antes del tratamiento con GnRH y esto puede haber aumentado la probabilidad de un folículo respondedor en el momento del tratamiento.

La superovulación durante la primera onda folicular después de ovulación inducida por GnRH

Otra alternativa es inducir la ovulación e iniciar tratamientos superestimulatorios en el momento de emergencia de la primera onda folicular. La emergencia de la onda folicular es siempre en el momento de la ovulación⁽¹⁸⁾, y experimentos llevados a cabo en ganado bovino⁽²⁸⁾ y ovejas⁽²⁷⁾ han demostrado que es posible inducir la superovulación de folículos en la primera onda folicular. Adams y col.⁽³⁾ también informaron 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 superestimulatorios 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 y col.⁽²⁹⁾ 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.

Recientemente hemos llevado a cabo una serie de experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación en la primera onda folicular después de la ovulación inducida por GnRH con el uso de dispositivos de progesterona (revisado en¹²). 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⁽³¹⁾. 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. El protocolo se puede organizar fácilmente en un calendario tal como se ilustra en la Tabla 1. 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 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.

Tabla 1. Calendario de tratamiento para la superovulación en vacas donantes después de una ovulación inducida por GnRH. Las donantes reciben un dispositivo con progesterona y una PGF para inducir la formación de un folículo persistente y seguidamente GnRH 7 días más tarde (con el dispositivo con progesterona aún colocado). Treinta y seis horas después de la GnRH, se inicia la superestimulación con FSH dos veces por día durante 4 días, y se administra PGF con las dos últimas inyecciones de FSH; el dispositivo con progesterona se retira al momento de administrar la última inyección de FSH. Se induce la ovulación con GnRH 24 horas después de retirar el dispositivo con progesterona, las donantes son inseminadas a tiempo fijo (IATF) 12 y 24 horas más tarde y se realiza la colecta de huevos/embriones 7 días después de la IA:

Domingo	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado
		Dispositivo con progesterona y PGF				
		GnRH (AM)	Empezar FSH (PM)	FSH (AM y PM)	FSH (AM y PM)	FSH (AM y PM) PGF (PM)
FSH, Retirar progesterona PGF (AM)	GnRH (AM) IA (PM)	IA (AM)				
	Recolección de embriones					

Estimulación del desarrollo de los folículos subordinados

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⁽¹⁾. 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 por⁴). 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. Como la FSH exógena reemplaza los niveles endógenos deprimidos por los productos de secreción del folículo dominante, planteamos la hipótesis de que la presencia de un folículo dominante no tendría ningún efecto sobre la respuesta a la superovulación.

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⁽¹²⁾. 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 tendió a aumentar la respuesta a la superovulación en donantes de razas de carne⁽¹⁴⁾. Y en donantes de razas de carne que previamente habían producido un número de embriones no satisfactorios, el tratamiento previo con 500 UI de eCG produjo un aumento en el número de embriones logrados en comparación con los obtenidos sin eCG (citado en¹²). Se planteó la hipótesis de que la eCG reclutó folículos adicionales en la onda antes de iniciar los tratamientos de FSH.

Más recientemente, se ha investigado el efecto de prolongar el protocolo de tratamiento superestimulador tradicional de 4 días a 7 días con el fin de reclutar más folículos en la onda⁽¹⁷⁾. 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 superestimulador tradicionales de 4 días pueden no proporcionar un tiempo adecuado para que todos los folículos dentro de la cohorte adquieran la capacidad de ovular. Esto requiere más estudio.

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⁽²¹⁾, los protocolos tradicionales de tratamiento superestimulador consisten en aplicar dos inyecciones diarias de FSH hipofisaria, durante 4 ó 5 días⁽²⁵⁾. 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⁽³³⁾. 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⁽⁸⁾. Sin embargo, los resultados no eran repetibles en vacas Holando, que tenían menos tejido adiposo⁽¹⁹⁾. 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⁽²²⁾. 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⁽³⁴⁾. 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⁽³⁵⁾. Sin embargo, hyaluronan 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 en dos 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%, con el protocolo de inyección intramuscular dos veces al día durante 4 días en el ganado bovino⁽³⁶⁾. En general, el número de embriones transferibles no difirió entre los grupos de tratamiento (control: 4,0 ± 0,8; 1% hyaluronan: 5,0 ± 0,9; 0,5% hyaluronan: 6,1 ± 1,3). Se interpretó que los datos sugieren que, en el ganado bovino, la división de la dosis de FSH, ya sea en ácido hialurónico en dos inyecciones intramusculares con 48 horas de separación, o

con el protocolo de inyección intramuscular tradicional dos veces al día, darían lugar a una respuesta comparable en cuanto a la superovulación. Por otra parte, las soluciones menos concentradas de ácido hialurónico no eran difíciles de mezclar con FSH, incluso bajo condiciones de campo.

Estimulación 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, mientras que en nuestro país recién se está comenzado a trabajar comercialmente con esta tecnología. 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 cebuinos al ser comparados con animales taurinos, bajo los mismos protocolos ^(6, 15, 30).

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*). 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 (i.m.) 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 i.m. 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 prostaglandina F₂ alpha (PGF) en el día 4 y aquellas en los Grupos 1 y 3 recibieron también 800 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) i.m., los Grupos 2 y 4 recibieron 160 mg FSH 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 i.m. 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, Bioniche Animal Health) dada en una sola inyección i.m. 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.

Tratamiento	Total de Folículos Aspirados	COCs		Blastocitos	
		Total	Viables	BI	BI (G1)
Dosis Múltiples de FSH (n=31)	14,1 ± 1,0 ^b	8,5 ± 0,6 ^{ab}	5,5 ± 0,5 ^b	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3
Dosis Simple de FSH en MAP 5 (50 mg) (n=31)	13,3 ± 1,1 ^b	8,8 ± 0,8 ^b	5,7 ± 0,6 ^b	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3
Control (n=31)	8,5 ± 0,6 ^a	6,4 ± 0,7 ^a	3,7 ± 0,5 ^a	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2

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

Resumen y conclusiones

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 las granjas. 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 parecen tener como consecuencia el reclutamiento de folículos adicionales en la onda y 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*.

Agradecimientos

La investigación fue apoyada por el Instituto de Investigación de la Universidad Nacional de Villa María, el Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Bioniche Salud Animal, Belleville, ON y la Universidad de Saskatchewan.

Bibliografía

1. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ: Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94:177-188, 1992.
2. Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ: Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci* 30:259-271, 1993.
3. Adams GP, Nasser LF, Bó GA, García A, Del Campo MR, Mapletoft RJ: Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42:1103-1113, 1994.
4. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Mahli P: Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69:72-80, 2008.
5. Baruselli PS, Sá Filho M, Matins CM, Naser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA: Superovulation and embryo transfer in *Bos Indicus* cattle. *Theriogenology* 65: 77-88, 2006.
6. Baruselli PS, Sa Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF, Bo GA. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 47(Suppl. 4): 134-141, 2012.
7. Bergfelt DR, Bó GA, Mapletoft RJ, Adams GP: Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim Reprod Sci* 49:1-12, 1997.
8. Bó GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ: Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42:963-975, 1994.
9. Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ: Exogenous Control of Follicular Wave Emergence in Cattle. *Theriogenology* 43:31-40, 1995.
10. Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutiaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ: The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53-72, 2002.
11. Bó GA, Baruselli PS, Chesta P, Martins CM: The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65:89-101, 2006.
12. Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP: Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. *Theriogenology* 69: 81-87, 2008.
13. Bó GA, Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo H, Tribulo R, Rogan D, Mapletoft RJ: New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev* 22:106-112, 2010.
14. Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA: Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 53:495, 2000.
15. Dayan A, Watanabe MR, Watanabe YF. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* 28: 181-185, 2000.
16. Deyo CD, Colazo MG, Martinez MF, Mapletoft RJ: The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superovulation in cattle. *Theriogenology* 55:513, 2001.
17. García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ: Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 78:353-360, 2012.
18. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L: Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J Reprod Fertil* 87:223-230, 1989.
19. Hockley DK, Bó GA, Palasz AT, Del Campo MR, Mapletoft RJ: Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37:224, 1992.
20. Lane EA, Austin EJ, Crowe MA: Estrus synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim Reprod Sci* 109:1-16, 2008.
21. Laster DB: Disappearance of and uptake of 125I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil* 30: 407-415, 1972.
22. Lovie M, García A, Hackett A, Mapletoft RJ: The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Follitropin in Holstein cows. *Theriogenology* 41:241, 1994.
23. Macmillan KL, Thatcher WW: Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 45:883-889, 1991.
24. Mapletoft RJ, Bennett-Steward K, Adams GP: Recent Advances in the Superovulation of Cattle. *Reprod Nut Dev* 42:601-611, 2002.
25. Mapletoft Reuben J, Bó Gabriel A: The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 24:278-283, 2012.
26. 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* 57: 23-33, 1999.
27. Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E: Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58:1713-1721, 2002.
28. Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ: Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40:713-724, 1993.
29. Nasser, L.F., Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS: Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76: 320-327, 2011.
30. Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71: 690-697, 2009.
31. Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ: Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71:698-706, 2009.
32. Steel RG, Hasler JF: Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 21: 246, 2009.
33. Stoebel DP, Moberg GP: Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 65: 92-96, 1982.
34. Sutherland W: Biomaterials – Novel materials from biological sources. Ed. By Byrom, D- Published by Stockton Press, 1991, pp. 307-333.
35. Tribulo Andres, Rogan Dragan, Tribulo Humberto, Tribulo Richardo, Alasino Roxana V, Baltrano Dante, Bianco Ismael, Mapletoft Reuben J, Bó Gabriel A: Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Follitropin-V. *Anim Reprod Sci* 129:7-13, 2011.
36. Tribulo Andres, Rogan Dragan, Tribulo Humberto, Tribulo Richardo, Mapletoft Reuben J, Bó Gabriel A: Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Follitropin-V in two different concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 77:1679-1685, 2012.
37. Wock JM, Lyle LM, Hockett ME: Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superovulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod Fertil Dev* 20:228, 2008.

Uso de ultrasonografía Doppler del conceptus en la reproducción de equinos y bovinos

Silva, L.A.

Laboratory of Theriogenology Dr. O. J. Ginther, Department of Veterinary Medicine, School of Animal and Food Sciences, University of Sao Paulo – Pirssununga – Brazil.

El tracto reproductivo de los mamíferos experimenta continuos cambios cíclicos, con modificaciones en sus tejidos a lo largo de la vida reproductiva. Estos cambios reflejan los eventos rítmicos que ocurren en el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, con acciones sobre el tracto reproductivo controlado por esteroides ováricos. Durante estos cambios, se forman estructuras completas o capas de tejidos, que alcanzan madurez funcional y luego de una vida corta (días) gradualmente declinan su funcionalidad, y en algunos casos, desaparecen por completo. Sin embargo, durante la preñez, este control cíclico es interrumpido y comienza un proceso de remodelación prolongado. Durante la preñez, el conceptus tiene el rol central en la modulación de los cambios morfológicos y vasculares del tracto reproductivo. Se sabe que la angiogénesis es crítica para asegurar el aporte sanguíneo a los tejidos en crecimiento y remodelación. Durante la gestación, el proceso angiogénico modifica su rol primario de aporte sanguíneo local para el desarrollo tisular, a otro, más importante, que es formar un sistema vascular complejo entre la madre y el conceptus: la placenta. Nuestra investigación se concentró en el estudio de los cambios vasculares y estructurales del tracto reproductivo en los grandes animales. Recurrimos a una técnica no invasiva, la ultrasonografía, para estudiar los cambios morfológicos de órganos y tejidos y a nivel del flujo sanguíneo, respectivamente, ultrasonografía modo B y modo Doppler, en una serie de trabajos experimentales en yeguas y vacas.

Específicamente en yeguas, el conceptus es una vesícula esférica en la fase intrauterina móvil, seguido por una etapa fija o localizada. Esta especie permite fácilmente introducir sustancias en la luz uterina, o la inyección y aspiración de microalícuotas de fluido vitelino, y permite coleccionar biopsias endometriales. La opción de la vía transrectal para el examen reproductivo y el tamaño de los órganos en los grandes animales facilita el contacto íntimo entre la sonda del ecógrafo con cualquier parte del aparato genital, favoreciendo la obtención de imágenes detalladas. Otra ventaja de los modelos experimentales en grandes animales, comparado con los modelos de animales de laboratorio, es la posibilidad de coleccionar datos del tracto reproductivo de manera no invasiva y secuencial en el tiempo.

Nuestros estudios fueron los primeros que se hicieron empleando ultrasonografía Doppler color para medir el flujo sanguíneo en el útero de yeguas y de vacas. A pesar de la subjetividad de la evaluación con Doppler-color durante las evaluaciones reproductivas, demostramos en cuatro experimentos con el uso de métodos de validación, que es una técnica confiable y precisa para detectar pequeñas variaciones en el flujo sanguíneo.

La detección de un indicador temprano como es la orientación de la vesícula embrionaria en la yegua, que consiste en una mancha en el endometrio cerca de la pared del polo embrionario, es un buen ejemplo de la sensibilidad de la técnica ⁽¹⁾. Basado en este indicador temprano, fue posible mapear la posición del disco embrionario desde el día de fijación de la vesícula hasta la visualización del embrión mismo.

El disco embrionario representa un área de desarrollo muy activa y el sistema vascular es el primer sistema de órganos formado durante la embriogénesis. Deberían realizarse estudios más detallados para identificar el origen exacto de este indicador temprano o de las señales Doppler observadas en nuestro estudio. Podría reflejar un flujo sanguíneo endometrial estimulado por factores embrionarios que estimulan los vasos en esta área de íntimo contacto a través de una acción parácrina. Otra posibilidad es que el indicador temprano sea generado por las contracciones de las células del músculo cardíaco en el disco embrionario, incluso antes de su organización como un corazón. La ultrasonografía Doppler detecta las señales producidas por estructuras en movimiento. La contracción de las células cardíacas embrionarias interactuando con los tejidos en la zona inmediata parece ser suficientemente fuerte para crear movimientos de tejidos que producen los ecos Doppler observados.

En las yeguas, los cambios transitorios en la vascularidad endometrial son acompañados por cambios en la localización del conceptus durante la fase de movilidad y continúan en presencia del conceptus en el mismo cuerno (7 minutos promedio) estimulado por un incremento en la vascularidad. Después de la fijación, la vascularidad endometrial fue mayor en el endometrio circundante al conceptus fijado, más que en otras áreas del cuerno ipsilateral, o en el cuerno opuesto ⁽²⁾. Un adelgazamiento diferencial en dorsal del endometrio precede la orientación embrionaria ⁽¹⁾. Basado en nuestros estudios realizados para medir el flujo sanguíneo uterino durante la preñez temprana en yeguas y en vacas con Doppler color y en estudios previos, en los cuales los autores emplearon otras técnicas para medir el flujo sanguíneo uterino en vacas, cerdas y ovejas, los équidos exhibieron un incremento más precoz en la perfusión uterina durante la preñez temprana ⁽²⁾. Los cambios en el flujo uterino comenzaron a ser detectados en el día 12 de gestación ⁽²⁾. Dos mecanismos diferentes podían estimular el incremento de la perfusión uterina durante la preñez temprana en la yegua y esos dos mecanismos probablemente estén relacionados con dos fases distintas de la preñez temprana en equinos. La fase de movilidad y la fase post-fijación de la vesícula embrionaria. Sugerimos que la vesícula embrionaria podría estimular la vasodilatación y angiogénesis en el endometrio. Estos dos procesos están probablemente combinados. Sin embargo, durante la fase de movilidad, se observa un rápido cambio de transición en el flujo sanguíneo relacionado con la localización de la vesícula embrionaria en el útero. Se detectó una leve invasión del endometrio dorsal los últimos días del período de movilidad ⁽¹⁾. Estos resultados sugieren que los cambios rápidos en el flujo uterino reflejan una vasodilatación en el endometrio. Son necesarios mayores estudios para determinar qué factores provocan esta clase de estimulación. La vesícula produce grandes cantidades de estrógenos y prostaglandinas en este momento, y estas hormonas podrían estar involucradas con los mecanismos de vasodilatación. Además, la interacción físico-química de la cápsula de la vesícula embrionaria con el epitelio luminal durante el movimiento del conceptus podría ser considerado como un posible factor de estimulación. La angiogénesis parecería estar presente hasta el final de la fase de movilidad, basado en la invasión endometrial y el ligero incremento de la perfusión observada en este momento. Esta idea fue reforzada por estudios morfométricos posteriores que demos-

traron un incremento en el crecimiento de los vasos, así como un aumento de los factores angiogénicos, en el endometrio adyacente al conceptus fijado⁽³⁾. Después de la fijación se produce un aumento del flujo sanguíneo y una invasión en dorsal del endometrio. Presumiblemente, la mayoría de los factores vasculares estimulantes producidos por la vesícula embrionaria están altamente localizados en el sitio de fijación.

Nuestros estudios sugieren que, mientras ocurre una presumible vasodilatación en la fase de movilidad, el estímulo angiogénico predominante ocurre post-fijación. Se estudió la morfología del endometrio en el sitio de fijación así como la participación del sistema de receptores VEGF en la remodelación del tejido requerida para estimular la invasión del endometrio dorsal en el conceptus. El endometrio dorsal en el sitio de fijación del conceptus estaba edematoso y altamente vascularizado, exhibiendo una alta densidad de vasos y glándulas endometriales⁽³⁾. Se necesitan estudios más detallados para identificar las señales específicas que son producidas y liberadas por el conceptus para estimular la angiogénesis.

La orientación de la vesícula embrionaria ocurre inmediatamente después de la fijación. Una desorientación de la vesícula fue asociada con un útero flácido y una invasión defectuosa del endometrio dorsal. Un aumento asimétrico del saco alantoideo corrigió espontáneamente la desorientación. Fueron encontrados puntos de adherencia entre la superficie del saco vitelino y el endometrio dorsal⁽⁴⁾. Estos nuevos hallazgos muestran paso a paso las dinámicas interacciones entre la vesícula embrionaria y la pared uterina con el propósito de alinear el futuro sitio de formación del cordón umbilical con el área más vascularizada, dorsal del endometrio y mesometrio. La orientación del disco embrionario en el área ventral del endometrio permite un contacto directo de la capa bilaminar del saco vitelino en el polo embrionario con la zona más rica en glándulas y más vascularizada del endometrio. Esta posición favorece el intercambio embrio-materno garantizando la supervivencia y desarrollo del conceptus temprano. Es interesante observar en équidos que el embrión propiamente se forma ventralmente pero durante el desarrollo del alantoides es translocado al área dorsal, el área endometrial más rica. En esta posición se desarrolla el cordón umbilical. Observamos que una orientación anormal generalmente termina con la preñez, pero en dos casos específicos se posibilitó la formación del cordón umbilical en una posición correcta: cuando el útero presenta un tono ligero y cuando las vesículas embrionarias fueron capaces de corregir su orientación por una continua expansión el límite saco vitelino-alantoides hasta incidir sobre el endometrio dorsal⁽⁴⁾. Los puntos de adherencia en la superficie del conceptus, específicamente la capa bilaminar del saco vitelino, son importantes para mantener la orientación del conceptus. Estudios de la composición de la cápsula equina han demostrado cambios en los carbohidratos durante la preñez temprana. Sin embargo, la visualización de los puntos de adherencia en la superficie del saco vitelino ofrece áreas más específicas para el estudio de interacciones bioquímicas entre la superficie de la cápsula y el epitelio endometrial.

La vascularidad uterina en vaquillonas preñadas aumentó en el cuerno ipsilateral al conceptus entre los días 19 y 40. La vascularidad del cuerno contralateral permanece baja hasta el día 32, en que comienza a aumentar, alcanzando una vascularidad similar al cuerno ipsilateral alrededor de día 40⁽⁵⁾. Ocurre un incremento temporario de la vascularidad con el desarrollo del saco alantoideo en cada cuerno. El conceptus de los rumiantes no tiene una fase de movilidad como en los équidos, pero sufre una elongación dentro del lumen uterino en la preñez temprana. La elongación del conceptus es un proceso de desarrollo importante para el reconocimiento materno de la preñez, y puede servir para una mayor disponibilidad de nutrientes. Hay diferencias en los cambios vasculares uterinos tempranos en yeguas y en vacas. A pesar del retraso en la estimulación de la perfusión uterina en las vacas, comparado con las yeguas, hay una íntima asociación temporal entre el incremento de la perfusión vascular endometrial y el desarrollo del saco alantoideo. A medida que el saco alantoideo se desarrolla, se une con el corion, formando el alantocorion. Nuestros resultados indican que el aumento de la perfusión endometrial coincide con posibles interacciones físico-químicas entre el conceptus y el endometrio. Son necesarios estudios con mayores detalles morfológicos y moleculares para correlacionar el desarrollo vascular endometrial con el proceso de placentación en vacas.

Actualmente, nuestros estudios están enfocados en las interacciones entre el conceptus bovino originado por clonación por transferencia nuclear y el útero (datos no publicados). La clonación en bovinos, a pesar de todos sus beneficios, es extremadamente ineficiente. La bibliografía describe que el nacimiento de una cría viva representa el 7 al 10% de los blastocistos transferidos. Las pérdidas de preñez después de la transferencia es una causa importante de pérdidas económicas en clonación. Aproximadamente el 70% de los embriones transferidos se pierden entre la transferencia y el día 30 de preñez. Entre los días 30 y 60, solamente el 60% de las preñeces mantenidas en el día 30. Después del día 60, las pérdidas fetales ocurren a tasas muy inferiores (5-10%). Estudios morfológicos a partir de fetos describieron trastornos relacionados con el desarrollo placentario y consecuentemente, con desórdenes vasculares. Nuestros resultados preliminares están basados en ultrasonografía Doppler para evaluar la perfusión uterina de 15 vacas preñadas con embriones de clonación. La perfusión endometrial no difirió entre los cuernos ipsi y contralateral y el aumento comenzó en el día 23 de preñez. Un patrón similar fue detectado en el mesometrio. Otras tres receptoras presentaron membranas fetales sin embrión. La perfusión uterina de estos animales fue similar a la del grupo de vacas preñadas hasta el día 29, y luego comenzó a disminuir. Comparado con preñeces normales⁽⁵⁾, estos datos indican un retraso en la estimulación de la perfusión vascular uterina en preñeces con conceptus clonados. Hemos hipotetizado que la transición de placenta coriovitelina a alantocoriónica es un período crítico para la supervivencia del conceptus de clon. Nuestro programa de clonación comenzó hace un año, con 236 receptoras sincronizadas para transferir a tiempo fijo. La tasa de sincronización fue 62,7% (148/236). Ciento veintiséis embriones clonados por transferencia nuclear fueron transferidos a receptoras. La tasa de preñez al día 25 fue 11,9% (15/126). Se observó 1 pérdida de preñez (1/15) hasta el día 30. Sin embargo, 4 preñeces se perdieron entre los días 30 y 40 (42,9%; 4/14) y 4 entre los días 50 y 60 (50%; 4/8). Esos datos preliminares confirman la baja eficiencia de la clonación en bovinos reportada en la bibliografía. Los números experimentales son aún pequeños, pero los datos muestran que el período más crítico para el desarrollo del conceptus es entre la transferencia embrionaria y la primera detección de preñez. Un evento importante es el reconocimiento materno de la preñez. Además, nuestra hipótesis que la transición de placenta coriovitelina a alantocoriónica es un período crítico para el conceptus de clon fue confirmada.

La modulación del sistema vascular uterino por el conceptus incluye dos eventos distintos y balanceados. El primer evento consiste en la estimulación de cambios en la estructura y sistema vascular. Desde los primeros estadios hasta la culminación, el

conceptus probablemente libere factores que provoquen cambios tisulares en el útero, incluyendo remodelación vascular, para favorecer la sobrevivida y el desarrollo. Sin embargo, igualmente importante es la necesidad de limitar estos cambios uterinos para prevenir sobrecrecimiento. Este puede ser el caso del síndrome de descendencia grande, por ejemplo, cuando se detectan anomalías en la vascularización de la placenta. Nuestros estudios también se enfocaron en comprender aspectos celulares y moleculares involucrados con los cambios uterinos durante la preñez temprana.

Surgen muchas preguntas, tales como si el tejido y la remodelación vascular durante la preñez es autolimitado o si este proceso está mediado por factores producidos por el conceptus. Los procesos implicados en la remodelación del tejido del útero preñado y en condiciones anormales de crecimiento de tejido, como el cáncer, son aparentemente similares. Sin embargo, durante la preñez, el crecimiento de tejidos es limitado o controlado, en contraste con condiciones patológicas como el cáncer. Estos pensamientos crean el marco para una investigación más completa en el futuro. El conocimiento de los mecanismos que regulan la remodelación de tejidos y la angiogénesis durante la preñez representaría un enorme avance en la ciencia. La comprensión de los mecanismos que regulan la angiogénesis y la remodelación de tejidos en el tracto reproductivo gestante ayudará en el desarrollo de terapias para las condiciones patológicas con un crecimiento anormal de tejido.

En resumen, nuestros estudios proporcionaron una idea de los cambios estructurales y moleculares en el tracto reproductivo de équidos y bóvidos. Estos resultados establecen el escenario para futuros experimentos para comprender de forma más completa: 1) el papel del conceptus en la regulación del ambiente uterino para favorecer su desarrollo, incluyendo la comprensión en el balance entre la estimulación y la inhibición de los cambios estructurales y vasculares uterinos, 2) el papel de los cambios vasculares en la regulación de los procesos fisiológicos en el tracto reproductivo durante la ciclicidad y la preñez, y 3) el papel de los cambios en el flujo sanguíneo como una herramienta práctica de diagnóstico de la funcionalidad del órgano y tejido.

Bibliografía

1. Silva, L.A., Ginther, O.J. 2006 An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. *Biol Reprod* 74 337-343.
2. Silva, L.A., Gastal, E.L., Beg, M.A., Ginther, O.J. 2005 Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biol Reprod* 72 755-761.
3. Silva, L.A., Klein, C., Ealy, A.D., Sharp, D.C. 2011. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction* 142 593-603.
4. Ginther, O.J., Silva, L.A. 2006 Incidence and nature of disorientation of the embryo proper and spontaneous correction in mares. *J Equi Vet Sci* 26 249-256.
5. Silva, L.A., Ginther, O.J. 2010. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction* 139 453-463.



¡OPORTUNIDAD!

LIQUIDACIÓN DE STOCK

SEMEN TOROS DE GENÉTICA SUPERIOR

RAZAS Angus negro y colorado, P. Hereford, Shorthorn, Limousin, Charolais, Simmental, Tull, etc.
Genética en su mayoría Canadiense, también de EE.UU., Nueva Zelandia y Australia.

Consultas: Mariano Eicheverry. moetcheverry@hotmail.com