

CONTROL DEL DESARROLLO FOLICULAR Y SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN DE DONANTES DE EMBRIONES

Bó, G. A.(1) y R. J. Mapletoft (2). 1999. Taurus, 1(4):14-27.

(1) Fac. Cs. Agrop., Univ. Católica de Cba., Argentina; Inst. Reprod. Animal Cba. (IRAC).

(2) Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Transplante embrionario](#)

RESUMEN

La variabilidad en la producción de embriones viables por la donante sigue siendo el mayor problema de la transferencia de embriones. No obstante, las respuestas superovulatorias pueden aumentarse y la variabilidad disminuirse si se realizan los tratamientos con gonadotrofinas al comienzo de la onda folicular, antes de la selección del folículo dominante. Para esto se pueden realizar ultrasonografías diarias o utilizar tratamientos que sincronicen el desarrollo folicular. Existen métodos mecánicos como la aspiración de todos los folículos ≥ 5 mm presentes en el ovario o tratamientos hormonales con progestágenos más estradiol. El intervalo entre el tratamiento y el inicio de la superovulación es de 4 días si utilizamos 5 mg de E-17B ó 2,5 mg de EB combinados con 50 mg de P4 y de 5 ó 6 días con 3 mg de norgestomet y 5 mg de EV. Para que el tratamiento con estradiol sea efectivo, se debe esperar un día para inyectar el estrógeno después de la colocación de un progestágeno (CIDR-B o SMB) o administrar progesterona o progestágeno inyectable junto con el estradiol, en el momento que se coloca el implante. Además del control del desarrollo folicular se podría controlar la ovulación mediante la utilización del agonista de la GnRH deslorelina y la administración de LH porcina. La posibilidad de independizarse del ciclo estral y poder programar grupos de donantes llevará a facilitar la aplicación de la técnica de transferencia de embriones y a disminuir los costos logísticos.

INTRODUCCIÓN

La transferencia embrionaria es la técnica más utilizada en el mundo para reproducir hembras de alto valor genético. Sin embargo, los mayores inconvenientes que se presentan en los programas de selección es la necesidad de comenzar la superestimulación en un momento determinado del ciclo estral y la poca consistencia en la producción de embriones viables por las donantes, sobre todo cuando se considera que entre un 20 y 30 % de las donantes no produce ningún embrión transferible. Esta variabilidad puede estar influenciada por factores relacionados con el tratamiento superestimulador o en mayor medida por factores individuales asociados a las características de la dinámica folicular ovárica.

Esta revisión tendrá como objetivo presentar los trabajos realizados en los últimos años para tratar de simplificar los protocolos de superestimulación y, a su vez, obtener un mayor número de embriones por tratamiento mediante el control de la dinámica folicular ovárica.

DINÁMICA FOLICULAR Y SUPEROVULACIÓN TRADICIONAL

Experimentos y pruebas de campo realizados durante la década del 80 llevaron a la conclusión general que los tratamientos superestimuladores comenzados durante los días 9 ó 10 después de detectarse el celo resultan en una mejor respuesta superovulatoria que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (día 12 o 13). Esto es debido a que durante el ciclo estral bovino hay 2 o 3 (a veces 4 en el cebú) ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza, en promedio, entre los días 9 y 10. No obstante, hay una gran variación individual y la segunda onda puede comenzar más temprano (día 6) o más tarde (día 12).

Estudios realizados durante los últimos 5 años han demostrado claramente que los tratamientos superovulatorios deben iniciarse al comienzo de una onda de desarrollo folicular, antes de la selección del folículo dominante, para obtener la mejor respuesta posible. La respuesta superovulatoria fue significativamente mayor cuando los tratamientos se iniciaron el día antes o el día de comienzo de la onda folicular (ya sea de la primera o segunda onda) que los tratamientos iniciados 1 o 2 días después. Si tenemos en cuenta estos resultados, la probabilidad que el comienzo de la superestimulación coincida con el inicio de la onda folicular es menor al 20 % (1 de 5 o 7 días) y significa que el 80-90 % de las veces no iniciamos los tratamientos superovulatorios en el período óptimo. Además, la necesidad de sincronizar el celo previo (o "base") en grupos de donantes para comenzar los tratamien-

tos 8 a 12 días después, implica mayor trabajo del personal, más demora en la programación y el riesgo de una dispersión de celos que obligue a colectar embriones en distintos días. Una alternativa viable para lograr una mejor respuesta superovulatoria y obviar los problemas logísticos de programación, es controlar la dinámica folicular y comenzar los tratamientos en el momento más oportuno (que el veterinario disponga, no la vaca).

CONTROL DEL DESARROLLO FOLICULAR Y SUPEROVULACIÓN

Hay varios métodos por los cuales se puede controlar la dinámica folicular del bovino. La mayoría de los tratamientos estudiados han sido orientados hacia la eliminación del efecto del folículo dominante (por métodos físicos u hormonales) y de esta manera permitir el comienzo de una nueva onda folicular en un determinado período conocido. Un método mecánico es la aspiración de todos los folículos mediante ultrasonografía transvaginal (también llamado ablación folicular) que resulta en el comienzo sincrónico de una onda folicular 1,5 días después. Dentro de los métodos hormonales se ha reportado la utilización estrógenos y progestágenos que inducen la supresión de los folículos antrales presentes.

ABLACIÓN FOLICULAR

Como se mencionó anteriormente, la ablación folicular resulta en el comienzo sincrónico de una onda folicular 1,5 días después. Sobre la base de estos resultados preliminares se diseñaron experimentos para evaluar la respuesta superovulatoria de la onda folicular sincronizada mediante la ablación. Las vaquillonas del Grupo Control (esquema tradicional) recibieron una dosis de PGF (500 mcg cloprostenol, Estrumate, Coopers Agropharm) y fueron superestimuladas entre los días 8 a 12 después del celo. En las vaquillonas del Grupo Ablación se aspiraron todos los folículos ≥ 5 mm presentes en el ovario y al mismo tiempo se colocó un implante de norgestomet (SMB; Syncro-Mate-B, Merial; sin la porción inyectable) para controlar la fase luteal y se inició la superestimulación un día después. Los animales recibieron una sola inyección subcutánea (sc) detrás de la paleta de Folltropin-V (400 mg NIH-FSH-PI; Vetrepharm Canadá Inc.), se administró PGF a las 48 y 60 h de la inyección de Folltropin-V y se inseminó artificialmente (IA) 60 y 72 h después de la primera PGF. Los embriones fueron colectados 7 días después de la primera IA (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta superovulatoria (media \pm ES) en vaquillonas de carne superestimuladas en los días 8 a 12 del ciclo estral o vaquillonas tratadas 1 día después de la ablación de todos los folículos ≥ 5 mm presentes en el ovario.

	Control	Ablación más progestágeno
n	16	17
CL	19,7 \pm 2,4	18,0 \pm 2,6
(varianza)	(124)	(221)
Vaq. con < 2 CL	1	0
Ovocitos/embriones totales	10,9 \pm 2,3	10,7 \pm 1,8
(varianza)	(82)	(69)
Fertilizados	8,3 \pm 2,2	7,6 \pm 1,3
(varianza)	(76)	(50)
Transferibles	6,6 \pm 2,1	5,9 \pm 1,1
(varianza)	(70 ^b)	(38 ^a)

Medias y porcentajes no difieren significativamente.
 ab - En el grupo de Ablación hubo una varianza menor en el número de embriones transferibles (P<0,03).

Si bien no hubo diferencias significativas entre los grupos, las respuestas de las vaquillonas en el Grupo Ablación fueron significativamente menos variables que las del Grupo Control. Se debe recordar además que la ablación folicular fue realizada en cualquier momento del ciclo, por lo tanto utilizando este procedimiento no es necesario sincronizar a las donantes antes de empezar un programa de superovulación.

La aspiración folicular también fue utilizada en otros laboratorios en esquemas más rígidos en relación al ciclo estral. En uno de estos estudios la aspiración del folículo dominante en el día 6, 7 u 8 del ciclo (2 días antes de comenzar la superestimulación) resultó en una respuesta significativamente mayor que la de vacas superestimuladas en el mismo período del ciclo estral, pero con la presencia del folículo dominante.

UTILIZACIÓN DE ESTRÓGENOS Y PROGESTÁGENOS

La posibilidad del uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto supresor de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotropinas. Los primeros estudios tuvieron como objetivo determinar la eficacia del tratamiento con progestágeno y Estradiol-170 (E-170) para suprimir el desarrollo del folículo dominante y de esta manera sincronizar el desarrollo de una nueva onda folicular. Las conclusiones más importantes fueron: 1) el tratamiento con progestágeno y E-17B, administrado en cualquier momento del ciclo estral, induce el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular, aproximadamente 4,3 días después y 2) el E-17B suprime el desarrollo folicular cuando es administrado un día después de la inserción de los implantes de progestágeno, o cuando es administrado en el mismo momento de la inserción del implante pero en combinación con progesterona inyectable.

Obtenidas las conclusiones mencionadas se realizó una serie de experimentos para evaluar la respuesta superovulatoria en vacas y vaquillonas previamente tratadas con progestágenos y E-17B. Estos trabajos incluyeron experimentos controlados y evaluaciones de resultados de campo ya presentados en detalle en una revisión anterior y por cuestiones de espacio nos referiremos a los puntos más importantes. Se utilizaron vacas o vaquillonas de razas carniceras o lecheras y el tratamiento en estudio consistió en la colocación de un dispositivo de liberación lenta de progestágeno (SMB o CIDR-B) en momentos no conocidos del ciclo estral (denominado arbitrariamente día 0), 5 mg de E-17B a las 24 h (día 1) y la superestimulación con Folltropin-V se inició en el día 5 (4 días después del E-17B). Los animales superestimulados de acuerdo al método tradicional recibieron una inyección de PGF para sincronizar el "celo base" y fueron superestimulados entre los días 8 a 12 después del celo. Los resultados combinados de dos experimentos y dos evaluaciones de campo en las cuales se compararon estos dos tratamientos están resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Respuesta superovulatoria (medias) en vacas y vaquillonas de carne y leche superestimuladas en los días 8 a 12 pos celo (Tratamiento Tradicional) y vacas con dispositivos con progestágenos y E-17 β .

	Tratamiento Tradicional	Progestágenos + E-17 β
n	128	142
Ovocitos/embriones totales	8,5	10,1
Fertilizados	6,4	7,7
Transferibles	4,8	5,5

Se indican las medias solamente y no se realizó una comparación estadística debido al origen diferente de los datos. Dos trabajos encontraron un mayor número de embriones transferibles y en los otros dos no hubo diferencias significativas. Tal vez es interesante destacar que en los trabajos a campo se observó una tendencia hacia un menor porcentaje de animales tratados con progestágeno y E-17B que no produjeron ningún embrión transferible (16/123, 13%) que en los superestimulados siguiendo el esquema tradicional (24/111, 22%).

Programas de este tipo están siendo utilizados por distintos profesionales y algunos resultados de ellos se presentan en esta sección. Lewis y Trouson realizaron una experiencia de campo en la que se utilizaron un total de 58 animales en 6 establecimientos de Victoria (Australia). En este protocolo, los animales recibieron 2 inyecciones de PGF cada 11 días. Seis días después de la última PGF, las vacas recibieron un dispositivo intravaginal de progesterona CIDR-B (InterAg, Nueva Zelanda). A los 3 días de colocado el CIDR-B la mitad de las donantes recibieron una inyección intramuscular (im) de 5 mg de E-17B mientras que la otra mitad de los animales no recibieron la inyección de E-17B. Todas las donantes fueron superestimuladas 7 días después de colocado el CIDR-B (o 4 días post E-17B). Los resultados que se encuentran en la Tabla 3 muestran que los animales que recibieron E-17B tuvieron una tendencia ($P=0,061$) a producir un número mayor de embriones transferibles.

Tabla 3. Respuesta superovulatoria (medias \pm ES) de vacas de carne tratadas con CIDR-B y E-17 β .

	CIDR-B + E-17 β	CIDR-B solo
n	29	29
Ovocitos/embriones totales	10,2 \pm 1,6 ^a	6,4 \pm 1,1 ^b
Ovocitos fertilizados	8,1 \pm 1,4 ^a	4,6 \pm 0,9 ^b
Embriones transferibles	6,5 \pm 1,1 ^a	3,9 \pm 0,8 ^b
Donantes con "0" embriones transferibles	3/29 (10%)	9/29 (31%)

ab - medias con distintas letras difieren (P=0,06)

En otro experimento realizado en Argentina se evaluó la respuesta superovulatoria de donantes comerciales de embriones superestimuladas utilizando los dispositivos intravaginales de progesterona CIDR-B y E-17B. Los datos corresponden a 138 superovulaciones en vacas donantes de las razas Holando Argentino (n= 115) y Jersey (n=23). Las donantes del Grupo CIDRB+E-17B recibieron el CIDR-B en momentos no conocidos del ciclo estral (día 0), 5 mg de E-17B (disuelto en 2 ml de aceite de girasol) por vía im en el día 1 y fueron superestimuladas a los 4 días del E-17B (día 5). Las donantes tratadas tradicionalmente (Grupo Tradicional) fueron superestimuladas entre 8 a 12 días después de detectado el celo. Todas las vacas recibieron 400 mg NIH-FSH-PI de Folltropin-V (20 ml; Vetrepharm Canadá Inc.) en 4 dosis decrecientes (4, 3, 2 y 1 ml) administradas im cada 12 h y por 4 días. A las 48 h de comenzada la superestimulación todos los animales recibieron una inyección de PGF y se retiró el CIDR-B, 12 h después. Las donantes fueron IA a las 12 y 24 h de comenzado el celo. Los embriones fueron colectados a los 7 días del celo y fueron clasificados como ovocitos/embriones totales, ovocitos fertilizados y embriones transferibles. Los datos obtenidos fueron analizados por el test t de Student. El porcentaje de animales que no produjo ningún embrión transferible (Donantes con "0" embriones) fue analizado por el test de Chi cuadrado. Los resultados se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Respuesta superovulatoria (medias \pm ES) de vacas de carne tratadas con CIDR-B y E-17.

	CIDR-B + E-17	Tradicional
n	75	63
Ovocitos/embriones totales	8,5 \pm 0,7	8,3 \pm 0,7
Fertilizados	6,3 \pm 0,6	6,5 \pm 0,7
Transferibles	4,8 \pm 0,5	5,4 \pm 0,6
% Donantes con "0" embriones transferibles	10/75 (13%)	11/63 (17%)

Medias y proporciones no difieren significativamente (P>0,1).

Para resumir, estos experimentos demuestran que el tratamiento de progestágeno más E-17B resulta en el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular, que comienza en promedio 4,3 días después. Utilizando este tratamiento se puede sincronizar el desarrollo folicular en un grupo de donantes, sin importar el estadio del ciclo en que se encuentran. Los tratamientos comenzados en el momento del inicio de la nueva onda folicular (4 días pos E-17B) resultan en una respuesta comparable o superior a la de los tratamientos iniciados de la manera tradicional. Este procedimiento tiene la ventaja de poder elegir el momento para realizar la colección y facilita la programación de grupos de donantes en un determinado establecimiento.

1. PREPARADOS COMERCIALES

Los trabajos anteriormente descritos demuestran la efectividad en la utilización de tratamientos con E-17B y progestágenos en programas de superovulación. El mayor inconveniente del E-17B es que no se encuentra disponible como preparado comercial en el mercado argentino y hay que prepararlo especialmente a partir de la droga pura (-estradiol E-8875, Sigma Chemical Company, USA). El objetivo de los experimentos que se presentan a continuación fue evaluar distintos estrógenos disponibles en el mercado.

A) VALERATO DE ESTRADIOL

El valerato de estradiol (EV) es un estrógeno de vida media larga que se encuentra disponible en el mercado asociado con implantes que contienen el progestágeno sintético norgestomet. Estos preparados comerciales son el Syncro-Mate-B (SMB, Merial) y el Crestar (Intervet Int.) y consisten en un implante de liberación lenta de norgestomet que se coloca se en la oreja del animal, y una solución inyectable oleosa que contiene 3 mg de norgestomet (N) y 5 mg de EV. Originalmente se recomendaba comenzar los tratamientos superestimuladores a los 7 días de aplicado el implante en la oreja y de administrada la inyección im de N+EV. Sin embargo se observó por ultrasonografía que los folículos presentes en el momento del tratamiento (SMB y la inyección de N+EV) disminuyeron su tamaño por un período de 5 días, para luego volver a aumentar, aparentemente debido al crecimiento de una nueva onda folicular. Basados en los resultados de este trabajo, muchos profesionales comenzaron los tratamientos superestimuladores a los 5 días pos EV. En un ensayo de campo se comparó la producción de embriones de donantes superestimuladas de la manera tradicional, comenzando los tratamientos en los días 8 a 12 después del celo, con vacas tratadas con SMB y la inyección de N+EV (Grupos SMB+EV) y que fueron superestimuladas 5 o 7 días después. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Respuesta superovulatoria (medias \pm ES) en vacas de carne superestimuladas en los días 8 a 12 pos celo y vacas con implantes de SMB y tratadas con la inyección im de N+EV.

	Control	SMB+EV (5 d)	SMB+EV (7 d)
n	60	61	49
Ovocitos/embriones totales	12,0 \pm 1,0	13,0 \pm 1,0	7,8 \pm 1,1
Fertilizados	9,6 \pm 1,0 ^a	11,3 \pm 1,0 ^a	5,3 \pm 0,8 ^b
Transferibles	6,9 \pm 0,7 ^b	9,6 \pm 0,9 ^a	3,7 \pm 0,6 ^c

abc - Medias con distintas letras son diferentes ($P < 0.05$)

Como se puede ver claramente en la Tabla 5, los animales tratados a los 5 días pos SMB+EV tuvieron un número mayor de embriones transferibles que las donantes en los otros 2 grupos.

En otro trabajo de campo se superestimularon un total de 248 donantes en un período de 6 meses. Antes de comenzar cada programa todas las vacas fueron tratadas con PGF. Las vacas que mostraron celo dentro de las 48-96 h pos PGF fueron superestimuladas siguiendo el protocolo tradicional (8 a 12 días pos celo). Todos los animales que no fueron observados en celo recibieron el implante de SMB más N+EV y fueron superestimulados 4 o 5 días después. No se encontraron diferencias significativas en el número de embriones transferibles entre los animales tratados convencionalmente ($7,05 \pm 1,0$) y los tratados con SMB y superestimulados 4 días ($6,38 \pm 0,8$) o 5 días ($6,38 \pm 0,8$) después. En esta comparación hay que considerar que los animales tratados con SMB+EV no fueron vistos en celo y por lo tanto podrían haberse incluido algunos "animales problema". Nuevamente aquí lo más importante es que los programas de superovulación a campo se pudieron realizar con una buena coordinación y este esquema práctico es actualmente utilizado por numerosos profesionales.

En un trabajo reciente, se evaluó la respuesta superovulatoria de donantes de embriones comerciales de razas de carne ($n=181$) y leche ($n=219$) superestimuladas durante 1997 utilizando los dispositivos CIDR-B (Eazy-Breed, Boehringer-Ingelheim) y Syncro-Mate-B (SMB, Merial) o por el protocolo tradicional. Las donantes tratadas tradicionalmente fueron superestimuladas con Folltropin-V (Vetrepharm Canadá Inc.) entre 8 a 12 días después de detectado el celo. Las otras donantes recibieron, en momentos no conocidos del ciclo estral (día 0), 2 implantes subcutáneos de SMB o un dispositivo vaginal CIDR-B. En el mismo momento que se colocaron los SMB o CIDR-B las vacas recibieron una inyección im de 5 mg de Valerato de Estradiol (EV) y 3 mg de norgestomet (Merial) y fueron superestimuladas con Folltropin-V en el día 5. A las 48 h de comenzada la superestimulación todos los animales recibieron una inyección im de PGF y se retiraron los dispositivos 12 h después. Las donantes fueron IA 12 y 24 h de comenzado el celo. Los embriones fueron colectados a los 7 d del celo y clasificados como ovocitos/embriones totales, ovocitos fertilizados y embriones transferibles. Además, se evaluó el porcentaje de animales que no produjo ningún embrión transferible (donantes con "0" emb. transf.). Los resultados se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Respuesta superovulatoria utilizando CIDR-B o SMB y valerato de estradiol en programas comerciales de transferencia de embriones bovinos.

	n	Ov./emb. Totales	Fertilizados	Transferibles	Donantes con "0" emb. transf.
Trat. Tradicional					
Vacas de Carne	133	13,3	8,0	5,9	23 (17,2%)
Vacas de Leche	65	8,6	5,4	4,6	9 (13,8 %)
Total	198	11,7	7,2	5,5	32 (16,1%)
SMB + (EV+N)					
Vacas de Carne	6	22,3	14,1	8,3	0
Vacas de Leche	112	11,5	8,3	6,8	10 (8,9%)
Total	118	12,5	8,6	6,5	10 (8,4%)
CIDR-B + (EV+N)					
Vacas de Carne	42	17,6	9,6	7,3	5 (11,9%)
Vacas de Leche	42	9,4	6,4	5,6	5 (11,9%)
Total	84	13,5	8,0	6,4	10 (11,9%)

Tomados los datos en general, los tratamientos con CIDR-B y SMB tendieron ($P < 0,08$) a disminuir el porcentaje de superovulaciones donde no se obtuvo ningún embrión transferible comparados con el tratamiento tradicional. Los resultados demuestran que los tratamientos con progestágenos y estrógenos son una alternativa viable y eficiente para sincronizar el desarrollo folicular y superestimular vacas donantes en esquemas comerciales de transferencia de embriones, eliminando la necesidad de sincronizar el celo antes de comenzar la superovulación.

A pesar de que los resultados con EV+N son alentadores, resultados de un experimento realizado durante 1998 tenderían a sugerir que el EV no es tan efectivo para sincronizar el desarrollo folicular como el E-17B. Se trataron vaquillonas de carne con un implante de SMB o un implante de Crestar y a su vez fueron subdivididas para recibir 5 mg de E-17B y 100 mg de P4 o 5 mg de EV y 3 mg de norgestomet. Las inyecciones fueron administradas en el mismo momento de la inserción del implante. Los resultados se encuentran indicados en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto del EV y E-17 en el desarrollo folicular de vaquillonas implantadas con Syncro-Mate-B o Crestar.

	Norgestomet	
	E-17B	EV
n	35	37
Emergencia de onda (media)	3,6±0,1a	5,7±0,2b
Rango	3-4 a	3-6 b

ab- Medias o rangos con letras diferentes difieren ($P < 0,05$)

Como se puede observar, el intervalo tratamiento-onda fue más largo con el EV que con el E-17B y a su vez el comienzo de la onda fue más variable. Basados en estos resultados se diseñó un experimento con el objetivo de comparar el tratamiento de EV + N administrado en el momento de la inserción de 2 implantes SMB (día 0) con el tratamiento de 5 mg E-17B y 100 mg de progesterona en el día 1 de la inserción de los SMB. Se utilizó un grupo de 68 vacas Holstein. La superestimulación fue iniciada en la tarde del día 5 y se utilizaron 400 mg NIH-FSH-PI de Folltropin-V en 8 dosis decrecientes cada 12 h. Todas las vacas recibieron PGF en la mañana y tarde del día 8 y los SMB fueron removidos en la tarde del día 8. Las vacas fueron IA 12, 24 y 36 h después del comienzo del celo y los embriones fueron colectados a los 7 días. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Respuesta superovulatoria (medias \pm ES) en vacas Holstein superestimuladas después de la administración de E-17 β + P₄ o EV + N.

	E-17 β +P ₄	EV + N
n	34	34
CL	10,8 \pm 1,2 a	8,8 \pm 1,3 b
Embriones/ovocitos		
Totales	10,4 \pm 1,1 a	7,5 \pm 1,1 b
Transferibles	5,6 \pm 0,9	4,2 \pm 0,6

ab - Medias con distintas letras difieren ($P < 0,04$)

Los resultados de este experimento muestran que la mayor sincronía de comienzo de onda con el tratamiento de E-17 β + P₄ resultó en un número mayor de embriones colectados.

B) BENZOATO DE ESTRADIOL

El benzoato de estradiol (EB) es otro estrógeno comercial disponible en el mercado (Laboratorio Río de Janeiro). Se realizaron cuatro experimentos para evaluar la efectividad de distintas formas de EB sobre el control del desarrollo folicular. Las conclusiones más importantes fueron las siguientes: 1) El EB suprime el desarrollo folicular cuando es administrado un día después de la inserción de los dispositivos con progestágeno o cuando es administrado en el mismo momento de la inserción del implante combinado con la administración im de 50 o 100 mg de progesterona. 2) De las distintas dosis evaluadas (1 mg, 2,5 mg y 5 mg de EB - todas combinadas con 50 mg de Progesterona) la de 2,5 mg de EB fue la dosis mínima más efectiva, con un intervalo entre tratamiento y comienzo de la nueva onda folicular de 3,9 días (rango 3 a 4 días).

Se diseñó un experimento con el objetivo de comparar el tratamiento de EB+P₄ administrado en el momento de la inserción de los dispositivos intravaginales CIDR-B (Boehringer-Ingelheim) con el tratamiento de E-17 β en el día 1 y un tratamiento alternativo de E-17 β en el cual se administró combinado con 50 mg P₄ en el día 0. Se utilizó un grupo de 15 vacas Aberdeen Angus colorado que fueron superestimuladas tres veces con un intervalo entre tratamientos de 45 días. Para la distribución de los animales en cada réplica, las 15 vacas fueron separadas al azar en 3 grupos y rotadas por cada uno de ellos de forma tal que cada vaca fue tratada una vez por cada uno de los tratamientos y todos los grupos estuvieron igualmente representados en cada réplica. Se colocaron los dispositivos intravaginales CIDR-B y se realizaron los siguientes tratamientos: 5 mg E-17 β im día 1 o, 5 mg E-17 β + 50 mg P₄ im día 0, o 2,5 mg EB + 50 mg P₄ im en el día 0. La superestimulación fue iniciada a los 4 días pos E-17 β o EB y se utilizaron 400 mg NIH-FSH-PI de Folltropin-V en 8 dosis decrecientes cada 12 h. Todas las vacas recibieron PGF 48 h después del inicio de la superestimulación y los CIDR-B fueron removidos 12 h después. Las vacas fueron IA 60 y 72 h pos PGF y los embriones fueron colectados a los 7 días. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Respuesta superovulatoria (medias \pm ES) en vacas Aberdeen Angus superestimuladas 4 días después de la administración de E-17 β o EB.

	E-17 β	E-17 β +P ₄	EB+P ₄
n	15	15	15
CL	13,9 \pm 1,4	11,6 \pm 1,4	15,0 \pm 1,6
Embriones/ovocitos			
Totales	11,5 \pm 2,5	8,1 \pm 1,3	10,5 \pm 1,8
Fertilizados	9,5 \pm 2,2	7,3 \pm 1,1	7,5 \pm 1,3
Transferibles	7,2 \pm 1,8	5,7 \pm 1,0	6,5 \pm 1,0

Los resultados de este experimento muestran que no hubo diferencias significativas, sugiriendo que cualquiera de estos tres tratamientos puede ser usado exitosamente.

Durante este último año estuvimos trabajando en un nuevo protocolo para tratar de mejorar el número de embriones de buena calidad utilizando un tratamiento con gonadotrofina coriónica equina (eCG) antes de comenzar la superovulación. La hipótesis planteada es que la adición de eCG en el mismo momento del pico endógeno de FSH aumentará el número de folículos antrales con capacidad de responder al tratamiento superestimulador, y resultará en un número mayor de embriones por tratamiento. Durante 1998 se superovularon 112 vacas de carne que recibieron un CIDR-B (Boehringer-Ingelheim, Argentina) en combinación con 2,5 mg EB (Laboratorio Río de Janeiro, Argentina) y 50 mg P4 (Laboratorio Río de Janeiro, Argentina) intramuscular (im) en momento no conocidos del ciclo estral (día 0). Las vacas de los grupos eCG recibieron 300 U.I. de eCG en el día 2 o 3 pos CIDR (24 h antes o en el momento esperado del pico endógeno de FSH previo a la onda folicular). Todas las vacas fueron superestimuladas en el día 4 con 400 mg NIH-FSH-PI de FolltropinV (Vetrepharm Canadá Inc, London, ON, Canadá) administrados en forma im y en 8 dosis decrecientes cada 12 h. Se administraron 25 mg de dinoprost (PGF, Lutalyse, Romage, Argentina) 48 y 60 h después del inicio de la superovulación y los CIDR-B fueron removidos junto con la segunda dosis de PGF. Las vacas fueron IA 60 y 72 h después de la primera PGF. Los embriones fueron colectados por método no quirúrgico a los 7 días de la primera IA y evaluados según las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). Los datos cuantitativos fueron analizados por ANOVA y los datos cualitativos fueron comparados por el test de Chi Cuadrado y se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Respuesta superovulatoria (media=ES) en vacas de carne tratadas con CIDR-B, benzoato de estradiol y progesterona, con o sin un pretratamiento con eCG.

	Control	eCG Día 2	eCG Día 3
n	37	37	39
CL	12,8± 1,0	14,9±0,8	12,4 ± 1,1
Total ova/embriones	8,6±0,9	9,9 ± 1,0	7,3 ± 0,8
Fertilizados	6,6 ± 0,9	7,9 ± 0,9	6,4 ± 0,8
Porcentaje de ovocitos fertilizados	78 ^a	80 ^{ab}	87 ^b
Embriones Transferibles	5,7±0,8	6,8 ± 0,8	5,3 ± 0,8
Porcentaje de embriones transferibles	68	69	72

ab - Porcentajes con distinta letra difieren (P>0.001).

No hubo diferencias significativas entre los grupos en la respuesta superovulatoria. Sin embargo, el mayor porcentaje de ovocitos fertilizados en el grupo eCG día 3 sugiere que el pretratamiento con eCG podría tener un efecto beneficioso sobre el índice de fertilización.

SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN

La sincronía de la ovulación también es uno de los problemas reportados como causa de pobre respuesta superovulatoria. Los tratamientos con análogos de la GNRH, hCG o LH utilizados en el momento del celo o de la primera IA han demostrado ser beneficiosos cuando se lo utiliza en "vacas problema", en las que se había observado previamente una gran cantidad de folículos anovulatorios en el momento de la colección. Sin embargo, la utilización masiva de estos agentes no ha resultado ser significativamente beneficioso cuando se lo utiliza sistemáticamente. Recientemente se han reportado experimentos tendientes a programar y sincronizar la ovulación de vaquillonas superestimuladas utilizando un agonista de la GNRH llamado deslorelin. El tratamiento con este agonista de la GNRH produce la saturación ("downregulation") de los receptores de GNRH y de esta forma las vacas tratadas tienen inhibida la secreción pulsátil y el pico preovulatorio de LH. Los resultados de los experimentos preliminares demostraron que si se aplican dos implantes sc de deslorelin (liberan 50 g/día) en vaquillonas Brahman superestimuladas, se inhibe la ovulación. Además, se comprobó que era posible inducir la ovulación mediante la administración exógena de LH porcina (Lutropin-V, Vetrepharm Canadá Inc.), que se produjo entre 24 y 40 h (media 32 h) pos inyección de LH.

Luego se diseñó un experimento para evaluar la utilización de este protocolo en la sincronización de la ovulación de vaquillonas superestimuladas. Se utilizaron 15 vaquillonas Brahman que fueron divididas en dos grupos. En el día 0 los animales del Grupo Control recibieron un implante de Crestar y los del otro Grupo recibieron 2

implantes de deslorelina. A los 7 días se inició la superestimulación, se inyectó PGF 48 h después y los Crestar fueron removidos 12 h más tarde. Los animales con deslorelina recibieron 25 mg de LH a las 60 h de la PGF y fueron IA a tiempo fijo 12 h después. Los animales del Grupo Control fueron IA en el momento del estro, 12 y 24 h después. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Producción de embriones de vaquillonas Brahman tratadas con deslorelina e IA a tiempo fijo a las 12 h de la aplicación de LH porcina y vaquillonas no tratadas con deslorelina ni LH e IA en el momento del celo, 12 y 24 h después. Todas las vaquillonas fueron superestimuladas con Folltropin-V.

	Grupo Control IA (0, 12 y 24 h pos celo)	Grupo deslorelina + LH IA tiempo fijo
Ova/embriones colectados	11,0 ± 3,1	16,4 ± 3,4
Embriones transferibles	7,8 ± 2,7	5,1 ± 2,2
Las medias no difieren (P>0,1) significativamente		

Los resultados indican que el protocolo combinando la aplicación del agonista de GNRH más LH induce una ovulación sincrónica en vaquillonas permitiendo realizar una sola IA a tiempo fijo. Este esquema plantea además dos alternativas prácticas interesantes: 1) La posibilidad de utilizar un tratamiento de este tipo cuando usamos semen congelado de muy alto valor y 2) La utilización de este protocolo en donantes *Bos Indicus* donde el estrés podría afectar la respuesta superovulatoria, principalmente debido a alteraciones en la ovulación.

CONCLUSIONES

La variabilidad en la producción de embriones viables por la donante sigue siendo el mayor problema de la transferencia de embriones. No obstante, las respuestas superovulatorias pueden aumentarse y la variabilidad disminuirse (no eliminarse) si se realizan los tratamientos con gonadotrofinas al comienzo de la onda folicular, antes de la selección del folículo dominante. Para comenzar los tratamientos superestimuladores en el inicio de la onda se pueden realizar ultrasonografías diarias o utilizar tratamientos que sincronicen el desarrollo folicular. Existen métodos mecánicos como la aspiración de todos los folículos ≥ 5 mm presentes en el ovario (la superovulación debe iniciarse 1 o 2 días después) o tratamientos hormonales con progestágenos más estradiol. El intervalo entre el tratamiento y el inicio de la superovulación es de 4 días si utilizamos 5 mg de E-17B o 2,5 mg de EB combinados con 50 mg de P4 y de 5 o 6 días con 3 mg de norgestomet y 5 mg de EV. Para que el tratamiento con estradiol sea efectivo, se debe esperar un día para inyectar el estrógeno después de la colocación de un progestágeno (CIDR-B o SMB) o administrar progesterona o progestágeno inyectable junto con el estradiol, en el momento que se coloca el implante. Además del control del desarrollo folicular se podría controlar la ovulación mediante la utilización del agonista de la GNRH deslorelina y la administración de LH porcina. Tal vez lo más interesante de estos tratamientos es la posibilidad de independizarse del ciclo estral y poder programar grupos de donantes. Esto sin duda llevará a facilitar la aplicación de la técnica de transferencia de embriones y disminuirá los costos logísticos, ya que se puede elegir arbitrariamente el momento de la colección y armar circuitos, disminuyendo de esta manera los costos de movilidad de los profesionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams. G.P., Nasser. L.F., Bó. G.A. García. A. Del Campo, M.R., Mapletoft. R.J. Superstimulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42:1103-1113.
- Bergfelt. D.R., Lightfoot. K.C., Adams, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994; 42:895-907.
- Bergfelt. D.R., Bó. G.A., Mapletoft, R.J., Adams. G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim Reprod* 1997; 49:1-12 (1997).
- Bó, G.A., Pierson. R.A., Mapletoft. R.J., The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. *Theriogenology* 1991 36:169-183.
- Bó G.A., Adams, G.P., Pierson. R.A., Caccia, M., Tribulo, H., Mapletoft. R.J., Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 1994; 41:1555-1569.
- Bó. G.A., Hockley. D.K., Nasser. L.F., Mapletoft, R.J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 1994; 42:963-975.

7. Bó. G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martínez, M., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J.. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 1995;39:193-204
8. Bó. G.A., Adams, G.P., Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular development in cattle. *Theriogenology* 1995-. 43:3 1-40.
9. Ból, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J.. Effect of progestogen plus estradiol-17B treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 1996-- 45:897-910.
10. Bó, G.A., Caccia, M., Martínez, M., Mapletoft, R.J.. Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. *Proc. 13 th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia, 1996; P7-22.*
11. Bó. G.A., Bergfelt DR. y Mapletoft, R.J. Manipulación de la dinámica folicular en el ganado bovino: Su aplicación en programas de transferencia de embriones. *Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba, 1996, 1:53-68.*
12. Bó, G.A., Tríbulo, H.T, Caccia, M. and Tríbulo, R. Superovulatory response of beef heifers treated with estradiol benzoate, progesterone and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology* 1998; 49:375.
13. Bungarts, L., Niemann, H.. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil* 1994; 101:583-591.
14. Caccia, M., Ungerfield, R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A. Efecto de la dosis y vía de administración del benzoato de estradiol en vacas con CIDR-B. *Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 1996; 1:249.*
15. Caccia, M. and Bó, G.A.. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 1998; 49:341.
16. Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Bó, G.A.. Effect of different estrogen and progesterone treatments on superovulatory response in beef (*bos taurus*) cattle. *XIII Reunión Anual Sociedad Brasileña de Transferencia Embrionaria. Sao Pablo, Brasil, Arq Fac Vet UFRGS 1998; 26:233.*
17. Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H. and Bó, G.A.. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in beef cattle treated with CIDR-B, estrogen and progesterone. *Theriogenology* 51:403, 1999.
18. D'Occhio, M.J., Sudha, G., Jillella, D., Whyte T., Maciellan, L.J., Walsh, J., Trigg, T.E., Miller, D.. Use of GNRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology* 1997;47:601-613.
19. D'Occhio, M.J., Jillella, D. Lindsey, B.R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology* 1999; 51:9-36.
20. Ginther OJ., Kastelic, J.P., Knopf, L.. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1989-, 20:187-200. 2 1. Hahn, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology* 1992-, 38:269-275.
22. Huhtinen, M. Raino. V., Aalto, J., Bredbacka P. Increased ovarian responses in the absence of the dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 1992-. 37:457-463.
23. Lewis, I.M., Trounson . A.O. Superovulation in catchchemical ablation of the dominant follicle using estradiol-17B. *Singapore Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1996: 27(1):63-65.
24. Lindsell. C.E ... Murphy, B.D., Mapletoft, R.J. Superovulatory and endocrino responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 1986: 26:209-219.
25. Mapletoft. R.J. Superovulación en el ganado bovino. *Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal. Carlos Paz. Córdoba, Argentina. 1996-,1:69-85.*
26. Mapletoft. R.J.. Bó. G.A.. Murphv. B.D.. The effect of biological activity of gonadotropins en superovulation in the cow. *Proc IX Congreso Brasileiro de Reproducao Animal 1991: 1:74-92.*
27. Mapletoft,RJ... Martínez. M.F.. Adams. G.P., Kastelic, J. and Burnley, C.A.. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology* 1999: 47:41 1.
28. Nasser, L.F.. Adams. G.P., Bó. G.A.. Mapletoft. R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40:713-724.
29. Nigro, M., Burri, E., Bó, G.A. Respuestas superovulatorias utilizando el tratamiento de CIDR-B y estradiol-17B en programas comerciales de transferencia de embriones. *Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal. Carlos Paz, Córdoba; Argentina 1996; 1:268.*
30. Nigro., M., Burry, E., Mapletoft, R.J., Bó, G.A. Respuesta superovulatoria en vacas lecheras tratadas con Lutropin-V en la primera inseminación. *Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba.. Argentina, 1996; 1:267.*
31. Nigro. M., Burry, E.. Bó, G.A. Respuesta superovulatoria utilizando tratamientos con CIDR-B o SincroMate-B y Valerato de Estradiol en programas comerciales de transferencia de embriones bovinos. *Cuat-tas Jornadas CABIA y Primeras del Mercosur, 1998.*

Volver a: [Transplante embrionario](#)