

# NUEVOS TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA SUPEROVULACIÓN DE DONANTES DE EMBRIONES BOVINOS

Bó, G.A.<sup>1</sup>; Carballo Guerrero, D.<sup>1,2</sup>; Tríbulo, A.<sup>1,2</sup>; Tríbulo, H.<sup>1,2</sup>; Tríbulo, R.<sup>1,2</sup> y Mapletoft, R.J.<sup>3</sup>. 2011. *Taurus*, Bs. As., 13(50):4-25.

1.-Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural General Paz, (5145) Córdoba, Argentina.

2.-Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3.-Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá.

Conferencia presentada en el 8° Simposio Internacional de Reproducción Animal, organizado por el IRAC. 10, 11 y 12 de Julio de 2009. Córdoba, Argentina.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Trasplante embrionario y clonación](#)

## INTRODUCCIÓN

La variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios y el tiempo y esfuerzo necesarios para la administración de los mismos han sido los principales factores que afectan la aplicación de la transferencia de embriones en programas de mejoramiento genético<sup>19</sup>.

Si bien los avances en el conocimiento de los últimos años no han podido aumentar significativamente el número de embriones transferibles que se producen en promedio por tratamiento superovulatorio, el desarrollo de protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular<sup>13, 15</sup> y la ovulación<sup>4, 18</sup> han permitido la superovulación de grupos de donantes, independientemente del momento del ciclo estral en que se encontraban y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) de ellas, sin la necesidad de detectar celos. Estos tratamientos han tenido un impacto positivo en la aplicación comercial de programas de transferencias embrionarias, porque han facilitado la programación de los protocolos de trabajo, sin ser tan dependientes del conocimiento y la habilidad del personal en la detección de celos. Sin embargo, todavía existen problemas que se presentan y que potencialmente pueden dar lugar a errores que resulten en una disminución de la respuesta superovulatoria, o peor aún, en una ausencia total de respuesta. En ese sentido, la necesidad de aplicaciones de FSH cada 12 h es un factor de preocupación que debería ser solucionado y simplificado<sup>11</sup>. Además, el método más comúnmente utilizado para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la superovulación consiste en la aplicación de dispositivos con progesterona y estradiol<sup>53</sup>. Estos tratamientos no pueden ser usados en muchos países del mundo por preocupaciones de los efectos que pudieran producir los estrógenos en la cadena alimenticia<sup>44</sup>.

La intención de este trabajo es presentar avances realizados en el desarrollo de tratamientos alternativos que no necesitan el uso de estradiol para sincronizar el desarrollo folicular, la simplificación de los tratamientos superestimuladores mediante la aplicación de una única dosis de FSH y por último la utilización de eCG al final del tratamiento superestimulador para tratar de aumentar la cantidad de embriones transferibles obtenidos por colecta.

## MANIPULACIÓN DE LA ONDA FOLICULAR PARA LA SUPEROVULACIÓN

Tradicionalmente los protocolos de superovulación eran comenzados en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 y 11 después del celo<sup>47, 52</sup>. Esto se debe a que en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza en promedio entre los días 9 y 10 del ciclo<sup>16, 35</sup>. Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que la respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 o 2 días más tarde<sup>1, 59</sup>. Por lo tanto, el tratamiento convencional tiene dos inconvenientes: 1) requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100 % efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado "celo base" y 2) desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotropina.

En la década del 90 se desarrollaron tratamientos con progestágenos y ésteres de estradiol, que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 4 días después<sup>12, 13, 14</sup>. Este tratamiento es utilizado por muchos profesionales alrededor del mundo<sup>4, 6, 18, 53</sup>, pero su uso ha sido restringido recientemente en países como EE.UU., Nueva Zelanda y los de la Unión Europea, lo cual deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema.

Esto creó la necesidad de desarrollar tratamientos que sincronicen el comienzo de una nueva onda folicular que no utilicen ésteres de estradiol. Un método alternativo ya descrito hace tiempo consiste en eliminar, por pun-

ción guiada por ultrasonografía, todos los folículos 5 mm y de esta manera, inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después<sup>8</sup>. De esta manera se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante<sup>6, 21, 42</sup> o de todos los folículos presentes en el ovario<sup>9, 39</sup>. El inconveniente que tiene este método es que hay que contar con un equipo de ultrasonografía y personal capacitado para realizar dicho trabajo, lo que hace que esta tecnología se adapte más a centros de producción de embriones, donde todas las donantes se encuentran concentradas en un solo lugar, que a la superovulación a campo, en establecimientos de distintos productores.

Otra alternativa es la utilización de GnRH o pLH para inducir la ovulación del folículo dominante<sup>50</sup> y así tener el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después<sup>62</sup>; pero el comienzo de la onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en ovulación del folículo dominante<sup>54</sup>. En vacas lecheras, los primeros trabajos con esta temática reportaron tasas de ovulación del folículo dominante del 85 % después de la administración de GnRH<sup>62</sup>, pero otros más recientes<sup>30</sup> reportaron un promedio de ovulación de 62,4 % después de la administración de LH porcina y un 44,3 % cuando se trataron con GnRH ( $P < 0,01$ ). Otro estudio mostró un promedio de ovulación de 78 % y 56 % en vaquillonas tratadas con LH porcina o GnRH, respectivamente<sup>54</sup>. La incidencia de ovulación en respuesta a la GnRH o LH en vacas de carne parece ser similar a la de vaquillonas (aproximadamente 60 %<sup>29</sup>). Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación han resultado en menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular<sup>32</sup>. No obstante, en un análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales (Hinshaw, comunicación personal), no encontraron diferencias en el número de embriones transferibles entre donantes con CIDR y superestimuladas 4 días después del tratamiento con estradiol 17P y 100 mg de progesterona (7,8 embriones transferibles,  $n=1136$ ) y aquellas superestimuladas 48 h después de una inyección de GnRH (7,7 embriones transferibles,  $n=56$ ). En otro estudio más reciente<sup>74</sup>, vacas lecheras ( $n=411$ ) fueron superovuladas seguido del uso de GnRH o estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular.

Los animales tratados con GnRH recibieron un CIDR en días aleatorios del ciclo estral (Día 0), la GnRH fue inyectada el Día 3 y la superestimulación fue iniciada 48 h más tarde. Las otras donantes fueron superestimuladas 4 días después de la inserción de un CIDR y la administración 4 mg de 17P-estradiol.

El análisis de los datos no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos tratados con estradiol o GnRH en el número de ovocitos/embriones recuperados ( $9,8 \pm 0,6$  vs.  $9,7 \pm 0,7$ ), ni en los grados 1 y 2 ( $4,7 \pm 0,4$  vs.  $4,5 \pm 0,4$ ). Finalmente, en otro análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales en vacas lecheras, hubo un grupo de donantes ( $n=245$ ) que recibió GnRH 1,5 días después de la inserción de un CIDR y 60 h antes del inicio del tratamiento con FSH que tuvieron una respuesta ( $5,6 \pm 6,0$  embriones transferibles) que no difirió de la de donantes tratadas con 17P-estradiol ( $n=691$ ;  $6,1 \pm 6,2$  embriones transferibles). Sin embargo, las donantes con 17P-estradiol tuvieron una respuesta mayor ( $P < 0,05$ ) que las de vacas iniciadas entre los días 7 a 14 del ciclo estral ( $n=614$ ;  $5,3 \pm 5,5$  embriones transferibles). Por lo tanto, estudios experimentales apropiadamente desarrollados y controlados deben ser realizados para confirmar estos resultados.

## SUPEROVULACIÓN DURANTE LA PRIMERA ONDA FOLICULAR

Los tratamientos superestimulatorios también pueden ser comenzados en el momento de emergencia de la primera onda folicular en vacas<sup>59</sup> y ovejas<sup>55</sup>. Adams y col.<sup>1</sup> reportaron además similares respuestas superovulatorias entre tratamientos iniciados en el momento de la emergencia de la primera o segunda onda folicular. El punto es determinar el momento de la ovulación con ultrasonografía o iniciar los tratamientos un día después del comienzo del celo.

Para evitar la necesidad de observar la expresión de celo de las donantes, Nasser y col.<sup>60</sup> indujeron una ovulación sincrónica en vacas Nelore (*Bos indicus*) utilizando un protocolo de CIDR y benzoato de estradiol (BE), con la administración de pLH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá) 24 h después de retirado el CIDR. Los tratamientos superestimulatorios se iniciaron 24 h después de la pLH (en el momento esperado de la ovulación y consecuentemente la emergencia de la primera onda folicular). No hubo diferencias en el número de embriones transferibles en las vacas tratadas con CIDR cuando los tratamientos superestimulatorios fueron iniciados en el momento de emergencia de la primera onda folicular ( $8,0 \pm 1,8$ ) o 4 días después de la inyección de 2,5 mg de BE y 50 mg de progesterona (Grupo control:  $6,6 \pm 2,0$ ); pero el número de embriones fue menor cuando las vacas fueron superestimuladas durante la primera onda pero sin la colocación de un CIDR durante el tratamiento ( $0,2 \pm 0,2$ ;  $P < 0,05$ ). Los resultados de este último grupo, sugieren que se requiere tener progesterona circulante para que los ovocitos tengan la capacidad de ser fertilizados y los embriones desarrollarse (Nasser, comunicación personal).

Recientemente, realizamos una serie de 5 experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación de la primera onda folicular, utilizando dispositivos con progesterona pero sin el uso de estradiol. Para desarrollar este protocolo nos basamos, además de los trabajos en los experimentos que han demostrado que es posible mejorar la tasa de respuesta ovulatoria a la GnRH mediante la inducción de un folículo persistente con el uso de un CIDR por 7 a 10 días y PGF2 $\alpha$  en el momento de inserción del CIDR<sup>69</sup>.

En el primer experimento<sup>25</sup>, donantes de raza Bonsmara (29 vacas y 41 vaquillonas) que se encontraban ciclando y en momentos no conocidos del ciclo estral, fueron aleatoriamente asignadas a uno de dos tratamientos. Las donantes del Grupo 1 (superestimuladas durante la primera onda folicular) recibieron un dispositivo con progesterona (1,56 g de progesterona, Cue-Mate, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) junto con la administración intramuscular de PGF2 $\alpha$  (0,150 mg D (+) cloprostenol, Bioprost-D, Biotay S.A., Argentina). El Cue-Mate fue retirado 10 días más tarde y una segunda administración de PGF2 $\alpha$  fue realizada en este momento, seguida por una inyección de GnRH (0,050 mg Lecirelina, Biosin-OV, Biotay S.A.) 36 h después. En base a los trabajos de superovulación durante la primera onda folicular realizados con anterioridad<sup>1, 59</sup>, se especuló que la administración de GnRH después de la remoción del CIDR resultaría en la ovulación y emergencia de una nueva onda folicular 30 a 36 h más tarde. Por lo tanto, a las 36 h después de la GnRH (Día 0), las donantes recibieron un nuevo Cue-Mate y se inició el tratamiento de superestimulación con una dosis total de 200 a 260 mg (vaquillonas) o 320 mg (vacas) NIH-FSH-P1 de Folltropin-V (Bioniche Animal Health) divididas en dosis decrecientes administrada cada 12 h y por 5 días. La PGF2 $\alpha$  fue administrada con las dos últimas dosis de Folltropin-V y el dispositivo Cue-Mate fue removido con la última aplicación de Folltropin-V. Todas las donantes recibieron 12,5 mg de pLH, 24 h después del retiro del Cue-Mate y fueron IATF, 12 y 24 h más tarde.

Los embriones fueron colectados 7 días después de la aplicación de pLH y clasificados de acuerdo a las normas de la IETS<sup>76</sup>.

Las donantes del Grupo 2 (control) recibieron un Cue-Mate y 2 mg de BE (Bioestradiol, Biotay S.A.) y 50 mg de progesterona (P4; Progesterona Río de Janeiro, Laboratorios Allignani Hnos SRL, Argentina) im. Los tratamientos de superestimulación fueron iniciados 4 días más tarde con la misma dosificación de Folltropin-V usada en el Grupo 1. La administración de la PGF2 $\alpha$ , el retiro del Cue-Mate, el tratamiento con pLH, las IATF y la colecta de los embriones fueron realizadas como en el Grupo 1. En este experimento no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,20$ ) en la cantidad de ovocitos/embriones colectados ( $11,0 \pm 1,4$  vs  $8,4 \pm 1,4$ ), ovocitos fertilizados ( $6,3 \pm 1,1$  vs  $5,2 \pm 1,1$ ), ni en los embriones transferibles ( $5,1 \pm 0,9$  vs  $3,7 \pm 0,8$ ) entre el Grupo 2 (control) y el Grupo 1 (superestimuladas durante la primera onda).

A pesar de que este estudio demostró que el protocolo utilizado para la superestimulación de la primera onda folicular fue tan eficiente como el protocolo con estradiol, la duración del tratamiento completo (26 días) conlleva un mayor consumo de tiempo y dificultad para su implementación. Por lo tanto, los experimentos subsiguientes tuvieron el objetivo de simplificar el protocolo descrito anteriormente.

Consiguientemente, en el segundo experimento se trató de reducir el pre-tratamiento de inducción del folículo persistente con Cue-Mate, de 10 días a 5 días (26). En este trabajo 11 vacas y vaquillonas Brangus fueron colocadas aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento en un diseño cross-over, en donde todas las donantes fueron superovuladas en todos los grupos de tratamiento y todos los grupos estuvieron representados en las cuatro fechas de colecta. Las donantes del primer grupo (Cue-Mate 10 días) fueron tratadas de la misma manera que el Grupo 1 (i.e primera onda) del experimento 1. Las donantes del segundo y tercer grupo de tratamiento recibieron PGF2 $\alpha$  y tuvieron durante 5 días un Cue-Mate con dos "pods" impregnados con 0,78 g de progesterona c/u, (Grupo Cue-Mate 5 días 2 pods) o un Cue-Mate en el que uno de los "pods" fue sustituido por un "pod" sin progesterona (Grupo Cue-Mate 5 días 1 pod). En los tres grupos de tratamiento se administró PGF2 $\alpha$  junto con la remoción del dispositivo (Día -3), seguida por GnRH 36 h más tarde. En el Día 0 (36 h después de la GnRH) las donantes de los tres grupos recibieron un Cue-Mate nuevo y la superestimulación con una dosis total de 260 mg (vacas) o 200 mg (vaquillonas) de Folltropin-V, en dos dosis diarias durante 5 días. La administración de la PGF2 $\alpha$ , el retiro del Cue-Mate, el tratamiento con pLH, la inseminación artificial y la colecta de los embriones fueron realizadas al igual que en el experimento 1.

Las donantes del cuarto grupo (Grupo control) fueron tratadas de la misma manera que el Grupo Control del experimento anterior, 4 días después de la administración de BE + P4 y la inserción de un Cue-Mate. Todas las donantes en este experimento fueron examinadas por ultrasonografía (Pie Medical, Falco 100 Vet, Holanda) desde el día de la remoción del primer Cue-Mate hasta la ovulación, para evaluar la respuesta ovulatoria al pre-tratamiento. No hubo diferencias significativas ( $P > 0,17$ ) en la tasa de ovulación (8/11; 81,8 % vs 8/11, 72,7 % vs 11/11, 100 %), ni en el intervalo a la ovulación ( $32,0 \pm 2,8$  h vs  $30,0 \pm 3,2$  h vs  $36,0 \pm 0,0$  h) en los grupos Cue-Mate 10 días, Cue-Mate 5 días 1 pod y Cue-Mate 5 días 2 pods, respectivamente. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,94$ ) en el número y calidad de embriones colectados (Tabla 1). Por lo tanto se concluyó que era posible acortar el pre-tratamiento con Cue-Mate de 10 días a 5 días, sin afectar la respuesta superovulatoria. Además, concluimos que no era necesario sacarle un pod al Cue-Mate para mejorar la respuesta ovulatoria a la GnRH.

**Tabla 1.** Respuesta superovulatoria (media  $\pm$  E.E.) de donantes de embriones tratadas con 3 protocolos distintos en la primera onda de desarrollo folicular ó 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol.

Grupos	n	Ovocitos / embriones totales	Ovocitos fertilizados	Embriones grados 1 y 2	Embriones grados 1, 2 y 3
Cue-Mate 10d	11	11,3 $\pm$ 2,9	7,2 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,6
Cue-Mate 5d-1pod	11	10,0 $\pm$ 2,7	7,6 $\pm$ 2,1	4,4 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 1,0
Cue-Mate 5d-2 pod	11	9,8 $\pm$ 3,0	7,4 $\pm$ 2,7	4,9 $\pm$ 2,3	5,2 $\pm$ 2,6
Control (BE+P4)	11	9,6 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 1,5	5,4 $\pm$ 1,6
Valor		0,9868	0,9631	0,9873	0,9472

Un tercer experimento (27) fue realizado con el fin de evaluar si era necesario remover el Cue-Mate después del pre-tratamiento y reinsertar uno nuevo cuando se inicia la superovulación, o se podía simplemente dejar el Cue-Mate por la duración total del protocolo. Para este trabajo se utilizaron 37 donantes de embriones Angus (27 vacas y 10 vaquillonas), que fueron colocadas en forma aleatoria en dos grupos de tratamiento en un diseño cross-over como el del experimento 2. Cada donante recibió 360 mg de Folltropin-V en dosis decrecientes cada 12 h y durante 5 días. Las donantes de Grupo 1, fueron tratadas de la misma manera que el grupo pre-tratado por 5 días con Cue-Mate con 2 pods del experimento anterior. Las donantes del Grupo 2, se trataron de forma similar al Grupo 1, con la única diferencia de que el Cue-Mate no fue removido y se mantuvo hasta la última inyección de FolltropinV. La tasa de ovulación en respuesta a la administración de GnRH fue igual en los dos grupos (32/37, 86,5 % en cada grupo) y tampoco hubo diferencias ( $P > 0,47$ ) en el intervalo desde la GnRH hasta la ovulación ( $35,6 \pm 1,6$  h y  $37,5 \pm 0,7$  h para el Grupo 1 y 2, respectivamente). Asimismo, no hubo diferencias significativas ( $P > 0,14$ ) en el número y calidad de los embriones obtenidos en los dos grupos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Respuesta superovulatoria (media  $\pm$  E.E.) de donantes de embriones bovinos tratadas en la primera onda de crecimiento folicular, que mantenían ó no un Cue-Mate al momento de la aplicación de GnRH 36 h antes a la superestimulación.

Grupos	n	Ovocitos / embriones totales	Ovocitos fertilizados	Embriones grados 1 y 2	Embriones grados 1, 2 y 3
Grupo 2 (sin remoción de Cue-Mate)	7	9,8 $\pm$ 0,9	6,8 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,7
Grupo 1 (con remoción de Cue-Mate)	7	8,2 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 0,7	3,8 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,6
Valor P		0,1964	0,1413	0,2720	0,1970

Concluimos que no era necesario remover el Cue-Mate para hacer ovular el folículo previo a la superestimulación.

Continuando con esta línea de experimentos, el cuarto estudio<sup>27</sup> fue realizado con el fin de evaluar si era posible acortar el tratamiento de Folltropin-V de 5 días a 4 días, como lo usa la mayoría de los técnicos. Para este estudio fueron utilizadas 24 vacas donantes de embriones (18 Simmental y 6 Angus), que se colocaron en forma aleatoria en dos grupos de tratamiento en un diseño cross-over como en los experimentos anteriores. Todas las donantes recibieron Cue-Mate por todo el protocolo de superovulación, PGF2 $\alpha$  y GnRH como en el experimento anterior. Además, todas recibieron 400 mg de Folltropin-V totales, con la diferencia que en el Grupo 1 el Folltropin-V fue administrado en 10 dosis cada 12 h y por 5 días (como en todos los experimentos anteriores), mientras que las donantes del Grupo 2 recibieron 8 aplicaciones de Folltropin-V cada 12 h durante 4 días. Las inyecciones PGF2 $\alpha$ , pLH, inseminaciones y colecta de los embriones fueron realizadas como en los experimentos anteriores. De esta manera la duración total del protocolo fue de 21 días para las donantes del Grupo 1 y de 20 días para las del Grupo 2. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3, donde se puede observar que no hubo diferencias significativas ( $P > 0,49$ ) en ninguno de los parámetros evaluados.

**Tabla 3.** Respuesta superovulatoria (medias  $\pm$  E.E.) de donantes de embriones bovinos superestimuladas en la primera onda folicular, con Folltropin-V inyectado durante 5 o 4 días.

Grupos	n	Ovocitos / embriones totales	Ovocitos fertilizados	Embriones grados 1 y 2	Embriones grados 1, 2 y 3
Grupo 1 (FSH por 5 días)	24	13,5 $\pm$ 2,4	8,2 $\pm$ 1,4	6,2 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 1,1
Grupo 2 (FSH por 4 días)	24	12,0 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 1,0
Valor P		0,7543	0,5638	0,4934	0,6542

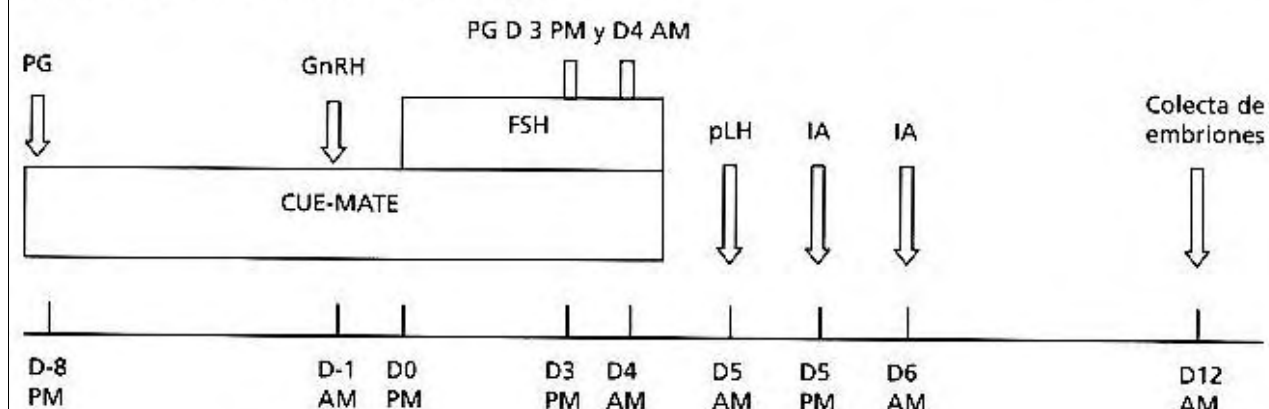
Por último, se realizó un quinto trabajo para evaluar si era posible simplificar aun más el protocolo y evaluar si eran necesarias dos dosis de PGF $_2\alpha$  durante el pre-tratamiento. Un segundo objetivo fue reconfirmar la efectividad de este nuevo protocolo mediante la comparación con el protocolo que utiliza P4 y BE para sincronizar el desarrollo de una onda folicular. Se utilizaron 14 vacas donantes de la raza Simmental, que fueron colocadas en forma aleatoria en tres grupos de tratamiento en un diseño cross-over. Las donantes de los Grupos 1 y 2 recibieron Cue-Mate por 5 días y la diferencia entre ellos fue que las del Grupo 1 recibieron PGF $_2\alpha$  en el momento de la inserción del Cue-Mate y 5 días después, mientras que las Grupo 2 recibieron PGF $_2\alpha$  sólo en el momento de la inserción del Cue-Mate. Como en los experimentos anteriores, las vacas de los Grupos 1 y 2 recibieron GnRH a los 7 días de la inserción del Cue-Mate y se iniciaron los tratamientos con Folltropin-V a las 36 h de la GnRH (Día 0). Las donantes del Grupo 3 (BE +P4) recibieron 2,5 mg de BE, 50 mg de progesterona im y un Cue-Mate, 4 días antes del inicio de los tratamientos con Folltropin-V. Las donantes de los 3 grupos recibieron 400 mg de Folltropin-V en 8 dosis decrecientes cada 12 h y por 4 días. Asimismo, las posteriores aplicaciones de PGF $_2\alpha$ , remoción del Cue-Mate, pLH, inseminaciones y colecta de los embriones, fueron realizadas de la misma manera que en los experimentos anteriores. No hubo diferencias significativas ( $P>0,05$ ) en ninguna de las variables analizadas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Respuesta superovulatoria (media  $\pm$  E.E.) de donantes de embriones Simmental pretratadas con Cue-Mate y una (Grupo 2) o dos (Grupo 1) inyecciones de PGF $_2\alpha$  antes de la inducción de la ovulación (y sincronización de onda) con GnRH y donantes tratadas con Cue-Mate, P4 y BE para sincronizar la onda folicular.

Grupos de tratamiento	n	Ovocitos / embriones totales	Ovocitos fertilizados	Embriones grados 1 y 2	Embriones grados 1, 2 y 3
Grupo 1 (2 PGF $_2\alpha$ )	14	12,9 $\pm$ 2,0	9,8 $\pm$ 1,7	5,9 $\pm$ 1,2	6,6 $\pm$ 1,2
Grupo 2 (1 PGF $_2\alpha$ )	14	11,5 $\pm$ 1,7	9,3 $\pm$ 1,5	7,2 $\pm$ 1,5	7,7 $\pm$ 1,6
Grupo 3 (BE+P4)	14	14,5 $\pm$ 2,8	9,4 $\pm$ 2,3	5,6 $\pm$ 1,5	6,8 $\pm$ 1,7
Valor P		0,8033	0,9220	0,5416	0,8547

Estos datos demuestran que la superestimulación de la primera onda folicular puede ser empleada en grupos de donantes, independientemente del momento del ciclo estral en que se encuentren y sin afectar la respuesta superovulatoria, sin la necesidad del uso de estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. El tratamiento recomendado esta esquematizado en la Figura 1.

**Figura 1.** Tratamiento de sincronización de la ovulación para realizar la superestimulación durante la primera onda folicular en bovinos. Las donantes reciben un dispositivo liberador de progesterona (Cue-Mate) junto con una dosis de PGF $_{2\alpha}$  (Día -8) y una dosis de GnRH 7 días después (Día -1). En el Día 0 (36 h después de la GnRH) se comienza con el tratamiento con FSH en 8 dosis decrecientes administradas cada 12 h y por 4 días. Se administra PGF $_{2\alpha}$  con las dos últimas inyecciones de FSH y se retira el Cue-Mate con la última FSH. Luego se induce la ovulación con pLH a las 24 h de la remoción del Cue-Mate y las donantes son inseminadas 12 y 24 h después. Los embriones son colectados a los 7 días de la pLH.



### SUPEROVULACIÓN SIN LA INDUCCIÓN DE ATRESIA U OVULACIÓN DEL FOLÍCULO DOMINANTE PARA SINCRONIZAR EL DESARROLLO FOLICULAR

La mayoría de los protocolos de superestimulación actuales tratan de sincronizar la emergencia de la onda folicular causando la atresia folicular<sup>13, 18</sup>. De esta manera hay un aumento de la FSH que recluta los folículos de una nueva onda y allí se inician los tratamientos con gonadotropinas. Sin embargo esto puede no ser necesario para el éxito de un tratamiento superovulatorio. Un concepto interesante que ha surgido es el de la estimulación de los folículos subordinados.

Durante una onda folicular normal, los folículos subordinados regresan debido a las concentraciones decrecientes de FSH causadas principalmente por las secreciones de estradiol e inhibina<sup>16, 36</sup>.

Los folículos pequeños requieren FSH para continuar su crecimiento y se ha evidenciado que folículos tan pequeños como de 1 mm de diámetro comienzan a crecer bajo la influencia de la FSH<sup>41</sup>. Quizá todo lo que se necesite para la superestimulación es la presencia de folículos de 3 a 4 mm de diámetro en el momento que sea iniciado el protocolo tradicional de superestimulación durante 4 o 5 días. Asumiendo una tasa de crecimiento de 1 a 2 mm por día, esto debería tomar 2-3 días, o sea, sumar 2-3 días al protocolo de superestimulación. Bajo estas circunstancias, la presencia del folículo dominante puede no tener ningún efecto en la respuesta superovulatoria, la FSH exógena reemplaza a aquella que está siendo inhibida por las sustancias que secreta el folículo dominante. Caccia y col.<sup>22</sup> han demostrado que la administración de 500 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) 2 días antes de iniciar los tratamientos con FSH tiende a incrementar la respuesta superovulatoria, posiblemente por el reclutamiento de mayor cantidad de folículos que ingresen dentro del pool de folículos de 3 a 5 mm de la onda. Este trabajo fue repetido recientemente por Carballo Guerrero y col.<sup>24</sup> donde la aplicación de 500 UI de eCG aumentó la producción de embriones en vacas con historia de baja respuesta superovulatoria ( $\leq 3$  embriones transferibles por tratamiento). Cuando se incluyó eCG en el tratamiento, las vacas produjeron  $3,6 \pm 0,6$  embriones transferibles contra  $1,0 \pm 0,2$  embriones transferibles cuando no se utilizó eCG ( $P < 0,01$ ). El mecanismo involucrado podría ser el que se describió anteriormente. Otra alternativa podría involucrar la inserción de un dispositivo con progesterona en cualquier estado del ciclo y la iniciación del tratamiento con FSH 2 a 3 días más tarde (una vez que los niveles de progesterona se hayan estabilizado). La FSH podría ser administrada durante 6 a 7 días, sin diferir la última parte del protocolo tradicional. La dosis total de FSH puede no tener que ser incrementada; es decir, la dosis total de la FSH puede ser dividida en más aplicaciones, comenzando con las dosis bajas en las aplicaciones tempranas de manera de reclutar los folículos muy pequeños.

En un estudio preliminar realizado con vacas cruzas de carne utilizadas en programas de capacitación de colecta de embriones se evaluó un protocolo de superestimulación con FSH por 6 días de FSH<sup>19</sup>. La respuesta superovulatoria fue similar a la de donantes iniciadas 4 días después de la aplicación de BE + P4. Las vacas del Grupo FSH-6 días, recibieron un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (0,75 g de progesterona, Pro-Ciclar, Zoovet, Argentina) en el Día 0. En el Día 2, se inició la superestimulación con una dosis total de 320 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V durante 6 días (10 mg AM y PM, 20 mg AM y PM, 60 mg AM y PM, 40 mg AM y PM, 20 mg AM y PM y 10 mg AM y PM). La PGF $_{2\alpha}$  fue administrada en la mañana y en la tarde del Día 6 y el dispositivo fue removido en la mañana del Día 7, la GnRH fue administrada en la mañana del Día 8 y se realizó la IATF 12 y 24 horas después de la aplicación de la GnRH. Los embriones fueron colectados 7 días después de la

GnRH. Las vacas del Grupo Control recibieron 2,5 mg BE y 50 mg de progesterona im junto con la inserción de un Pro-Ciclar en el Día 0. En el Día 4 se inicio la superestimulación con un total de 320 mg de Folltropin-V, pero en este caso con administraciones cada 12 h de forma decreciente durante 4 días (70 mg AM y PM, 50 mg AM y PM, 30 mg AM y PM y 10 mg AM y PM). La aplicación de PGF2 $\alpha$ , el retiro del dispositivo, la GnRH, la IATF y la colecta de los embriones fue realizada de la misma manera que en el Grupo FSH-6 días. No hubo diferencias significativas ( $P > 0,2$ ) en los ovocitos/embriones colectados ( $4,7 \pm 0,8$  vs  $7,5 \pm 1,4$ ), ni en los embriones transferibles ( $2,3 \pm 0,5$  vs  $3,5 \pm 0,9$ ) en los grupos FSH6 días ( $n=25$ ) y Control ( $n=25$ ), respectivamente.

Por ser estos resultados provenientes de vacas utilizadas en cursos y por lo tanto no tener la seguridad que siempre se colecten todos los embriones posibles, deben ser considerados solamente como información preliminar y deben ser evaluados con cautela. Por esto se procedió a realizar un nuevo experimento, en el cual se utilizaron 21 vacas donantes de embriones de raza Angus que fueron superestimuladas por los dos tratamientos evaluados en el experimento anterior, en un diseño crossover.

En este caso no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los ovocitos/embriones colectados ( $8,2 \pm 1,3$  vs  $10,0 \pm 1,7$ ), ni en los embriones transferibles ( $4,9 \pm 1,0$  vs  $5,8 \pm 1,3$ ) en los grupos FSH-6 días y Control, respectivamente. Si bien estos resultados fueron alentadores, todavía hay que continuar evaluando este protocolo, ya que si uno hace la sumatoria de los dos experimentos y los compara estadísticamente ( $n=46$  colectas por tratamiento), hay una tendencia ( $P=0,79$ ) a un menor número de ovocitos/embriones colectados en el Grupo FSH-6 días ( $6,3 \pm 0,7$ ) que en el Grupo Control ( $8,6 \pm 1,1$ ); aunque esta diferencia es solo numérica ( $P > 0,26$ ) en el número de embriones transferibles ( $3,5 \pm 0,6$  vs  $4,6 \pm 0,8$  en el Grupo FSH-6 días y Control, respectivamente). Por lo tanto, se deben realizar más trabajos de investigación antes de dar una recomendación sobre este protocolo alternativo.

## SUPEROVULACIÓN DE VACAS DONANTES UTILIZANDO UNA ÚNICA DOSIS DE FSH

Los tratamientos superestimulatorios tradicionales constan de una aplicación i.m. de eCG o dos aplicaciones diarias cada 12 h durante 4 días de extractos pituitarios que contienen FSH<sup>51</sup>. La eCG es una glicoproteína que tiene una prolongada vida media (más de 40 h), lo que representa una ventaja desde el punto de vista práctico, dado que una sola aplicación es suficiente para provocar una apropiada estimulación ovárica<sup>58, 67</sup>. Sin embargo, una prolongada estimulación con eCG provoca un incremento en la cantidad de folículos anovulatorios en el momento de la colecta de embriones<sup>37, 38</sup>. Contrariamente, la vida media de la FSH en la vaca es de 5 h<sup>31, 45</sup> y por eso se necesitan aplicaciones frecuentes para inducir una adecuada respuesta superovulatoria<sup>7, 57</sup>. Tratamientos con dos aplicaciones diarias de FSH han demostrado mayor respuesta superovulatoria que tratamientos con una sola aplicación diaria<sup>48, 57, 74</sup>.

La necesidad de inyectar dos veces por día hace que el tratamiento requiera máxima atención y resulta a veces muy dificultoso de aplicar en algunos establecimientos, reduciendo aun más la posibilidad de que esta técnica sea utilizada masivamente. Además, cuando el tratamiento es aplicado incorrectamente las vacas no responden, o si se las trata bruscamente puede causar estrés en algunas donantes, con la consiguiente disminución de la respuesta superovulatoria<sup>10</sup>. Se ha reportado que el estrés por transporte disminuye la respuesta superovulatoria en vaquillonas<sup>33</sup>. Además, el estrés agudo repetido puede alterar el pico preovulatorio de LH<sup>71</sup> y el uso de inyecciones de ACTH exógena, disminuyó significativamente la pulsatilidad de la LH<sup>63</sup>. Estos informes sugieren que en el ganado bovino, el estrés puede influir en la eficiencia de los tratamientos superovulatorios en animales indóciles o no tan acostumbrado a pasar frecuentemente por la manga. El desarrollo de un tratamiento superovulatorio con una sola aplicación de FSH no sólo ahorra tiempo y mano de obra, sino también podría disminuir el estrés en las donantes de embriones, además de aumentar la precisión de los tratamientos en las explotaciones que carecen de personal capacitado.

En un estudio realizado hace más de 10 años, una sola dosis subcutánea de 400 mg NIH-FSHP1 de Folltropin-V en vacas de carne con una buena condición corporal ( $>3$  en una escala del 1 al 5), resultó en una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo de tratamiento tradicional de dos aplicaciones al día durante 4 días<sup>11</sup>. Sin embargo, los resultados no se pudieron repetir en vacas Holstein, que tenían menos tejido adiposo subcutáneo<sup>40</sup>. En otro estudio realizado en vacas Holstein, la inyección única se dividió en dos, con un 75 % de la dosis de Folltropin-V administrada por vía subcutánea en el primer día de tratamiento y el 25 % restante fue administrado 48 h después, cuando normalmente se administra la PGF2 $\alpha$ <sup>49</sup>. La respuesta superovulatoria a este tratamiento fue intermedia entre la obtenida con el protocolo tradicional (la mayor respuesta) y la obtenida con una sola dosis subcutánea (la menor respuesta). En un estudio realizado por Brogliatti y col.<sup>20</sup> se confirmaron los resultados del experimento anterior.

Una opción alternativa para inducir una respuesta superovulatoria con una única inyección de FSH, sería combinarla con agentes que resultaran en una liberación lenta y sostenible de la hormona durante varios días. Estos agentes, son denominados comúnmente polímeros. Existen polímeros de origen biológico o sintético con diferentes propiedades utilizados en la liberación de drogas. Estos compuestos son biodegradables y no reaccionan en el tejido, lo que facilita su uso en animales<sup>72, 73</sup>.

Uno de los primeros estudios que se realizaron con un agente de liberación lenta, fue con polivinilpirrolidona (PVP). La PVP es soluble en agua o en una amplia gama de disolventes orgánicos. Por otra parte, la PVP es capaz de formar complejos con varios materiales como pigmentos, yoduro, antibióticos e insulina y podría ser utilizada para prolongar el tiempo funcional in vivo de una hormona.

En un trabajo realizado por Yamamoto y col.<sup>77</sup>, se demostró que al combinar FSH con una solución de PVP al 30 % y administrada en una sola aplicación por vía intramuscular obtuvieron resultados similares que el tratamiento tradicional de múltiples dosis durante 4 días. Sin embargo, Callejas y col.<sup>23</sup> y Bó y Mapletoft (datos no publicados) no obtuvieron una respuesta superovulatoria satisfactoria con este compuesto. Un dato interesante del trabajo de Callejas y col.<sup>23</sup> es que cuando combinaron de FSH con eCG obtuvieron una respuesta superovulatoria similar a la del tratamiento tradicional.

El gel de hidróxido de aluminio es un adyuvante que puede absorber macromoléculas (como por ejemplo, proteínas), esto se debe a la fuerza electrostática que posee. Tiene un punto isoeléctrico de 11,4. En consecuencia, es de carga positiva y puede ser un buen adsorbente de las proteínas con carga negativa a pH fisiológico<sup>2</sup>. En un estudio realizado por Kimura y col.<sup>43</sup>, demostraron que una sola aplicación de FSH en gel de hidróxido de aluminio es efectiva para inducir una respuesta superovulatoria en ganado bovino. Sin embargo, las posibilidades de que sea aprobado para su uso, son bastante remotas debido a que es un adyuvante utilizado en vacunas<sup>5</sup>. Por último, Choi y col.<sup>28</sup> demostraron que al disolver FSH en Polietilenglicol (PEG) se obtiene una respuesta superovulatoria similar a la obtenida por un tratamiento de 8 aplicaciones de FSH durante 4 días.

Nosotros hemos realizado recientemente una serie de experimentos para evaluar la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con una inyección única de Folltropin-V asociado con una formulación de liberación lenta (SRF, Bioniche Animal Health). Estos experimentos fueron realizados en donantes de varias razas de carne (Angus, Brangus, Bonsmara y Braford) para probar la efectividad de este protocolo.

En el Día 0, todas las vacas recibieron 5 mg de 17 $\beta$ -estradiol, 50 mg de progesterona y un dispositivo Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas con dos tratamientos: las vacas del Grupo Control recibieron FolltropinV en dosis decrecientes por vía im cada 12 h durante 4 días, mientras que las vacas del Grupo Dosis Simple recibieron una dosis única de Folltropin-V diluida en 10 ml de SRF que fue aplicada por vía im en la tabla del cuello. En la mañana y la tarde del Día 6, todas las vacas recibieron PGF2 $\alpha$  y se retiró el Cue-Mate en la tarde del Día 6. En la mañana del Día 8 las vacas recibieron 12,5 mg de pLH y fueron inseminadas 12 y 24 h más tarde (Día 9). Las vacas que mostraron celo en la tarde del Día 7, fueron inseminadas en el momento de la pLH y 12 h más tarde.

Se colectaron los embriones en el Día 15 y fueron clasificados siguiendo las normas de la IETS. En el Día de la colecta, las donantes recibieron PGF2 $\alpha$ , para ser nuevamente tratadas entre 13 y 20 días después (30 a 40 días de intervalo entre colectas). En la Tabla 5 se muestran resumidos los resultados obtenidos de los 7 experimentos realizados hasta ahora. No se encontraron diferencias significativas en el número y calidad de los embriones obtenidos.

**Tabla 5.** Respuesta superovulatoria (media  $\pm$  E.E.) en donantes de embriones tratadas con Folltropin-V administrada en 2 aplicaciones diarias durante 4 días (Control) o diluida en una solución de liberación lenta y administrada en una única aplicación (Dosis simple).

Grupos	n	Ovocitos / embriones totales	Ovocitos fertilizados	Embriones grados 1 y 2	Embriones grados 1, 2 y 3
Control	61	12,2 $\pm$ 0,6	8,5 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,4
Dosis Simple	64	12,0 $\pm$ 0,8	8,3 $\pm$ 0,6	5,8 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 0,4
Valor P		0,3584	0,2746	0,5617	0,3322

Como se muestra en la Tabla 5, los resultados son muy alentadores y consistentes y permiten afirmar que este protocolo es viable y efectivo para superestimular donantes de razas de carne. De las dosis de Folltropin-V evaluadas para cada raza, la que más embriones transferibles produjo en las donantes Angus (n=150) fue 300 mg (versus 200 y 400 mg); en las Brangus (n=41) no hubo diferencias entre 260 y 300 mg (versus 200 mg) y en la raza Bonsmara (n=74), no hubo diferencias entre 200 o 300 mg. En la raza Braford sólo se utilizó la dosis de 260 mg (n=14).

## UTILIZACIÓN DE ECG EN LAS ETAPAS FINALES DEL TRATAMIENTO SUPERESTIMULATORIO

Desde hace un tiempo se ha comenzado a especular sobre la necesidad de la FSH y LH de los folículos en crecimiento durante un tratamiento superestimulador. Basados en los conocimientos de la fisiología del desarrollo folicular, los folículos en desarrollo necesitan principalmente FSH durante la fase de reclutamiento hasta llegar



a un tamaño de 8,5 mm de diámetro en la vaca *Bos taurus*<sup>36</sup> y 6,2 mm en la vaca *Bos indicus*<sup>34, 64</sup>. Después de ese tamaño, el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa y se dice que su crecimiento hasta la ovulación pasa a ser LH dependiente<sup>56</sup>.

Por lo tanto, los folículos de vacas superestimuladas podrían beneficiarse con la inclusión de una mayor cantidad de LH al final del tratamiento. Price y col.<sup>61</sup> trataron de aumentar los pulsos de LH mediante aplicaciones frecuentes de GnRH. A pesar de conseguir un aumento de la producción de estradiol por parte de los folículos en crecimiento, las donantes no ovularon después de una inyección de GnRH al final de la superestimulación, tal vez porque el tratamiento frecuente produjo una desensibilización de la hipófisis a la GnRH. Otra opción podría ser utilizar eCG al final de un tratamiento convencional con FSH. La eCG tiene actividad similar a la FSH y LH<sup>46, 58, 70</sup> y al tener una vida media larga (40 h) podría dar un estímulo constante a los receptores de LH de los folículos en crecimiento. Barros y col.<sup>3</sup> realizaron un experimento donde evaluaron la respuesta superovulatoria en vacas donantes Nelore que fueron superestimuladas con Folltropin-V durante los primeros tres días de tratamiento y a las cuales se les reemplazó las inyecciones de FSH correspondientes al cuarto día, por dos inyecciones (cada 12 h) de 200 UI de eCG cada una. Las donantes del Grupo Control fueron superestimuladas con el tratamiento convencional de 8 dosis decrecientes de FSH cada 12 h y por 4 días. El tratamiento con eCG incrementó significativamente ( $P < 0,03$ ) el número de ovocitos/embriones colectados ( $10,0 \pm 1,5$  vs  $6,7 \pm 1,2$  para las tratadas con eCG y las del Grupo Control, respectivamente) y solo numéricamente el número de embriones transferibles ( $7,3 \pm 1,2$  vs  $5,1 \pm 1,1$  para las tratadas con eCG y las del Grupo Control, respectivamente). Sin embargo, Sartori y col.<sup>65</sup> no encontraron un efecto benéfico de la eCG en vaquillonas Nelore.

Para continuar investigando esta alternativa, realizamos un experimento con vacas y vaquillonas Brangus<sup>63</sup>. Se utilizaron para este experimento 38 vacas y 25 vaquillonas Brangus que fueron divididas al azar para conformar tres grupos. En el Día 0, todas las donantes recibieron un dispositivo Prociclar, junto a 50 mg de progesterona y 2,5 mg BE im. A la tarde del Día 4 se iniciaron los tratamientos superestimuladores. Las donantes del Grupo Control recibieron 8 aplicaciones de Folltropin-V en forma decreciente cada 12 h y por 4 días (dosis total 280, 320 o 400 mg NIH-FSH-P1). En la mañana y tarde del Día 6 se aplicó PGF2 $\alpha$  y se retiraron los dispositivos en la tarde del Día 7. En la mañana del Día 8 se aplicó GnRH y las donantes fueron IATF 12 y 24 h después. Las donantes del Grupo FSH + eCG Día 6, recibieron sólo las primeras 4 aplicaciones de Folltropin-V en forma decreciente y en la mañana del Día 6 recibieron una única inyección im de 400 UI de eCG (Novormón, Syntex SA, Argentina). Estas vacas no recibieron ni FSH ni eCG en el Día 7. La administración de PGF2 $\alpha$ , remoción del dispositivo, GnRH e IATF fueron realizadas como en el Grupo Control. Finalmente, las donantes del Grupo FSH+ eCG Día 7, recibieron las primeras 6 aplicaciones de Folltropin-V y dos inyecciones (cada 12 h) de 200 UI de eCG en la mañana y tarde del Día 7. La administración de PGF2 $\alpha$ , remoción del dispositivo, GnRH e IATF fueron realizadas como en el Grupo Control. El Día 15 se colectaron los embriones y fueron evaluados según las normas de la IETS.

Como se puede ver en la Tabla 6, el tratamiento con dos dosis de eCG resultó en un número mayor de CL y embriones transferibles que en los otros dos grupos. Asimismo, no hubo diferencias en la respuesta superovulatoria entre las donantes tratadas con Folltropin-V durante los 4 días (Control) y las que sólo recibieron Folltropin durante los dos primeros días y luego una dosis de eCG en el Día 6, cuando se administró la primera PGF2 $\alpha$ . Sin duda estos tratamientos se presentan como una opción muy interesante que debe ser tenida en cuenta.

**Tabla 6.** Respuesta superovulatoria (medias  $\pm$  EE) en donantes Brangus tratadas con Folltropin-V administrada en 8 aplicaciones cada 12 h durante 4 días (Control), con solo las primeras 4 inyecciones de Folltropin-V y luego con 400 UI de eCG (FSH+eCG Día 6) o con las primeras 6 inyecciones de Folltropin-V y luego 2 inyecciones (cada 12 h) de 200 UI de eCG (FSH+eCG Día 7).

Grupos	n	Ovocitos / embriones totales	Ovocitos fertilizados	Embriones grados 1 y 2	Embriones grados 1, 2 y 3
Control	18	10,9 $\pm$ 1,2a	7,4 $\pm$ 1,1a	5,9 $\pm$ 1,1a	6,4 $\pm$ 1,1a
FSH+eCG Día 6	21	12,2 $\pm$ 1,8ab	9,6 $\pm$ 1,4ab	7,4 $\pm$ 1,1a	8,0 $\pm$ 1,2ab
FSH+eCG Día 7	21	15,6 $\pm$ 1,6b	11,6 $\pm$ 1,3b	10,1 $\pm$ 1,1b	10,7 $\pm$ 1,2b
Valor P		0,10	0,08	0,03	0,04

## COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIONES

La incorporación de los protocolos que controlan la dinámica folicular y la ovulación ofrece la ventaja de poder programar los tratamientos rápidamente y en momentos predeterminados, sin la necesidad de detectar los ce-

los de las vacas. Estos tratamientos son prácticos y fáciles de realizar por el personal de campo, y lo más importante es que no dependen de la pericia y exactitud en la observación de celos para realizar las inseminaciones. Sin embargo, el estradiol, que ha probado ser el más útil para cumplir con los objetivos, está siendo retirado de muchos laboratorios veterinarios alrededor del mundo. Aunque la administración de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular parece ser demasiado variable para superestimulación, la pre-sincronización mejora las respuestas y se puede de esta manera superestimular a las donantes en el momento de emergencia de la primera onda folicular (en el día de la ovulación), con resultados similares a los que se obtienen utilizando estradiol. Con respecto a los tratamientos con FSH, los trabajos más recientes resumidos en esta revisión han demostrado que es posible superestimular donantes con la administración de una sola inyección im de FSH diluida en una solución de liberación lenta. Por último, el tratamiento superestimulador combinando FSH para reclutar los folículos en la onda y luego eCG para estimular el crecimiento final de los folículos reclutados, se presenta como una alternativa muy interesante para aumentar la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones obtenidos por tratamiento.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de los estudiantes y técnicos del Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) y la provisión de las hormonas a Bioniche Animal Health (Canadá) y Biotay SA (Argentina).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, G.P., Nasser, L.E, Bo, G.A., Garcia, A., Del Campo, M.R. and Mapletoft, R.J. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42, 1103-1113.
2. Al-Shakhshir, R.H., Regnier, EE., Whiate, J.L., and Hem, S.L. 1994. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 12, 472-4.
3. Barros, C.M., Barcelos, A.C.Z., Gouvea, L.M., Meneghel, M., Barcelos, D.S., Barcelos, L.N., and Trinca, L.A. 2008. Improvement of a superovulatory protocol in nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 152 (abstract).
4. Baruselli, P.S., Sá Philo, M., Matins, C.M., Naser, L.F1, Nogueira, M.EG., Barros, C.M., and Bó, G.A. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos Indicus* cattle. *Theriogenology* 65,77-88
5. Baylor, N.W., Egan, W., and Richman, P 2002. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine* 20, S18-23.
6. Beal, W.B. 1999. Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, pp. 66-77.
7. Bellows, R.A., Anderson, D.C., and Short, R.E. 1969. Dose-response relationships in synchronized beef heifers treated with follicle stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* 28, 638-644.
8. Bergfelt, D.R., Lightfoot, K.C., and Adams, G.P. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42, 895-907.
9. Bergfelt, D.R., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., and Adams, G.P. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 49, 1-12.
10. Bó, G.A., Hockley, D.K., Tríbulo, H., Jofre, E, Tríbulo, R., Busso, N., Barth, A.D., and Mapletoft, R.J. 1991. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology* 35, 186 (abstract).
11. Bó, G.A., Hockley, D.K., Nasser, L.E, and Mapletoft, R.J. 1994a. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42, 963-975.
12. Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Caccia, M., Tribulo, H., and Mapletoft, R.J. 1994b. Follicular wave dynamics after estradiol 1743 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41, 1555-1569.
13. Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Person, R.A., and Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 193-204.
14. Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., and Mapletoft, R.J. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17(3 treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 45, 897-910.
15. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., and Mapletoft, R.J. 2002a. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53-72.
16. Bó, G.A., and Caccia, M. 2002b. Dinámica folicular en el bovino. En: *Reproducción en los animales domésticos*, Tomo I. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 55-68.
17. Bó, G.A., and Mapletoft, R.J. 2003. Superovulación en Bovinos. En: *Reproducción en los animales domésticos*, Tomo II. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 515-538.
18. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P, and Martins, C.M. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65,89-101.
19. Bó, G.A., Carballo Guerrero, D., and Adams, G.P. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69, 81-87.
20. Brogliatti, G., Bó, G.A., Alísio, L., Martinez, M., Palasz, A., and Mapletoft, R.J. 1996. Efecto de la dosis y la vía de administración de Folltropin en la superestimulación de vacas Holstein. II Simposio Internacional de Reproducción Animal, 31 oct. - 2 nov. Carlos Paz, Córdoba, Argentina. pp. 248 (abstract).
21. Bungartz, L., and Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fert.* 101, 583-591.

22. Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., and Bó, and G.A. 2000. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 53, 495 (abstract).
23. Callejas, S.S., Alberio, R., Cabodevila, J.A., Dulout, E., Aller, J., and Teruel, M. 2002. Ovarian stimulation with FSH-P in single dose in polivinylpirrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-P and eCG. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 22, 141-151.
24. Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, R., Balla, E., Tríbulo, H., and Chesta, P 2007 Efecto de la aplicación de eCG dos días previos al inicio de la superestimulación en donantes de embriones con antecedentes de baja respuesta a los tratamientos tradicionales. *Proceedings VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*, June 29 to July 1, 2007, Córdoba, Argentina. pp.289 (abstract).
25. Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo R., Tríbulo, H., and Bó G.A. 2008a. Superstimulation in the first follicular wave, without the use of estradiol in bonsmara cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 226 (abstract).
26. Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo R., Tríbulo, H., Mapletoft R.J., and Bó G.A. 2008b. Efeito do protocolo de pré-sincronização na resposta superovulatória na primeira onda folicular em doadoras brangus. *Acta Scientiae Veterinariae* 36 (Supl 2), 631 (abstract).
27. Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo R., Tríbulo, H., and 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, 242-243.
28. Choi, S.H., Park, Y. S., Cho, S.R., Kang, T.Y., Sin, S. H., Kang, S.S., Rho, G.J., and Choe, S.Y. 2002. Superovulation response and quality of embryos recovered from cattle after a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyethylene glycol. *Korean J. Emb. Trans.* 17, 67-77.
29. Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Small, J.A., Wilde, R.E., Ward, D.R., and Mapletoft, R.J. 2007a. Ovarian follicular dynamics, CL function, estrus, ovulation, and fertility in beef cattle resynchronized with progestins and ECP, GnRH or progesterone. *Can Vet J.* 48, 49-56
30. Colazo, M.G., Ambrose, D.J., and Mapletoft, R.J. 2007b. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. *J Dairy Sci*, 90, 328 (abstract).
31. Demoustier, J.M., Beckers, J.E, Van Der Zwalmen, P, Closset, J., Gillard, J., and Ectors, F.R. 1988. Determination of porcine plasma Follitropin-V levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30, 379-386.
32. Deyo, C.D., Colazo, M.G., Martinez, M.F., and Mapletoft, R.J. 2001. The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology* 55, 513 (abstract).
33. Edwards, L.M., Rahe, C.H., Griffin, J.L., Wolfe, D.E, Marple, D.N., and Cummins, K.A. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 28, 291-9.
34. Gimenes, L., Sá Filho, M.E, Madureira, E.H., Trinca, L.A., Barros, C.M., and Baruselli, P.S. 2005. Estudo ultrasonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos Indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, 33 (supl. 1), 210 (abstract).
35. Ginther, O.J., Kastelic, J.P, and Knopf, L. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J. Reprod Fertil.* 87, 223-230.
36. Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., and Kot, K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194.
37. González, A., Wang, H., Carruthers, ID., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994a) Increased ovulation rates in PMSG-Stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 41, 1631-1642.
38. González, A., Wang, H., Carruthers, ID., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994b. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotropin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J*, 35: 158-162
39. Hill, B.R, and Kuehner, L.F. 1996. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle. *Theriogenology* 43, 324. (abstract).
40. Hockley D.K., Bó G.A., Palasz A.T., Del Campo M.R., Mapletoft R.J. 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37, 224 (abstract).
41. Jaiswal, R.S., Singh, J., and Adams, G.P. 2004. Developmental pattern of Small antral follicles in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 71,1244-1251.
42. Kim, H.I., Son, D.S., Yeon, H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S., Lee, H.J., and Yoon, J.T. 2001. Effect of dominant follicle removal before superovulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55, 937-945.
43. Kimura, K., Hirako, M., Iwata, H., Auki, M., Kawaguchi, M., and Seki, M. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* 68, 633-639.
44. Lane, E.A., Austin, E.J., and Crowe, M.A. 2008. Oestrous synchronisation in cattle-Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, 109, 1-16.
45. Laster, D.B. 1972. Disappearance of and uptake of (125I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fertil.*, 30, 407-415.
46. Licht, P, Bona Gallo, A., Agarwal, B.B., Farmer, S.W., Castellino, J.B., and Papkoff, H. 1979. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. *J. Endocrin.*, 83, 311-322.
47. Lindsell, C.E., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1986. Superovulatory endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26, 209-219.
48. Looney, C.R., Boutle, B.W., Archibald, L.E, and Godke, R.A. 1981. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulation, O beef cattle. *Theriogenology* 15, 13-22.

49. Lovie, M., García, A., Hackett, A., and Mapletoft, R.J. 1994. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to fooltropsin in holstein cows. *Theriogenology* 41, 241.
50. Macmillan, K.L., and Thathcher, W.W. 1991. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45, 883-889.
51. Mapletoft, R.J., Bo, G.A., and Murphy, B.D. 1991. The effect of biological activity of gonadotropin on superovulation in the cow. *Proc IX Congreso Brasileiro de Reproducao Animal* 1, pp. 74-92.
52. Mapletoft, R.J., and Pierson, R.A. 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, 11: 14-24.
53. Mapletoft, R.J., Bó, G.A., and Adams, G.P. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 28 pp. 23-48.
54. Martinez, M.E., Adams, G.P., Bergfelt, D., Kastelic, J.P., and Mapletoft, R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in weifers. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 23-33.
55. Menchaca, A., Pinczak, A., Rubianes, E. 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH teratment initiated on Day O or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58, 1713-1721.
56. Mihm, M., and Evans, A.C.O. 2008. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Dom Anim*, 43: 48-56.
57. Monniaux, D., Chupin, D., and Saumande, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19, 55-81.
58. Murphy, B.D., and Martinuk, D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews* 12, 27-44.
59. Nasser, L., Adams, G.P., Bó, G.A., and Mapletoft, R.J. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergente in heifers. *Theriogenology* 40, 713-724
60. Nasser, L.E, Bó, G.A., Reis, E.L., Menegati, J.A., Marques, M.O., Mapletoft, R.J., and Baruselli, P.S. 2003. Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 59, 530 (Abstract).
61. Price, C.A., Carriere, P.D., Gosselin, N., Korham, H., and Guilbault, L.A. 1999. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenolgy* 51, 37-46
62. Pursley, J.R., Mee, M.O., and Wiltbank, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGFza and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.
63. Reano, I., Carballo, D., Tribulo, A., Tribulo, P, Balla, E, y Bó, G.A. 2009. Memorias del VIII Simposio Internacional del IRAC; 10 al 12 de julio de 2009, Córdoba, Argentina (abstract).
64. Ribadu, A.Y., Nakada, K., Moriyoshi, M., Zhang, W.C., Tanaka, Y., and Nakao, T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 64, 21-31.
65. Sartorelli, E.S., Carvalho, L.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., and Barros, C.M. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos Indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63, 2382-2394.
66. Sartori, R., Guardieiro, M.M., Barros, C.M., Bastos, M.R., Machado, G.M., Leme, L.O., and Rumpf, R. 2009. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superovulated nelore heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 245 (abstract).
67. Schams, D., Menzer, D., Schalenberger, E., Hoffman, B., Hahn, J., and Hahn, R. 1977. Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: *Control of Reproduction in the Cow*. Sreenan JM (ed.), Martinus Nijhoff: The Hague. pp.122-142.
68. Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., and Adams, G.P. 2004. A simple ultrasound test to predict superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227-243.
69. Small, J.A., Colazo, M.G., Kastelic, J.P., and Mapletoft, R.J. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy ratos to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71, 698-706.
70. Steward, E, Allen, W.R., and Moor, R.M. 1976. Pregnant mare serum gonadotropin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinzing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J. Endocrin.* 71, 471-482.
71. Stoebel, D.P., and Moberg, G.P. 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 65:92-6.
72. Sutherland, W 1991. Biomaterials - Novel material from biological sources. Ed. By Byrom, DPublished by Stockton Press, pp 307-333.
73. Swann, D.A., and Kuo, J.W. 1991. "Hyaluronic acid". Biomaterials - Novel material from biological sources. Ed. By Byrom, D- Published by Stockton Press, pp 285-307.
74. Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.E, and Boland, M.P. 1993. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 40, 313-321.
75. Wock, J.M., Lyle, L.M., and Hockett, M.E. 2008. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradio1-17P at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 228 (abstract).
76. Wright, JM. 2000. Ilustraciones fotográficas de la fase de desarrollo del embrión y códigos de calidad. En: Stringfellow DA, Seidel SM (Editores). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)*. Versión en castellano. Savoy, IL, USA; pp 175-178.
77. Yamamoto, M., Oow, M., Kawaguchi, M., and Suzuki, T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41, 747-755.

Volver a: [Trasplante embrionario y clonación](#)