

Nuevos conceptos para disminuir las pérdidas gestacionales en bovinos de carne

Pohler, Ky G.1*, Sydney T. Reese1, Gessica A. Franco1, Ramiro V. Oliveira Filho1, Rafael Paiva1, Lohana Fernandez1, Gabriela de Melo1, J.L.M. Vasconcelos2, Reinaldo Cooke1 and Rebecca K. Poole1 1Departamento de Ciencia Animal, Preñez y Programación del Desarrollo Área de Excelencia, Texas A&M University, College Station, TX, Estados Unidos 2Departamento de Producción Animal, Universidad Estatal de São Paulo, Botucatu, Brasil 18168-000 * Autor para correspondencia: Ky G. Pohler, Departamento de Ciencia Animal, Texas A&M University, College Station, TX 77843, EE.UU., Tel: +1 979 - 458-4476; correo electrónico: kpohler@tamu.edu

Ponencia presentada durante el 14 Simposio Internacional de Reproducción Animal.

Instituto Reproducción Animal Córdoba – IRAC- Argentina 2022



Fotografía cortesía: Beefmaster Agroaméricas.

La mortalidad embrionaria y la pérdida de la preñez siguen siendo problemas importantes en la producción ganadera nacional. En el ganado de carne y lechero, se ha informado que la ineficiencia reproductiva cuesta a los productores mundiales más de 1.000 millones de dólares anuales (USDA, 2009, 2010). Si bien la investigación y nuestra comprensión han aumentado marcadamente en torno al área de falla reproductiva, mortalidad embrionaria y pérdida de la preñez, nos hemos visto limitados por la incapacidad de determinar con precisión el momento y la viabilidad de los embriones/fetos *in vivo*, específicamente durante la gestación temprana.

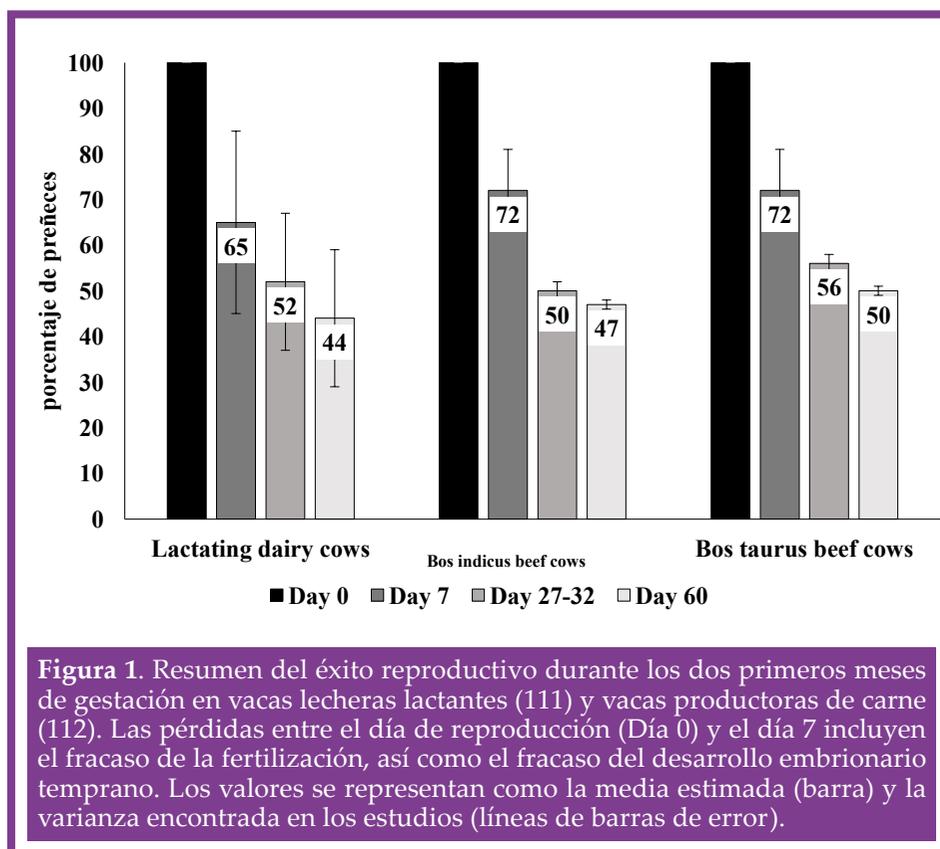
En los últimos 4 años, se han realizado dos revisiones sistemáticas en ganado de producción de carne y de leche que resumen los períodos críticos de pérdida de preñez identificados por la tecnología actualmente disponible para determinar la presencia embrionaria/fetal (Wiltbank *et al.*, 2016; Reese *et al.*, 2020); resumido en la Figura 1.

El momento de la mortalidad embrionaria y fetal en el ganado bovino puede variar sustancialmente en función del estado de producción, la composición genética, el entorno y las condiciones de manejo. Tanto el ganado de producción de carne como de leche tienen tasas de fertilización relativamente altas, y la mayoría de los embriones siguen siendo viables 7 días después de la inseminación. En el día 7, 70 -75% de las hembras de razas productoras de carne y ~ 65 -70% de las hembras productoras de leche que se inseminan artificialmente (IA) después de la expresión de estro o se inseminan a tiempo fijo (IATF) tendrán un blastocisto en desarrollo (Wiltbank *et al.*, 2016; Reese *et al.*, 2020). A pesar de estos porcentajes relativamente altos, las tasas de fertilización se ven afectadas negativamente a menudo por los gametos de mala calidad, especialmente el semen de baja calidad debido a la infertilidad del padre o el manejo inadecuado del semen. Los animales que no logran establecer la preñez durante este período inicial

son difíciles de detectar, ya que parecen ciclar normalmente.

Desafortunadamente, la extracción del tracto reproductor en frigorífico es una de las únicas formas precisas de determinar la presencia embrionaria durante este período de tiempo y está limitado por el costo, la necesidad de sacrificio animal y el éxito desconocido del embrión a través de etapas posteriores de desarrollo. Las próximas 3 semanas de desarrollo son fundamentales para el establecimiento exitoso de la preñez. El ambiente uterino es crítico ya que el embrión baja desde el oviducto hasta el sitio de implantación. La asincronía entre el útero y el embrión puede ser problemática, ya que el ambiente uterino no “esperará” a un embrión, aunque un embrión puede acelerar o desacelerar su desarrollo en cierto grado (Pope, 1988). Históricamente, se creía que el reconocimiento materno del fracaso de la preñez representaba un porcentaje significativo de las pérdidas de preñez (Diskin and Sreenan, 1980; Roche *et al.*, 1981).

Las investigaciones indican que el ganado lechero de alta producción es especialmente susceptible a la pérdida de la preñez durante este período (Lucy, 2001; Wiltbank *et al.*, 2016). Sin el mantenimiento del cuerpo lúteo (CL) y los niveles sostenidos de progesterona (P4) como resultado de la secreción de interferón-tau (IFNT), se produce luteólisis y la preñez no puede continuar (Mann and Lamming, 1999). La preñez durante este período de tiempo puede determinarse indirectamente por la presencia de genes estimulados por interferón (ISG), este método desafortunadamente tiene altos niveles de falsos positivos (Green *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2020a). En el ganado lechero, la pérdida de preñez entre los días 19 y 27 se informa como aproximadamente 20% (Wiltbank *et al.*, 2016) mientras que en los vacunos productores de carne es de aproximadamente 15% entre los días 16 y 32 (Reese *et al.*, 2020). La detección del ritmo cardíaco embrionario entre los días 28 y 32 de gestación implica el final del período embrionario temprano y la transición



al desarrollo embrionario tardío. Durante el primer mes de gestación, la mortalidad embrionaria o la pérdida de la preñez afecta del 44 al 50% de las preñeces tanto en ganado productor de carne como de leche (Wiltbank et al., 2016; Reese et al., 2020). Curiosamente, en el ganado productor de carne, las vacas con influencia de *Bos indicus* (al menos 3/8 de *Bos indicus*) parecen sufrir un aumento del fracaso reproductivo durante este período de desarrollo (Reese et al., 2020).

La mortalidad embrionaria tardía y la mortalidad fetal precoz constituyen un pequeño porcentaje de las pérdidas de preñeces generales; sin embargo, debido a las prácticas de manejo, muchas pasan desapercibidas y resultan en mayores pérdidas económicas. Se estima que la mortalidad embrionaria tardía afecta del 5 al 8% de las preñeces de ganado productor de carne, mientras que más del 15% de las preñeces del ganado lechero pueden interrumpirse durante este período (Wiltbank et al., 2016; Reese et al., 2020). Las causas de la mortalidad embrionaria tardía se entienden menos ya que la investigación se ha centrado principalmente en examinar los factores que contribuyen a la pérdida embrionaria temprana. Durante el desarrollo embrionario tardío, se produce la formación del placentoma característico y la expansión exponencial de la placenta (Assis Neto et al., 2010). Las deficiencias en el crecimiento o la

función de la placenta pueden tener graves consecuencias y pueden ser un factor ignorado que provoca pérdidas de preñez.

Simplemente saber cuándo ocurre la pérdida de la preñez o la mortalidad embrionaria es solo una parte de la historia. Desde una perspectiva científica, la capacidad de comprender y determinar las causas de las pérdidas es fundamental para desarrollar la tecnología necesaria para superarlas y prevenirlas. Por lo tanto, existe una necesidad crítica de desarrollar una prueba de preñez ideal o una serie de pruebas para determinar la presencia de un embrión y su viabilidad potencial.

Desde el punto de vista de la producción, una prueba de preñez ideal debe tener alta sensibilidad (*es decir, identificar correctamente a los animales preñados*), alta especificidad (*es decir, identificar correctamente a los animales no preñados*) y ser simple y barata de realizar en condiciones de campo. Para fines científicos, las pruebas que miden la viabilidad embrionaria o fetal son importantes para seguir investigando en esta área. Actualmente, existen tres categorías de pruebas de detección embrionaria o de preñez: las pruebas manuales, las pruebas químicas específicas de la preñez y las pruebas químicas no específicas de la preñez. Los métodos manuales utilizan la palpación física o la visualización para identificar a los animales

preñados. Las pruebas específicas de la preñez o específicas del embrión utilizan marcadores que son producidos directamente por el concepto o que se desarrollan durante la preñez, mientras que las pruebas específicas no relacionadas con la preñez se basan en mediciones indirectas. Además, es importante evaluar las contribuciones de los padres (*maternos y paternos*) a la probabilidad de pérdida de la preñez a lo largo del desarrollo embrionario. El propósito de esta revisión es resaltar diferentes métodos para apuntar o reducir el fracaso reproductivo en el ganado; resumido en la Figura 2.

Métodos de detección manual

Palpación rectal y ultrasonografía

A medida que el concepto se desarrolla durante la gestación temprana, el líquido se acumula dentro de las cavidades alantoideas y amnióticas, lo que hace que la palpación rectal sea un método común de diagnóstico de preñez en el ganado. Los técnicos experimentados pueden detectar la preñez desde el día 30 al 35 de la gestación por palpación de la vesícula amniótica (Roberts, 1956; Momont, 1990); sin embargo, este método de diagnóstico de la preñez se utiliza con mayor precisión 40 a 60 días después de la inseminación cuando hay una mayor acumulación de líquido y para evitar perforar la vesícula amniótica y poner

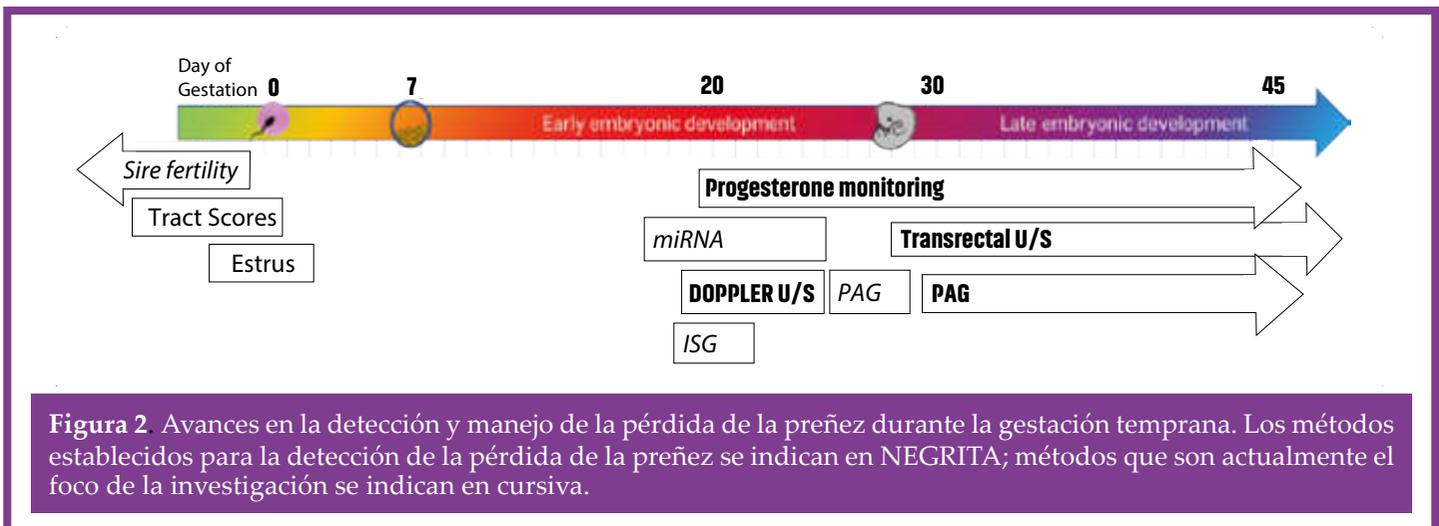


Figura 2. Avances en la detección y manejo de la pérdida de la preñez durante la gestación temprana. Los métodos establecidos para la detección de la pérdida de la preñez se indican en **NEGRITA**; métodos que son actualmente el foco de la investigación se indican en *cursiva*.

fin a la preñez (*Ball and Carroll, 1963*). Si bien la palpación rectal es confiable y un método industrial ampliamente aceptado para el diagnóstico de la preñez, es difícil evaluar la viabilidad embrionaria y/o detectar la pérdida de la preñez con esta técnica. La ecografía transrectal (US) permite la detección temprana de la preñez, desde el día 26 al 29 de la gestación, y la evaluación morfológica del útero, los ovarios y la viabilidad embrionaria/ fetal en tiempo real (a través de la detección de latidos cardíacos) en el ganado (*Pierson and Ginther, 1984; Curran et al., 1986; Kastelic et al., 1988; Beal et al., 1992*). Debido a la capacidad de visualizar la preñez, la ecografía se considera el estándar de oro del diagnóstico de preñez con una precisión cercana al 100% cuando es realizada por técnicos experimentados (*Romano et al., 2006*). Con respecto a la detección de la pérdida de la preñez, la mortalidad embrionaria espontánea que ocurre entre los días 24 y 40 de la gestación se puede diagnosticar a través de ecografía por la ausencia de un latido cardíaco, desprendimiento de placenta o volumen reducido de líquido placentario (*Pierson and Ginther, 1984; Curran et al., 1986; Kastelic et al., 1988*).

La ecografía tridimensional/cuatri-dimensional (3D/4D) se ha utilizado ampliamente en medicina humana para visualizar la preñez y evaluar la viabilidad del feto en desarrollo (*Hata et al., 1997*). Actualmente, la adopción de esta tecnología para su uso en animales grandes es limitada debido a los altos costos del equipo necesario y las dificultades operativas. Durante el desarrollo embrionario temprano, el embrión bovino carece de definición para capturar adecuadamente una imagen 3D/4D. Para el día 45 de la gestación, el desarrollo de estructuras anatómicas (por ejemplo, cabeza, cuerpo, patas; *Kahn, 1989*) es suficiente para capturar una imagen 3D/4D (*Figura 3*); sin embargo, el feto debe estar adecuadamente orientado dentro del útero y, por lo tanto, requiere habilidades técnicas avanzadas. Dado que la mortalidad fetal (\geq día 45 de gestación) representa

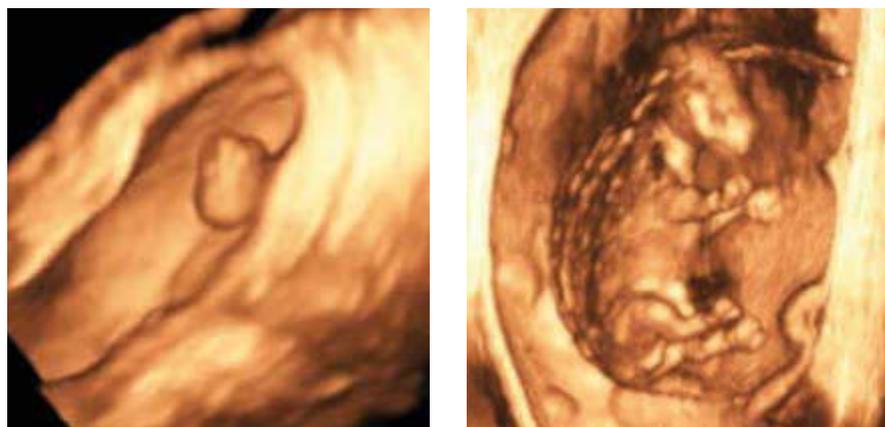


Figura 3 Día 32 (A) y 60 (B) embrión/feto bovino con tecnología 3D/4D en un ultrasonido Samsung HS60 (Laboratorio de Pohler).

un porcentaje bajo de la pérdida total de la preñez en el ganado (*Santos et al., 2004; Reese et al., 2020*), el uso de ecografías 3D/4D puede no proporcionar información suficiente o beneficiosa para determinar el estado de la preñez o la pérdida de la preñez en comparación con otros métodos disponibles. Sin embargo, en los próximos años, nuevas investigaciones pueden determinar el potencial del uso de dicha tecnología.

Ultrasonografía Doppler

El establecimiento y mantenimiento de la preñez requiere la presencia de un CL funcional y concentraciones adecuadas de P4 (*Mann and Lamming, 1999; Parr et al., 2012*). En las hembras no preñadas, entre los días 15 y 18 del ciclo estral, las concentraciones de P4 disminuyen en respuesta a la prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) liberada por el útero (*Niswender et al., 2000*), induciendo la regresión del CL (*Ginther et al. 2010*). La ecografía Doppler permite identificar la luteólisis estructural mediante la visualización de la disminución de la perfusión sanguínea del CL durante su regresión, lo que puede permitir el diagnóstico de hembras no preñadas antes que los métodos tradicionales de la ecografía (*Herzog et al., 2010; Pugliesi et al., 2014; Scully et al., 2015*). Este método es eficiente en rumiantes porque la disminución de la

perfusión sanguínea durante la regresión del CL se correlaciona con la disminución de las concentraciones de P4 (*Herzog et al., 2010; Balaro et al., 2017*).

La ecografía Doppler se ha utilizado principalmente en rodeos de vacunos de carne para el diagnóstico de la preñez entre los días 20 y 22 de la gestación con una precisión superior al 90% (*Pugliesi et al., 2014; Pugliesi et al., 2018; Motta et al., 2020*). Una de las principales ventajas del diagnóstico precoz de preñez por ecografía Doppler es su alta sensibilidad, cercana al 100%, lo que resulta en pocos diagnósticos falsos negativos (*Pugliesi et al., 2014; Melo et al., 2020a*). Este método, sin embargo, resulta en 15 a 20% de diagnósticos falsos positivos (*Siqueira et al., 2013; Pugliesi et al., 2018; Melo et al., 2020a*) que pueden atribuirse a la ovulación retrasada en respuesta al protocolo de sincronización, ciclos estrales extendidos (> 22 días) o mortalidad embrionaria temprana antes del diagnóstico secundario (*Pugliesi et al., 2018*). Esto puede exacerbarse en rodeos lecheros que tienen una alta incidencia de mortalidad embrionaria temprana entre los días 24 y 30 de gestación (*Pohler et al., 2016a; Reese et al., 2018*). A pesar de ser un buen predictor de preñez, la ecografía Doppler por sí sola no es eficiente en el monitoreo de la viabilidad del feto o la predicción de pérdidas de preñez, ya que una reducción en las concentraciones circulantes de P4



Fotografía cortesía: Ganadería San Rafael

ocurre simultáneamente o después de la muerte embrionaria/fetal (Pohler et al., 2013; Pohler et al., 2016a). Cuando se usa junto con otros marcadores (ver más abajo), como ISG o glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG), hay una disminución de 5 a 10% en los diagnósticos falsos positivos, lo que podría contribuir a la identificación de posibles pérdidas por preñez (Melo et al., 2020a).

Métodos basados en productos químicos: específicos para la preñez

Glicoproteínas asociadas a la preñez

Las glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG) son productos placentarios producidos por las células trofoblásticas gigantes (TGC) del trofocotermo. Alrededor del día 19 al 21 de la gestación, las TGC migran a través de la unión microvilar, se fusionan con el epitelio uterino y entregan productos que incluyen lactógenos placentarios y PAG en el estroma uterino que ingresan a la circulación materna (Wooding and Wathes, 1980; Wooding, 1982; Pohler et al., 2015). El primer aumento significativo de PAG en la circulación materna se puede identificar entre el día 22 y 24 de la gestación (Arnold et al., 2012; Pohler et al., 2013); sin embargo, los

roles fisiológicos de las PAG siguen sin estar claros. Se ha planteado la hipótesis de que las glicoproteínas asociadas a la preñez pueden ayudar a procesar los factores de crecimiento en la interfaz placentario-uterino, desempeñar un papel en la adhesión entre el útero y la placenta o actuar como un factor que controla la modulación inmune materna (Austin et al., 1999; Hoeben et al., 1999; Wallace et al., 2015). Se ha demostrado que varios factores influyen en la concentración circulante de glicoproteínas asociadas a la preñez, incluida la paridad, los días después del parto, la respuesta del estro, el suero y la viabilidad embrionaria (Pohler et al., 2016b; Franco et al., 2018).

Se han identificado más de 20 genes distintos para las glicoproteínas asociadas a la preñez en el genoma bovino, todos específicos de la preñez, lo que ha contribuido al desarrollo de múltiples pruebas comerciales de diagnóstico de preñez para rumiantes (Butler et al., 1982; Sousa et al., 2006). Además del diagnóstico preciso de la preñez, la investigación actual tiene como objetivo comprender la correlación entre la concentración de glicoproteínas asociadas a la preñez circulantes y la mortalidad embrionaria. Varios grupos de investigación han informado que la concentración circulante de glicoproteínas asociadas

a la preñez se puede utilizar como biomarcador de la preñez y la viabilidad embrionaria (Silva et al., 2007; Romano and Larson, 2010; Pohler et al., 2016a; Pohler et al., 2016b). En todas las clases de ganado, las hembras que experimentan pérdida embrionaria tardía han disminuido las concentraciones circulantes de glicoproteínas asociadas a la preñez alrededor del día 30 de gestación en comparación con las vacas que mantienen la preñez hasta el término (Pohler et al., 2013; Pohler et al., 2016a; Pohler et al., 2016b). Pohler et al. (2016a) establecieron un límite para las concentraciones de glicoproteínas asociadas a la preñez en muestras de suero el día 31 de gestación en vacas lecheras sometidas a inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) y transferencia de embriones a tiempo fijo, logrando una precisión del 95% en la predicción de la mortalidad embrionaria tardía. Se logró una precisión similar prediciendo la mortalidad embrionaria en vacas *Nelore* sometidas a IATF, en las cuales las concentraciones en vacas que experimentan pérdida de preñez que pueden reflejar las diferentes causas de casos individuales de pérdida de preñez o el momento de la expresión de las glicoproteínas asociadas a la preñez y los perfiles en animales individuales, aumentando así el desafío asociado con la predicción de la pérdida de preñez. Además, Gatea et al., (2018) informaron una dependencia significativa de anticuerpos en la predicción de la pérdida de la preñez y mostraron diferencias con las distintas técnicas de manejo reproductivo.

Establecido el uso de la determinación de glicoproteínas asociadas a la preñez en los días 28 a 30 de gestación, las concentraciones de PAG ya en el día 22 se han evaluado como una prueba de diagnóstico de preñez y de viabilidad embrionaria. En comparación con las vacas no preñadas, las vacas preñadas y las vaquillonas tienen una mayor concentración circulante de glicoproteínas asociadas a la preñez en los días 24 y 22 de gestación, respectivamente (Arnold et al., 2012; Martins et al., 2018; Reese et al., 2018; Middleton and Pursley, 2019; Oliveira Filho et al., 2020), lo que

sugiere que las glicoproteínas asociadas a la preñez tienen el potencial de ser utilizadas como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la preñez en el ganado. Si se aplica correctamente, este avance podría identificar a los animales no preñados y reducir los intervalos de inseminación/parto al permitir una resincronización y reinseminación más tempranas. Aunque la detección de glicoproteínas asociadas a la preñez es posible ya en el día 24 de gestación, los beneficios como herramienta de diagnóstico de preñez en esta etapa pueden ser mitigados por la alta incidencia de mortalidad embrionaria que ocurre después del día 24, aumentando el número de diagnósticos falsos positivos; sin embargo, este enfoque podría permitir la investigación de una ventana de pérdida de preñez previamente inexplorada. La mortalidad embrionaria entre los días 24 y 30 puede pasarse por alto debido a los desafíos históricamente asociados con su identificación; sin embargo, los informes indican que entre el 5 y el 10% de las preñeces se pierden durante este período (Reese et al., 2018; Oliveira Filho et al., 2020; Reese et al., 2020). Además de la alta tasa de falsos positivos, el diagnóstico de falsos negativos puede ser un problema a medida que las concentraciones de glicoproteínas asociadas a la preñez circulantes aumentan a diferentes tasas en vacas individuales.

Reese et al. (2018) reportaron una tasa de falsos negativos de hasta el 55% utilizando un valor de corte de confianza del 90%; mientras que Middleton y Pursley (2019), utilizando una combinación diferente de análisis de anticuerpos, observaron una tasa de falsos negativos del 6% que indica que la selección de anticuerpos hacia las glicoproteínas asociadas a la preñez secretados tempranamente es crítica. Un desafío es que las concentraciones de glicoproteínas asociadas a la preñez del día 24 exhiben una mayor variabilidad en comparación con las muestras del día 30, lo que dificulta el establecimiento de valores de corte para el éxito de la preñez o las predicciones de mortalidad embrionaria. Algunos estudios no muestran diferencias en las concentraciones de glicoproteínas asociadas a la preñez del día 24 entre las hembras lecheras que experimentan pérdida de preñez y mantienen la preñez, (Reese et al., 2018) mientras que otros identifican diferencias en las vacas lecheras y vacas de carne (Middleton and Pursley, 2019; Oliveira Filho et al., 2020). Las discrepancias en estos resultados tempranos de glicoproteínas asociadas a la preñez pueden atribuirse parcialmente a la gran familia de genes *PAG*, que difieren en el momento de la expresión de *PAG* por el concepto en desarrollo o la reactividad del anticuerpo (Wallace et al., 2015; Gatea et al., 2018). Tanto las combinaciones de anticuerpos

internos como las pruebas de diagnóstico disponibles comercialmente se han utilizado en investigaciones que se suman a la confusión en estos datos. Cuando se analizó la concentración circulante de glicoproteínas asociadas a la preñez en los días 22 a 24 para predecir el éxito de la preñez, se observaron diferentes resultados (Reese et al., 2018; Middleton and Pursley, 2019; Oliveira Filho et al., 2020), lo que indica que son necesarios el refinamiento del ensayo y los estudios con tamaños de muestra más grandes para mejorar el valor predictivo hasta un punto aceptable para su uso en el manejo reproductivo aplicado.

Métodos basados en productos químicos: específicos para la preñez

Progesterona

La detección de *P4* es un método de diagnóstico específico no relacionado con la preñez y se utiliza más comúnmente en la industria láctea para evaluar la regresión del *CL* y el posible retorno al estro después de la inseminación (Nebel, 1988). Las diferencias en los niveles de *P4* en suero o leche entre una vaca preñada y no preñada se pueden utilizar como biomarcador para la detección temprana de la preñez. Las vacas con niveles bajos de *P4* ($< 1 \text{ ng/mL}$) de 18 a 24 días después de la inseminación se clasificarían como no preñadas, que hay sufrido luteólisis, y las vacas con niveles altos de *P4* ($\geq 1 \text{ ng/mL}$) durante este período se clasificarían como potencialmente preñadas (Sasser and Ruder, 1986; Nebel, 1988; Niswender et al., 2000). Este método puede diagnosticar vacas no preñadas con una precisión entre 81 y 100%; sin embargo, la eficiencia de diagnosticar positivamente la preñez varía entre 60 y 100% (Nebel et al., 1987). Los falsos diagnósticos positivos de preñez probablemente reflejen vacas con fases lúteas más largas (tres frente a dos ondas foliculares), un *CL* persistente, quistes lúteos o luteinizados, o vacas que sufrieron una mortalidad



embrionaria temprana (Pohler et al., 2015). Por lo tanto, la no especificidad y la consecuente alta prevalencia de falsos positivos ha limitado el uso de este método como un marcador de preñez o viabilidad embrionaria. Los datos más recientes que utilizan un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral en la granja han reportado resultados prometedores en la identificación de vacas no preñadas sin un CL funcional; sin embargo, tuvieron baja especificidad en el diagnóstico de la preñez (Omontese et al., 2020). Las concentraciones elevadas de P4 circulante inmediatamente después de la inseminación se han asociado con el alargamiento del concepto (Garrett et al., 1988; Carter et al., 2008) y el aumento de las tasas de preñez (Mann and Lamming, 1999; Stronge et al., 2005) en el ganado.

En cuanto a la detección de la pérdida de la preñez, existen algunas discrepancias en la literatura entre la relación de P4 y las vacas que sufren mortalidad embrionaria. Starbuck et al. (2004) demostraron que las vacas con < 3.76 ng/mL de P4 en plasma en la semana 5 de gestación tenían más probabilidades de experimentar mortalidad embrionaria que las vacas con una mayor concentración de P4; sin embargo, la mayoría de las vacas (77%) en el grupo

de P4 bajo no experimentaron pérdidas de preñez. Un estudio posterior demostró que los niveles séricos de P4 entre los días 28 y 30 en vacas gestantes no eran predictivos de la pérdida de la preñez (Pohler et al., 2013). Por lo tanto, los niveles elevados de P4 entre el día 18 y el 24 son más útiles para determinar el establecimiento de la preñez y el uso de niveles relativamente bajos de P4 como predictor de la pérdida de la preñez es menos confiable en comparación con otros métodos basados en productos químicos discutidos en esta revisión.

Genes estimulados por interferón-tau

El reconocimiento materno de la preñez en bovinos ocurre durante el período de alargamiento del embrión cuando el interferon tau (IFNT) es secretado por células del trofotodermo del concepto en desarrollo (Bazer et al., 1997; Gray et al., 2002) para prevenir la liberación de PGF2 α por el endometrio, manteniendo así la función del CL y la producción de P4 (Bazer et al., 2015). Además de su papel en el proceso de reconocimiento materno de la preñez, el interferon tau también es capaz de inducir la expresión de varios ISG por el endometrio (Mirando

et al., 1991) y llega a la circulación periférica a través de la vena uterina (Oliveira et al., 2008; Bott et al., 2010), lo que conduce a la expresión de ISG en sitios extrauterinos como el CL (Oliveira et al., 2008), (Ruhmann et al., 2017), la mucosa vaginal y cervical, el hígado (Kunii et al., 2018) y los leucocitos de la sangre periférica (Yankey et al., 2001; Han et al., 2006; Kizaki et al., 2013).

Si bien todavía se encuentra en las etapas de desarrollo sin disponibilidad actual a campo, muchos grupos de investigación tienen como objetivo aumentar el potencial de aplicación de estos biomarcadores. Hasta la fecha, ningún ensayo ha sido lo suficientemente sensible como para diferenciar las concentraciones periféricas del interferon tau entre hembras preñadas y no preñadas. Sin embargo, varios autores han propuesto la expresión de ISG en leucocitos de sangre periférica como una posible herramienta para el diagnóstico temprano de la preñez en rumiantes (Green et al., 2010; Pugliesi et al., 2014). Esta técnica ha sido validada en leucocitos totales (Han et al., 2006; Stevenson et al., 2007; Green et al., 2010), células mononucleares de sangre periférica (Gifford et al., 2007; Pugliesi et al., 2014; Melo et al., 2020b) y células polimorfonucleares de sangre periférica (Kizaki et al., 2013; Yoshino et al., 2018; Melo et al., 2020a). En general, se encontraron diferencias significativas entre las hembras gestantes y no gestantes entre los días 18 y 20 de gestación, con una precisión del diagnóstico de preñez positivo que oscila entre 70 y 90% en vacunos de carne (Pugliesi et al., 2014; Melo et al., 2020a) y lecheros (Yoshino et al., 2018). Aunque el ISG ha sido investigado en gran medida como una herramienta de diagnóstico de preñez, altas proporciones de resultados falsos positivos y falsos negativos reducen significativamente la precisión de esta técnica. Estos resultados podrían estar relacionados con la respuesta de ISG a otros interferones de tipo I, incluidos IFN α e IFN β , especialmente en respuesta a infecciones virales (Schoggins, 2014; Shaw et al., 2017; Shirozu et al., 2017).



Fotografía cortesía: Criadero Santa Inés

Además de su función como predictores de la preñez, la expresión de ISG podría reflejar la viabilidad embrionaria, ya que existe una correlación positiva entre las concentraciones del interferon tau liberado por el concepto y la abundancia de ISG (Matsuyama et al., 2012). Algunos estudios (Matsuyama et al., 2012; Sheikh et al., 2018) informaron diferentes patrones de expresión de ISG entre las hembras que mantuvieron la preñez y las hembras que experimentaron una pérdida de preñez, lo que sugiere que estas diferencias podrían explorarse en la predicción de la mortalidad embrionaria o fetal, mientras que otros no encontraron diferencias (Shirasuna et al., 2015; Melo et al., 2020a). Debido a que los eventos que conducen a la mortalidad embrionaria o fetal no siempre están relacionados con el desarrollo y la expansión del trofotodermo, los patrones de expresión de ISG pueden detectar algunos, pero no todos, los casos de pérdida de la preñez. En general, los ISG son una herramienta valiosa para el diagnóstico de la preñez como estímulo indirecto del concepto; sin embargo, los ajustes en las técnicas son necesarios para mejorar la sensibilidad y la especificidad para el uso potencial en el monitoreo de la viabilidad de la preñez.

MicroARN circulantes

Uno de los candidatos más prometedores en la búsqueda de un biomarcador de fácil acceso para el diagnóstico de la preñez son los *miARN* circulantes (*miARN*); sin embargo, actualmente se limita al uso en investigación debido a las técnicas de laboratorio necesarias para aislarlos y medirlos. Entre 18 y 22 nucleótidos de longitud, los *miARN* juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica y se han encontrado en líquidos biológicos que van desde el suero y el líquido amniótico hasta la orina y la leche (Reid et al., 2011; Pohler et al., 2015). Hay muchos otros *ARN* no codificantes que poseen potencial de actuar como biomarcadores en el

futuro; sin embargo, los *miARN* son actualmente los mejor caracterizados y se han correlacionado fuertemente con la progresión y detección de la enfermedad (Etheridge et al., 2011; Russo et al., 2016). Además, los *miARN* tienen una base de datos bien desarrollada (*miRBase*) que incluye *miARN* de humanos, animales, plantas y virus (Griffiths-Jones et al., 2007). Los *miARN* se han propuesto como biomarcadores óptimos porque poseen características clave que incluyen la estabilidad, la no invasividad, la especificidad tisular y la precisión y rapidez con respecto a los métodos de detección (Turchinovich et al., 2011; Velu et al., 2012). Se ha identificado que existen en diferentes formas; *miARN* asociados con Argonaute 2 que contienen complejos de proteínas (Arroyo et al., 2011) (Tabet et al., 2014), lipoproteínas o nucleofosmina 1 (Wang et al., 2010), y aquellos ubicados dentro de cuerpos apoptóticos (Zernecke et al., 2009) o vesículas extracelulares (Valadi et al., 2007). Los *miARN* extracelulares derivados son de particular interés ya que esta forma de *miARN* sigue siendo la más ampliamente verificada, y se ha documentado que es liberada por presumiblemente cada tipo celular como un método de comunicación célula a célula para provocar varios efectos biológicos (Turchinovich et al., 2012; Liang et al., 2017). La investigación previa de *miARN* asociado a la preñez en los bovinos ha dado como resultado varios candidatos que se aislaron de leche, plasma, suero o sangre entera (Ioannidis and Donadeu, 2016; Bem et al., 2017; Ioannidis and Donadeu, 2017; Pohler et al., 2017; Schanzenbach et al., 2017; Gebremedhn et al., 2018; Markkanan et al., 2018).

Los estudios también han identificado *miARNs* producidos por animales preñados en caballos, ovejas y cerdos (Cameron et al., 2011; Burns et al., 2014; Reliszko et al., 2017). Un estudio reciente de Fiandanese et al (2016) identificó un potencial *miARN*, *bta-mir* 140, como un biomarcador temprano para la detección de la preñez. En el día 13, *bta-mir* 140 aumentó en abundancia

en la circulación de vacas gestantes, no lactantes y en el día 19 se reguló en más tanto en vacas gestantes lactantes como no lactantes. En estudios recientes de nuestro laboratorio, los datos sugieren que el *miARN* puede proporcionar información adicional para la viabilidad del embrión. Las vacas que experimentan mortalidad embrionaria tienen una abundancia significativamente mayor de *miARN* específicos en los días 17 y 24 de gestación en comparación con las vacas que tienen una preñez exitosa (Pohler et al., 2017). Se necesitarán estudios futuros para evaluar la repetibilidad de estos hallazgos y para determinar el *miARN* preciso más aplicable para el análisis de viabilidad embrionaria. Además, una limitación significativa en esta área de investigación es que no existe un enfoque estandarizado con respecto a las técnicas de extracción y aislamiento, lo que conduce a resultados diferentes con respecto a la abundancia de diversos *miARN*.

Contribución materna vs paterna a la pérdida de la preñez

Contribución y selección de hembras

Independientemente de los numerosos métodos disponibles para identificar el fracaso reproductivo, la selección de hembras con la capacidad innata de llevar con éxito una preñez y producir descendencia viva es probablemente el factor más importante para aumentar la eficiencia reproductiva. La selección de vaquillonas de reemplazo a menudo está determinada por la genética y el fenotipo; sin embargo, ciertas características fisiológicas, incluida la evaluación del tracto reproductivo, aumentarán la probabilidad de éxito de la preñez. La puntuación del tracto reproductivo (RTS) se ha utilizado para evaluar el estado puberal de las vaquillonas mediante la evaluación del tamaño uterino y las estructuras ováricas y se ha correlacionado con la productividad

de por vida de la vaquillona, especialmente cuando se evalúa por ecografía (Andersen et al., 1991; Holm et al., 2009). En comparación con otras variables de pre-inseminación de un solo factor, incluyendo la edad y el peso corporal, se encontró que la puntuación del tracto reproductivo tiene la mayor capacidad predictiva para resultados reproductivos positivos, incluyendo la tasa de preñez por IA y días reducidos hasta el parto (Holm et al., 2009). Más recientemente, el recuento de folículos antrales se ha utilizado en combinación con puntuación del tracto reproductivo, ya que el alto recuento de folículos antrales se asocia con menos servicios por concepción (Mossa et al., 2012), aumento de la producción de P4 y estradiol, (Ireland et al., 2009; Jimenez-Krassel et al., 2009), aumento de la secreción de proteínas uterinas (McNeel et al., 2017) y mayor producción de embriones, lo que (Majumder et al., 2010) contribuye a una mejora general de la fertilidad (de Moraes et al., 2019). Sin embargo, dentro de las vaquillonas puberales, otras diferencias fisiológicas que resultan en sub e infertilidad son menos evidentes. Usando un modelo de TE en serie para clasificar las vaquillonas de carne como de alta fertilidad, subfertilidad o infértiles, Geary et al. (2016) identificaron alteraciones significativas en la expresión génica endometrial entre las clasificaciones de fertilidad en el día 14 de gestación a pesar de concentraciones similares de P4 y tasas de recuperación embrionaria, lo que sugiere que la pérdida significativa de la preñez ocurre entre los días 14 y 28 en vaquillonas sub o infértiles. Estos hallazgos fueron respaldados además por la disminución de la longitud del concepto en el día 17 de la gestación y las alteraciones en los perfiles de transcriptoma endometrial y conceptual que indican la desregulación de las interacciones entre el concepto y el endometrio en las vaquillonas subfértiles en comparación con las vaquillonas de alta fertilidad (Moraes et al., 2018). A pesar de las mejoras en la selección de vaquillonas de reemplazo que ofrece la evaluación por ultrasonido, no todos los factores



que afectan la fertilidad se pueden identificar con la misma facilidad.

Comprender el fracaso reproductivo en vacas que previamente han sido reproductivamente competentes puede ser un desafío específico. El gran tamaño del tracto reproductivo se ha asociado con una disminución de la fertilidad en vacas lecheras lactantes primíparas y multíparas y puede deberse a problemas de transporte de esperma o a un mayor fracaso del reconocimiento materno correcto de la preñez (Baez et al., 2016; Young et al., 2017). Las ramificaciones fisiológicas desconocidas del aumento del tamaño del tracto reproductivo pueden persistir más allá del establecimiento de la preñez, ya que Madureira et al. (2017) informaron un aumento del fracaso de la ovulación, una disminución de la concentración circulante de PAG y una mayor pérdida de preñez entre los días 30 y 120 en las vacas con los tractos reproductivos más grandes en comparación con aquellas con un menor tamaño del tracto reproductivo.

Otra consideración en la selección de vacas, especialmente cuando se utilizan tecnologías reproductivas, es la expresión del estro en o antes de la inseminación. La expresión del estro se correlaciona positivamente con el aumento de las tasas de preñez y la disminución de la mortalidad embrionaria en casi todas las clasificaciones femeninas (paridad, subespecies, vacas de carne y lecheras) que se someten a IA o transferencia de embriones (Pursley et al., 1998; Richardson et al., 2014; Pereira

et al., 2016; Bó and Cedeño, 2018). Numerosos sistemas auxiliares, incluyendo parches de detección de estro y monitores de actividad, han aumentado la precisión y efectividad de la detección de estro en comparación con los métodos visuales que pueden ser subjetivos y laboriosos. Los monitores de actividad, a menudo montados en collares o podómetros y retransmitidos al software informático para su análisis, tienen valores predictivos positivos para estro superiores al 85% y tasas de error diarias inferiores al 2% (Løvendahl and Chagunda, 2010; Madureira et al., 2015). Los parches de detección de estro, como el indicador de cría EstroTECT, son auxiliares de un solo uso que se activan a medida que los animales se montan repetidamente y requieren una estimulación más baja para sistemas de gestión más extensos (Pohler et al., 2016b). La mayor actividad del estro, indicada por la activación del parche y del monitor de actividad, resulta en un aumento de las tasas de preñez del día 30, mayores concentraciones de PAG circulantes y una disminución de la mortalidad tardía del embrión en comparación con los animales que no exhibieron estro o solo exhibieron signos débiles de estro incluso cuando se produjo la ovulación (Madureira et al., 2015; Pereira et al., 2016; Pohler et al., 2016b). Estos factores pueden ayudar en la selección de las hembras con mayor probabilidad de establecer y mantener la preñez, aunque todavía no se pueden identificar muchas diferencias en la fertilidad.

Contribución y selección del padre

Los fisiólogos que trabajan con la reproducción a menudo se centran en el papel de la hembra en los procesos reproductivos, y se ha prestado mucha menos atención a los factores derivados del macho asociados con la fertilidad o las causas de mortalidad embrionaria que se originan a partir de la fecundación y el desarrollo embrionario inicial (Figura 4). En muchas especies, la genética paterna puede contribuir significativamente a la formación de la placenta y el posterior mantenimiento de la preñez durante la gestación. Usando un modelo de embrión uniparental en ratones, se demostró que la formación del embrión depende principalmente del genoma materno, mientras que el genoma paterno contribuye en gran medida al desarrollo de trofoblastos y, por lo tanto, de la placenta (Barton et al., 1985; Surani et al., 1987). En bovinos, los cambios morfológicos de la placenta asociados con la formación del placentoma y la interdigitación de los espacios intercarunculares comienzan durante la tercera semana de gestación (Schlafer et al., 2000). Se requiere una placentación adecuada para el intercambio adecuado de nutrientes en la interfaz feto-materna y la interrupción de estos procesos fisiológicos puede conducir al fracaso de la preñez. La investigación de nuestro laboratorio ha caracterizado la asociación entre la fertilidad del padre y la pérdida de la preñez en el ganado, así como comenzó a investigar los mecanismos fisiológicos controlados por la genética paterna en relación al mantenimiento de la preñez. En vacas *Bos indicus* productoras de carne, no se observó diferencia alguna en la tasa de preñez en el día 30 entre los toros utilizados para la IA, pero la pérdida de preñez durante el segundo mes de gestación fue altamente variable (1.4 a 11.1%) entre los toros (Franco et al., 2018). Del mismo modo, las vacas *Bos Taurus* productoras de carne tuvieron una gran varianza en la pérdida de preñez entre los días 24 y 31 de gestación (1.8 a 11.7%) y entre los



Figura 4. Tanto las contribuciones femeninas como las masculinas son necesarias para la formación de un concepto exitoso, pero debido a las contribuciones uterinas de la gestación, el entorno materno es el foco de más investigación a medida que avanza la gestación. Adaptado de Bai et al., 2013.

días 31 y 60 de gestación (2.3 a 12.6%) entre los toros para servicio utilizados para la IA (Franco et al., 2020). De manera similar, se observó la misma varianza entre los toros utilizados para la IA y la TE en el ganado lechero. La pérdida de preñez durante el segundo mes de gestación osciló entre el 5 y el 35-40% entre los toros utilizados tanto para IA como para TE, y no se observó correlación ($P = 0,8$) con su índice respectivo de tasa de concepción del padre (sire conception rate, SCR) (laboratorio de Pohler; datos no publicados). Curiosamente, los toros con altas tasas de concepción de sus padres producen embriones preimplantacionales de mayor calidad tanto en estudios in vivo como in vitro, pero solo se observaron diferencias discretas en el desarrollo embrionario y el éxito de la preñez en vaquillonas lecheras (Ortega et al., 2018).

Estos estudios de caracterización del fenotipo del toro sugieren que los métodos actuales para evaluar la fertilidad de los toros pueden ser limitados al evaluar el éxito reproductivo general y que la incidencia de la pérdida tardía de la preñez durante la gestación debe tenerse en cuenta al evaluar la fertilidad de los toros, ya que puede afectar significativamente la tasa de preñez final. Para investigar el mecanismo fisiológico de la genética paterna en el mantenimiento de la preñez

durante el segundo mes de gestación, los embriones partenogénéticos, que consisten solo en un genoma materno, se transfirieron a las vacas receptoras en la etapa de blastocisto (día 7) y el desarrollo de la preñez se monitoreó mediante ultrasonografía y secreciones placentarias a base de sangre. En las 19 vacas que establecieron una preñez, la concentración circulante de productos placentarios (PAG e ISG) durante la gestación fue menor en comparación con las vacas que llevaban embriones de control (Pohler Lab; datos no publicados). Los resultados preliminares demuestran que a pesar de que estos embriones pueden sobrevivir hasta el día 40-45 de gestación, no se observa ningún sitio activo de implantación y unión al endometrio, lo que sugiere que los tejidos trofoblastos no se forman adecuadamente en ausencia de genes paternos. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la genética paterna contribuye significativamente a la formación de placenta en el ganado, lo que podría explicar la mayor parte de la varianza de los toros observada en la pérdida de la preñez durante el período de placentación activa. El desarrollo de marcadores para identificar toros de alta o baja pérdida de preñez mejoraría las evaluaciones de fertilidad de los toros y aumentaría la eficiencia reproductiva de los vacunos productores de carne y de leche. 6