

## Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein

Manuel E. Soria Parra; Carlos A. Soria Parra; Daniel Argudo Garzón; Guillermo Serpa García; Silvana Méndez Álvarez; Carlos Torres Inga; Guillermo E. Guevara Viera

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, Cuenca, Ecuador

manuel.soria@ucuenca.edu.ec

### RESUMEN

Se comparó el efecto de dos protocolos de superovulación (sincronización de la onda folicular SOF y el celo natural CN) en la calidad de embriones obtenidos de vacas Holstein. Se seleccionaron 20 vacas Holstein como donantes con una condición corporal de 2,75 a 3,5; edades entre 40 y 60 meses; ciclos normales y que no presentaran problemas reproductivos. Las vacas fueron aleatoriamente asignadas al tratamiento SOF (n = 10) y al tratamiento CN (n = 10). El grupo SOF se sincronizó con dispositivo intravaginal de progesterona más benzoato de estradiol en el día 0 y FSH en dosis decrecientes durante 4 días, 2 veces al día a partir del día 4. En el día 6 se retiró el implante y se aplicó prostaglandina. En el día 8 se inseminó a las 6 am y 6 pm. Al grupo CN se aplicó la FSH dos veces al día durante 4 días en dosis decreciente a partir del día 10. En el día 12 se aplicó prostaglandina y se inseminó el día 14 a las 6 am y 6 pm. En los dos grupos se recuperaron los embriones en forma no quirúrgica, 7 días después de la primera inseminación artificial. Los resultados en embriones transferibles fueron  $5,7 + 0,76$  y  $2,8 + 0,31$  ( $P < 0,05$ ) para SOF y CN, respectivamente. Se concluye que el protocolo de SOF produce mayor cantidad de embriones transferibles (calidad 1 y 2) que el protocolo CN.

**Palabras clave:** *bovinos, progesterona, estro, prostaglandina*

### Superovulation with Synchronization of Follicle Wave and Naturally-Induced Estrus in Holstein Cows

#### ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of superovulation (SOV) with synchronization of ovarian follicular wave (SOFW) and natural estrus (NE) on the quality of embryos obtained in Holstein cows. 20 Holstein cows were selected as donors with a body condition score: 2.75 to 3.5; aged between 40 and 60 months; normal cycles; and who have not submitted reproductive problems. The cows were randomly assigned to treatment SOFW (n = 10) and NE (n = 10) treatment. The SOFW group was synchronized with intravaginal progesterone device plus estradiol benzoate at day 0 and FSH in decreasing doses for 4 days, 2 times a day from day 4; at day 6 the implant was removed and applied prostaglandin; on day 8, they were inseminated to 6:00 a.m. and 6 pm. At NE group, FSH was applied twice daily for 4 days in decreasing doses from day 10; prostaglandin on day 12 was applied and inseminated on day 14 at 6 am and 6 pm. In both groups embryos non-surgically seven days after the first IA recovered. The results obtained in transferable embryos were  $5.7 + 0.76$  and  $2.8 + 0.31$  ( $P < 0.05$ ) SOF and CN, respectively. It is concluded that the protocol SOFW produces more transferable embryos (grade 1 and 2) that the protocol NE.

**Key words:** *bovine, progesterone, estrus, prostaglandin*

## INTRODUCCIÓN

Comprender el funcionamiento de la dinámica folicular así como sus procesos de autorregulación son las bases de las nuevas alternativas de control del ciclo estral en las vacas. La generación de nuevos conocimientos sobre la dinámica folicular en el ovario bovino obliga a reformular los métodos tradicionales de control de celos, lo que ha generado nuevas propuestas de inducción y sincronización de celo y también de ovulación.

Para la producción de embriones se han desarrollado esquemas de superovulación (SOV) en vacas donantes: con el celo natural (CN) o por la sincronización de ondas foliculares (SOF) (Stringfellow y Seidel, 2000; Baruselli *et al.*, 2006; Bó, Tríbulo y Mapletoft, 2011).

La superovulación incluye el manejo de procesos endocrinos en el ciclo estral hasta la ovulación de los folículos que se han desarrollado en respuesta al tratamiento hormonal, potenciando las oleadas de crecimiento folicular para producir ovocitos fértiles que son fecundados y siete días después los embriones son recuperados y clasificados de acuerdo a su estadio y calidad, según lo establecido por la Sociedad Interna-

cional de Transferencia de Embriones (IETS) (Bó, Chesta y Nasser; 2005; Belacuba, 2007; Amaya, 2010; Luca y Castrillón, 2011).

El objetivo del trabajo fue comparar el efecto de dos protocolos de superovulación (sincronización de la onda folicular SOF y el celo natural CN) en la calidad de embriones obtenidos de vacas Holstein.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, en las parroquias Tarqui, Cumbe y Victoria del Portete, situadas a 20; 18 y 8 km de la ciudad de Cuenca, respectivamente.

Se seleccionaron 20 vacas Holstein y se formaron en 2 grupos de 10 animales, de acuerdo a los siguientes parámetros: condición corporal (en el rango de 2,75 a 3,5); entre 40 y 60 meses de edad; ciclos estrales normales; con un mínimo de 60 días abiertos y sin problemas reproductivos, según previa evaluación ginecológica y ecográfica.

Se aplicaron los siguientes protocolos:

Grupo SOF (n=10):

- Día 0: implante intravaginal (IV) de 1,38 g de progesterona (P4; CIDR®, Zoetis, México), 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, Syntex, Argentina) IM; y 100 mg de P4 (Gestavec® Vecol SA, Colombia) IM.
- Día 4: 40 mg de Folltropin® (Bioniche, Canadá) IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 5: 30 mg de FSH-p/IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 6: 20 mg de FSH-p y 0,5 mg de D-cloprostenol (Estrumate® Intervet Schering-Plough, NJ, USA) IM dos veces al día (6 am y 6 pm); se retiró el IV a las 6 pm.
- Día 7: 10 mg de FSH-p/IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 8: inseminación artificial (IA) a las 6 am y 6 pm, Gonadorelina (GnRH; Fertagyl®, Intervet Schering-Plough, NJ, USA) 500 ug/IM a las 6 am.

Grupo CN (n=10):

- Día 0: celo natural.
- Día 10: observación de cuerpo lúteo y ausencia de folículo dominante mediante ecografía transrectal y 40 mg de FSH-p/IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 11: 30 mg de FSH-p/IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 12: 20 mg de FSH-p y 150 ug de D-cloprostenol/IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 13: 10 mg de FSH-p/IM dos veces al día (6 am y 6 pm).
- Día 14: IA a las 6 am y 6 pm, GnRH 500 ug/IM a las 6 am.

En los dos grupos, siete días después de la primera IA se procedió a la colecta no quirúrgica de embriones utilizando solución buffer salina (PBS).

En el laboratorio con un estereoscopio de luz diascópica se buscaron los embriones y se aislaron en un medio de mantenimiento Holding (Vigro™, Bioniche, Pullman, WA, USA) se procedió a la valoración de la calidad de acuerdo a los parámetros de clasificación de embriones de la I.E.T.S (2000). Las variables estudiadas fueron: total de estructuras recuperadas (ovocitos y embriones), embriones transferibles (embriones calidad 1 y 2) y estructuras no transferibles (embriones calidad 3, embriones degenerados y ovocitos sin fecundar). Se estimaron los estadígrafos básicos y se aplicó la Prueba *t* de Student para muestras independientes y se consideró el valor de  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los protocolos actuales que incluyen estrógenos (E2) y P4 que controlan la emergencia de la onda folicular (Bó, Tríbulo y Mapletoft, 2011) y el momento de la ovulación (Baruselli *et al.*, 2006) han permitido el desarrollo de tratamientos de superovulación (SOV) en grupos de vacas donantes, sea cual fuere la etapa del ciclo estral en la que se encuentren. En esta investigación al comparar el tratamiento de SOV en el que se considera el CN y la SOF en cuanto al total de estructuras recuperadas los resultados fueron  $6,5 + 2,02$  y  $8,7 + 1,86$ , respectivamente, con una  $P > 0,05$  (ver tabla) corroborando el estudio de Bó *et al.* (1996) donde no se encontraron diferencias en la cantidad de ovocitos y embriones recuperados al comparar un tratamiento superovulatorio con progesterona + 17 beta estradiol para sincronizar la onda con el

grupo control que tomaba como referencia el celo de la vaca. Similares resultados encontraron Goulding *et al.* (1990) al obtener  $8,5 + 0,9$  ovocitos y embriones en la SOV e iniciaron el tratamiento con FSH en el día 10 del ciclo estral.

**Tabla. Resultados obtenidos de los embriones con los tratamientos SOF y CN**

<i>Estructuras</i>	Grupo SOF (n=10)	Grupo CN (n=10)	Valor P
Recuperadas (ovocitos y embriones)	$8,7 \pm 1,86$	$6,5 \pm 2,02$	NS
Embriones transferibles (Calidad 1 y 2)	$5,7 \pm 0,76$	$2,8 \pm 0,31$	$P < 0,05$
No transferibles (Calidad 3, degenerados y ovocitos sin fecundar)	$3,0 \pm 0,86$	$3,67 \pm 1,45$	NS

NS indican diferencia no significativa ( $P > 0,05$ )

SOF: sincronización de la onda folicular

CN: celo natural

Varios estudios (Bo *et al.*, 1995; Mapletoft, Bennett Steward y Adams, 2002) coinciden que para iniciar un tratamiento superovulatorio es necesario que no exista un folículo dominante; esto se logra con el uso de E2 + P4 para sincronizar la onda folicular o iniciando el tratamiento con FSH-P entre el día 10 y el 12 del ciclo; en los dos casos se consiguen folículos en emergencia con respuesta superovulatoria semejante y se obtiene una cantidad similar de ovocitos y embriones recuperados, con una dosis adecuada de gonadotrofina.

En cuanto a la calidad de embriones, existe diferencia significativa entre las estructuras transferibles obtenidas por SOF que cuando se aplica un tratamiento de SOV, tomando como referencia el CN  $5,7 + 0,76$  y  $2,8 + 0,31$  ( $P < 0,05$ ), respectivamente (ver tabla). Estos resultados se ajustan a los parámetros de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2000) al indicar que de las estructuras recuperadas deben ser transferibles entre 40 y 50 %. La P4 exógena aplicada en el tratamiento SOF garantizaría la producción de estructuras transferibles, pues se conoce que la P4 interviene en la calidad de los ovocitos. Salhab *et al.* (2011) afirman que la P4 tiene un efecto importante sobre la calidad de los ovocitos debido a que disminuye la frecuencia de apoptosis de las células del *cumulus* durante la maduración (Aller *et al.*, 2015).

Rivera *et al.* (2011) en vacas lecheras describieron que existe una relación positiva entre los niveles altos de P4 sanguínea durante el crecimiento folicular y la calidad de los embriones; sin embargo, otros autores como Fair y Lonergan (2012) indican que este efecto no está confirmado, pero podría estar relacionado a la disminución de la exposición de los ovocitos a la LH, lo que evita su prematura maduración (Ceri *et al.*, 2011). La sincronización de la onda folicular necesita el aporte de la GnRH para permitir el desarrollo de una oleada de folículos por acción de la FSH que junto a la P4 permiten la maduración de los ovocitos y que por aumento en la frecuencia de los pulsos de LH permiten su ovulación.

En cuanto a las estructuras no transferibles los resultados obtenidos fueron  $3,0 + 0,86$  y  $3,67 + 1,45$  para SOF y CN, respectivamente (ver tabla). Jiménez (2009) expresa que existen factores externos que afectan la respuesta superovulatoria: especie, raza, edad, estado fisiológico, fertilidad, características de las ondas foliculares, individualidad, entre otras; lo que determinaría que independientemente del tratamiento superovulatorio que se haga siempre se obtienen estructuras no transferibles.

## CONCLUSIONES

El tratamiento superovulatorio con SOF produce mayor cantidad de embriones transferibles comparado con el tratamiento de CN, el protocolo SOF presenta la ventaja de que permite un mejor manejo de la oleada folicular por la ablación del folículo dominante; admite sincronizar el inicio de la onda folicular; además, con la P4 exógena se obtiene una mejor calidad de ovocitos y la adición de GnRH al momento de

la inseminación proporciona una sincronía en la ovulación lo que produjo una mayor calidad y cantidad de embriones transferibles.

## REFERENCIAS

- ALLER, J. F.; ABALOS, M. C.; ACUÑA, F. A.; VIRGILI, R.; REQUENA, F. y CANCINO, A. K. (2015). Embryo Yield In Llamas Synchronized With Two Different Intravaginal Progesterone-Releasing Devices and Superovulated With eCG. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13 (3), 3-8.
- AMAYA, A. D. (2010). *Efeto del diametro del foliculo ovulatorio, tamaño del cuerpo luteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos, 1-190*. Tesis en opción al título de Máster en Salud Animal, Bogotá, Colombia.
- BARUSELLI, P. S.; DE SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. y BÓ, G. A. (2006). Superovulation and Embryo Transfer in *Bos indicus* Cattle. *Theriogenology*, 65 (1), 77-88. Extraído el 24 de noviembre de 2015, desde <http://www.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.006>.
- BELACUBA, F. (2007). *Factores que afectan la superovulación en bovino*. Extraído el 24 de noviembre de 2015, desde [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/17-superovulacion.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf)
- BO, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; PIERSON, R. A. y MAPLETOFT, R. J. (1995). Ovarian Follicular Wave Emergence After Treatment With Progestogen And Estradiol In Cattle. *Animal Reproduction Science*, 39 (3), 193-204.
- BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. y MAPLETOFT, R. J. (1996). Effect of Progestogen Plus Estradiol-17 Treatment on Superovulatory Response in Beef Cattle. *Theriogenology*, 45 (5), 897-910.
- BÓ, G. A.; TRÍBULO, A. y MAPLETOFT, R. J. (2011). Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *SPERMOVA*, 1(1), 26-33.
- BÓ, G., y NASSER, L. (2005). *Efficiency of Programs that Control Follicular Development and Ovulation for the Donor Superovulation without Estrus Detection*. Minneapolis, EE.UU.: Proc Joint Mtg Am Embryo Trans Assoc & Can Embryo Trans Assoc.
- CERRI, R.; CHEBEL, R.; RIVERA, F.; NARCISO, C.; OLIVEIRA, R.; THATCHER, W. y SANTOS, J. (2011). Concentration of Progesterone during the Development of the Ovulatory Follicle: I. Ovarian and Embryonic Responses. *Journal of Dairy Science*, 94 (7), 3342-3351.
- FAIR, T. y LONERGAN, P. (2012). The Role of Progesterone in Oocyte Acquisition of Developmental Competence. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (4), 142-147.
- GOULDING, D.; WILLIAMS, D. H.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. y ROCHE, J. F. (1990). Superovulation in Heifers given FSH Initiated Either at Day 2 or Day 10 of the Estrous Cycle. *Theriogenology*, 34 (4), 767-778.
- JIMÉNEZ, C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos superovulation: strategies, associated factors, and prediction of the superovulatory reponse in cows. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (Universidad Nacional de Colombia)*, 56 (3), 195-214. Recuperado el 24 de noviembre de 2015, desde <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/13769>.
- LUCA y CASTRILLÓN, M. (2011). Respuesta a la superovulación y calidad de los embriones en bovinos lecheros de elevado mérito genético, uso de diferentes protocolos. *engormix*. Recuperado el 24 de noviembre de 2015, desde <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/foros/respuesta-superovulacion-calidad-embriones-t22419/103-p0.htm>.
- MAPLETOFT, R. J.; BENNETT STEWARD, K. y ADAMS, G. P. (2002). Recent Advances in the Superovulation in Cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42 (6), 601-611.
- RIVERA, F. A.; MENDONCA, L. G. D.; LÓPEZ, G.; SANTOS, J. E. P.; PÉREZ, R. V.; AMSTALDEN, M., *et al.* (2011). Reduced Progesterone Concentration During Growth of the First Follicular Wave Affects Embryo Quality but Has No Effect on Embryo Survival Post Transfer In Lactating Dairy Cows. *Reproduction*, 141 (3), 333-342.
- Salhab, M.; Tosca, L.; Cabau, C.; Papillier, P.; Perreau, C.; Dupont, J.; *et al.* (2011). Kinetics of Gene Expression and Signaling in Bovine Cumulus Cells Throughout IVM in Different Mediums in Relation to Oocyte Developmental Competence, Cumulus Apoptosis and Progesterone Secretion. *Theriogenology*, 75 (1), 90-104.
- STRINGFELLOW, D. A. y SEIDEL, S. M. (2000). *Manual de Transferencia de Embriones* (3ra ed.). Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

Recibido: 22-6-2016

Aceptado: 1-7-2016