

GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

Valoración de dos protocolos de superovulación para la producción de embriones en vacas Holstein

Manuel E. Soria Parra; Carlos A. Soria Parra; Silvana Méndez Álvarez; Daniel Argudo Garzón; Guillermo Serpa García; Carlos Torres Inga; Andrés Galarza Lucero

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, Ecuador

manuel.soria@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue comparar la respuesta a la superovulación con sincronización de la onda folicular (SOF) y con celo natural (CN) en la producción de embriones para transferencia en vacas Holstein. Se seleccionaron 20 vacas como donadoras con una condición corporal (CC) de 2,75-3,5; edades entre 40 y 60 meses; ciclos sexuales regulares; uno-dos servicios por gestación anterior y sin problemas reproductivos. Se aplicaron dos protocolos de superovulación: con SOF y CN. No se obtuvo evidencia que el número de embriones producidos con SOF fuera mayor al número de embriones producidos con CN en los estadios de blastocito y mórula.

Palabras clave: *embriones, blastocisto, mórula, superovulación*

Assessment of two Superovulation Protocols for Embryo Production in Holstein Cows

ABSTRACT

The aim of this paper was to compare the effects of two superovulation protocols: synchronization of the follicular wave (SFW), and natural estrus (NE) induction of embryos produced for transference in Holstein cows. Twenty cows were chosen as donors, with body condition (BC) of 2.75-3.5; 40-60 months old; 1-2 previous services per gestation, and without reproductive problems. Two superovulation protocols were applied: SFW and NE. SFW was not observed to produce more embryos than the NE in the blastocyst and morula stages.

Key words: *embryos, blastocyst, morula, superovulation*

INTRODUCCIÓN

Los protocolos superovulatorios implican tiempo y esfuerzo, siendo procesos que han favorecido el desarrollo de la transferencia de embriones para programas de mejoramiento genético que han logrado un aumento significativo en la producción de embriones transferibles, lo que se ha demostrado en diferentes trabajos de campo con bovinos de razas lecheras y de doble propósito (Callejas *et al.*, 2008; Bo, Guerrero y Adams, 2008).

Se usan progestágenos combinados con estrógenos para protocolos de SOV, que se pueden comparar al método que usa como referencia el celo natural (Carballo *et al.*, 2009; Baruselli *et al.*, 2015; Soria *et al.*, 2017). Los protocolos SOV combinados con GnRH al momento de la Inseminación Artificial (IA), aseguran la ovulación para conseguir mayor número de estructuras transferibles (Chankitisakul *et al.*, 2017).

Independiente del momento del ciclo estral y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), la superovulación ha tenido un impacto positivo en la aplicación comercial de estrategias de transferencia embrionaria, porque han facilitado los protocolos de trabajo; sin embargo, todavía existen problemas (condición individual o altas temperaturas) que conllevan una falta de respuesta superovulatoria. El método comúnmente utilizado para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la SOV consiste en la aplicación de dispositivos con progesterona y estradiol parenteral (Barros *et al.*, 2008; Carballo *et al.*, 2009; Baruselli *et al.*, 2015).

La transferencia de embriones (TE) tiene como objetivo incrementar la descendencia de alto valor genético, utilizando esquemas de superovulación (SOV) por la sincronización de ondas foliculares (SOF), para lo cual se induce el celo en las donantes y receptoras de embriones (Callejas *et al.*, 2008; Bo y Mapletof, 2014), con el objetivo de producir ovocitos fértiles de las donantes que luego se inseminan y los embriones producidos serán transferidos a receptoras o preservados de manera segura (Becaluba, 2007).

En este sentido, el objetivo del trabajo fue comparar la respuesta a la superovulación con sincronización de la onda folicular (SOF) y con celo natural (CN) para la producción de embriones transferibles en 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. Se seleccionaron 20 vacas Holstein y se formaron 2 grupos de 10 animales de acuerdo a los siguientes parámetros: condición corporal (en el rango de 2,75 a 3,5); edad entre 40 y 60 meses; ciclos estrales regulares, con un mínimo de 60 días abiertos y sin problemas reproductivos previa evaluación ginecológica y ecográfica.

Se aplicaron dos protocolos de superovulación (SOV) con sincronización de la onda folicular (SOF) y celo natural (CN) para los grupos 1 y 2, respectivamente, según lo descrito por Soria *et al.* (2017).

Siete días después de la primera IA, en los dos grupos se verificó la superovulación mediante control ecográfico de los ovarios. La colecta de embriones se realizó de acuerdo con la técnica establecida que incluye: lavado de la región perineal, desinfección de la zona lumbosacra y aplicación de clorhidrato de lidocaína para anestesia epidural baja. Se introdujo la sonda Foley vía vaginal, se atravesó el cérvix y el extremo anterior de la sonda se dirigió hacia el cuerno ipsilateral del ovario que presenta mayor número de cuerpos lúteos, ubicando el extremo anterior a 5 cm en sentido craneal de la bifurcación de los cuernos uterinos y se infló el balón de la sonda de acuerdo al tamaño del cuerno uterino.

Se conectó a la solución fosfato buffer de lavado (PBS) un extremo de la sonda en "Y" y el otro extremo al filtro en donde se recibieron los embriones, el líquido filtrado se colectó en un recipiente graduado para medir el volumen extraído y asegurar que la cantidad que ingresó sea la saliente. Una vez colocada la sonda Foley en el lugar adecuado se retiró el mandril y se conectó con el extremo libre del tubo en "Y". El lavado se realizó introduciendo 50 mL del medio de colección (PBS) por vez, el mismo que estuvo temperado a 37,5° C, se cerró el clamp de entrada hasta completar 500 mL por cuerno uterino.

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 Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

Se obtuvieron las estadísticas descriptivas de las variables estudiadas con los intervalos de confianza al 95 % y se efectuaron las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk (para determinar la normalidad de los datos) y para comparar las medias de los tratamientos se utilizó la "t" de Student para muestras independientes, con y sin varianzas homogéneas (según la prueba de Levene).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tres variables estudiadas se distribuyeron normalmente, según la prueba de Shapiro Wilk para muestras pequeñas, obteniéndose en todos los casos valores de $P > 0,05$ (en el rango de 0,114 a 0,952).

Es de fundamental importancia una comprensión del funcionamiento de la dinámica folicular y sus mecanismos de autorregulación a los efectos de comprender las bases de las nuevas alternativas de control del ciclo estral en la hembra bovina que permitan la sincronización de la onda folicular y maximizar su aprovechamiento para producir y transferir exitosamente embriones bovinos (Baruselli *et al.*, 2006; Small, Colazo, Kastelic, Mapletoft, 2009; Amaya, 2010; Bo y Mapletoft, 2014; Hasler, 2014).

El protocolo usado para SOF incluye: control de la onda folicular desde su inicio (emergencia) para reclutar folículos y evitar su atresia con E2 y P4; y crecimiento simultáneo de varios folículos con FSHp para producir mayor cantidad de embriones. En esta investigación al comparar el tratamiento SOV en el que se consideró SOF y CN en cuanto al total de embriones recuperados la diferencia de 4 embriones en la media a favor del tratamiento SOF no fue significativa. Es pertinente considerar que, al comparar los valores máximos entre los tratamientos, la SOF mostró una ventaja numérica de 6 embriones sobre el CN (Tabla 1).

Tabla 1. Embriones obtenidos por tratamiento de sincronización de la onda folicular (SOF) y celo natural (CN)

	Tratamiento														Sig.
	SOF					IC (95 %)				CN					
	Media	EE	Med	Min	Max	LI	LS	Media	EE	Med	Min	Max	LI	LS	
Embriones totales (unidades)	12	1,8	12	4	20	7,6	15,6	8	0,9	8	4	14	5,9	10,1	N/S

N/S = no hay diferencias significativas según la prueba "t de Student" (P = 0,095)

EE = error estándar; Med = mediana; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; IC = intervalo de confianza

Estos resultados coinciden con lo que reportan Bo, Guerrero y Adams (2008) y otros autores como Steel y Hasler (2009). En los cuales tampoco se observaron diferencias significativas entre las medias de embriones totales para SOF y CN.

En la actualidad para la superovulación existen varios métodos de sincronización y control de la onda folicular que permiten realizar las inseminaciones a tiempo fijo (Bravo, 2017); estos han sido probados en vacas Holstein en producción con resultados repetibles en cuanto a número y calidad de embriones obtenidos, incluso con la posibilidad de combinarlo con semen sexado (Soares *et al.*, 2011) permitiendo escoger las horas de inseminación según el tiempo en el que se esperan las ovulaciones (Argudo *et al.*, 2016), corroborando los resultados, pues se evidencia el potencial del control de la onda folicular en la superovulación y obtención de embriones.

Singh, Domínguez, Jaiswal y Adams (2004) y Vieira *et al.* (2014) observaron que el número de folículos al inicio de una onda folicular se correlaciona positivamente con la respuesta superovulatoria (SOV) y con embriones de excelente calidad, en esto influyen también los estadios de evolución citológica que son cosechados los embriones lo que concuerda con esta investigación, donde se obtuvo mayor número y calidad de embriones con el protocolo SOF.

En cuanto al número de embriones en estado de blastocisto no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. En la producción máxima de blastocistos, las vacas con SOF superaron en más del doble a la producción máxima de blastocistos de las vacas con CN, lo cual demuestra la alta variabilidad de la condición individual (Tabla 2).

Tabla 2. Número de embriones en estado de blastocisto por SOF frente CN

	Tratamiento														Sig.
	SOF					IC (95 %)				CN					
	Media	EE	Med	Min	Max	LI	LS	Media	EE	Med	Min	Max	LI	LS	
Blastocistos (unidades)	8	1,6	7	2	15	3,9	11,6	4	0,6	5	1	6	2,9	5,5	N/S

N/S = no hay diferencias significativas según la prueba "t de Student" (P = 0,07)

EE = error estándar; Med = mediana; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; IC = intervalo de confianza

En algunos trabajos se ha reportado que el control de la emergencia de ondas foliculares mediante su ablación o los folículos dominantes, guiada por diversos tratamientos para lograr la emergencia de una nueva onda folicular son los más usados para la SOV (Bo, Guerrero y Adams, 2008; Amaya, 2010; Baruselli *et al.*, 2015).

En este trabajo no se realizó la transferencia de blastocistos, pero Bo y Mapletof (2014) reportaron mayor eficiencia en los resultados de la transferencia total de embriones a las receptoras, medidos en las gestaciones y partos logrados con embriones al estado de blastocisto obtenidos por SOF comparado con CN.

Pérez (2011) encontró mayor cantidad de embriones transferibles con el tratamiento experimental SOF, observando que la mayor proporción de estos embriones fueron de calidad 1, lo que confirma los resultados del presente estudio en cuanto al total de estructuras viables colectadas y a su calidad.

Spencer y Bazer (2004) indican que la mórula es un estadio de embrión temprano formado por una masa compacta de blastómeras con poblaciones de células internas y externas; las células de la parte interna

desarrollan uniones en muro que facilitan la comunicación intercelular y permiten que estas permanezcan persistentes ya que desarrollan adherencias célula-célula.

Con relación al estadio de mórula, forma temprana de embriones transferibles, los tratamientos Grupo 1 SOF y Grupo 2 CN no evidencian diferencia estadística significativa; esto muestra que en ese estadio no influye ninguno de los tratamientos (Tabla 3).

Comentario [D1]: las células de la parte interna desarrollan uniones en muro que facilitan la comunicación intercelular y permiten que estas permanezcan, pues desarrollan adherencias célula-célula.

Comentario [D2]: Se propone eliminar

Tabla 3. Efecto del tratamiento SOF versus CN en la producción de embriones en estado de mórula

	Tratamiento														Sig.
	SOF					IC (95 %)				CN					
	Media	EE	Med	Min	Max	LI	LS	Media	EE	Med	Min	Max	LI	LS	
Mórulas (unidades)	4	1,2	3	1	11	0,7	6,3	3	0,4	3	1	4	1,8	4,4	N/S

N/S= No hay diferencias significativas según la prueba "t de Student" (P = 0,57)

EE = error estándar; Med = mediana; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; IC = intervalo de confianza

López *et al.* (2008) y Baruselli *et al.* (2015) recomiendan transferir mórulas compactas que estén formadas por células que interactúen entre sí, lo que les permitirá seguir su desarrollo embrionario. En este estudio se produjeron mórulas por SOF y por CN que son transferibles y con probabilidades de implantarse.

En este trabajo las vacas que recibieron el tratamiento SOF produjeron mayor cantidad de blastocistos y mórulas de calidad; por lo tanto, dieron mejor respuesta al tratamiento, lo que está correlacionado positivamente con la cantidad y la calidad de estructuras producidas. Estos resultados coinciden con los de Baruselli *et al.* (2006).

Amaya (2010) señala que de una hembra donante se obtienen estructuras que conservan su zona pelúcida en estadios de mórula, mórula compacta o blastocisto a los seis días y medio o siete días de desarrollo. En nuestro estudio se obtuvieron mórulas con tratamiento SOF y CN sin diferencia significativa a los siete días.

CONCLUSIONES

No se obtuvo evidencia que el número de embriones producidos con SOF fuera mayor al número de embriones producidos con CN en los estadios de blastocito y mórula.

REFERENCIAS

- AMAYA, A. (2010). *Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos*. Recuperado el 12 de abril de 2012, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/3775/1/780174.2010.pdf>.
- ARGUDO, D. E.; SORIA, C. A.; DURÁN, J. C.; BRAVO, S. E., ALVARADO, J. P. y ALBERIO, R. H. (2017). Setting Time of Artificial Insemination of Superovulated Lactating Holstein Cows with Sex-Sorted Sperm. *Animal Reproduction*, 14 (1), 286-286.
- BARROS, C. M.; BARCELOS, A. C.; GOUVEA, L. M.; MENEGHEL, M.; BARCELOS, D. S.; BARCELOS, L. N. *et al.* (2008). Improvement of a Superovulatory Protocol in Nelore Cows: Replacing the Last Two Doses of pFSH by eCG. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20 (1), 152-155.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FHILO, M.; MATINS, C. M.; NASER, L. F.; NOGUEIRA, M. E., BARROS, C. M. *et al.* (2006). Superovulation and Embryo Transfer in *Bos indicus* Cattle. *Theriogenology*, 65 (1), 77-88.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; VIEIRA, L. M.; KONRAD, J. L.; CRUDELI, G. A. (2015). Aplicación de biotecnologías para una mayor producción de terneros, *Rev vet*, 26 (2), 154-159.
- BECALUBA, F. (2007). *Factores que afectan la superovulación en bovino*. Recuperado el 13 de mayo de 2011, de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf.
- BÓ, G.A.; GUERRERO, D. y ADAMS, G. P. (2008). Alternative Approaches to Setting up Donor Cows for Superstimulation. *Theriogenology*, 69 (1), 81-87.
- BO, G y MAPLETOF, R. (2014). Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *Spermova*, 1 (1), 26-33.

M. E. Soria; C. A. Soria; Silvana Méndez; D. Argudo; G. Serpa; C. Torres; A. Galarza

- BRAVO, S. (2017). *Efecto de la bST aplicada al inicio de un programa superovulatorio con FSHp y al momento de la inseminación artificial sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones transferibles en vacas mestizas*. Tesis de maestría, Universidad de Cuenca, Azuay, Ecuador.
- CALLEJAS, S.; CABODEVILA, J.; PALMA, G.; ALBERIO, R. H.; TORQUATI, S.; BUTLER, H. *et al.* (2008). Evaluación de los Embriones Bovinos. En *Memorias del curso de superovulación y transferencia de embriones bovinos*. Mar del Plata, Argentina: INTA Balcarce
- CARBALLO, D.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO R.; TRÍBULO, H. y BÓ G.A. (2009). Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. *Reprod. Fertil. Dev.*, 21 (1), 242-243.
- CHANKITISAKUL, V.; PITCHAYAPIPAKUL, J.; CHUAWONGBOON, P.; RAKWONGRIT, D.; SAKHONG, D.; BOONKUM, W. *et al.* (2017). Comparison of three Superovulation Protocols with or without GnRH Treatment at the Time of Artificial Insemination on Ovarian Response and Embryo Quality in Thai Native Heifers. *Tropical animal health and production*, 49 (3), 633-639.
- HASLER, J. F. (2014). Forty Years of Embryo Transfer in Cattle: A Review Focusing on the Journal the Growth of the Industry in North America, and Personal Reminiscences. *Theriogenology*, 81 (1), 152-169.
- LÓPEZ, A. P.; GÓMEZ, L. F.; RUIZ, Z. T.; OLIVERA, M. y GIRALDO, C. A. (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta Veterinaria*, 28 (1), 1-6.
- PÉREZ, L. (2011). *Evaluación de la respuesta superovulatoria utilizando la ablación folicular como alternativa para la inducción del crecimiento de una nueva onda folicular en donadoras Brahman*. Recuperado el 10 de mayo de 2013, de <http://iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/TESIS%20IRAC%20-%20PEREZ%20SANDOVAL.pdf>.
- SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R. y ADAMS, G. P. (2004). A Simple Ultrasound Test to Predict the Superstimulatory Response in Cattle. *Theriogenology*, 62 (1), 227-243.
- SMALL, J. A.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P. y MAPLETOFT, R. J. (2009). Effects of Progesterone Presynchronization and eCG on Pregnancy Rates to GnRH-based, Timed-AI in Beef Cattle. *Theriogenology*, 71 (1), 698-706.
- SORIA, M. E.; SORIA, C. A.; ARGUDO, D.; SERPA, G.; MÉNDEZ, S.; TORRES, C. *et al.* (2017). Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Revista de Producción Animal*, 29 (1), 40-43.
- SOARES, J. G.; MARTINS, C. M.; CARVALHO, A. T.; NICACIO, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; CAMPOS FILHO, E. P. *et al.* (2011). Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with Bos indicus and Bos taurus superovulated donors. *Animal Reproduction Science*, 127 (3-4), 148-153.
- SPENCER, T. E. y BAZER, F. W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2 (1), 49.
- STEEL, R.G., HASLER, J. F. (2009). Comparison of three Different Protocols for Superstimulation of Dairy Cattle. *Reprod Fertil Dev*, 21 (1), 246-246.
- VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; MENDANHA, M. F.; Sá FILHO, M. F.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H. *et al.* (2014). Donor Category and Seasonal Climate Associated with Embryo Production and Survival in Multiple Ovulation and Embryo Transfer Programs in Holstein Cattle. *Theriogenology*, 82 (2), 204-212.

Recibido: 10-1-2018

Aceptado: 16-1-2018