

## Capítulo LXXVIII

### **Avances en los protocolos hormonales de superovulación para la producción *in vivo* de embriones bovinos**

Juan Carlos Gutiérrez Añez

La transferencia de embriones (TE) es una técnica reproductiva que consiste en la deposición de un embrión recuperado del tracto genital de una hembra donante en el de otra, receptora. El objetivo de la transferencia de embriones en bovinos, es obtener a partir de progenitores de alto mérito genético el mayor número de descendientes posible, utilizando el útero de receptoras de menor valor económico para que estas lleven la gestación a término.

La producción de embriones *in vivo* es denominada internacionalmente por sus siglas en inglés como MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer). Después de un tratamiento hormonal se consigue la hiperestimulación ovárica o superovulación; al final del tratamiento las vacas son inseminadas con semen tradicional o sexado de un macho también de alto mérito genético, produciendo de esta manera individuos genéticamente superiores que colaboran en acelerar el progreso genético del rebaño.

Con esta biotecnología, se consigue en las hembras donantes puedan producir en un ciclo de 10 a 14 óvulos que se fecundarán *in vivo*, obteniendo así 6-8 embriones por ciclo. Cada vaca desde el punto de vista fisiológico y metodológico puede ser superovulada tres a cuatro veces al año, bajando en la mayoría de los casos la calidad de la respuesta después de tratamientos sucesivos. En líneas generales, con una tasa de preñez alrededor del 50% se pueden obtener en la vida útil de una vaca donadora de embriones mediante MOET entre 100 y 150 crías, permitiendo un máximo aprovechamiento de cada individuo genéticamente superior.

Una de las fases más complejas de la transferencia de embriones es la superovulación de la donadora, en la cual la respuesta suele ser muy variable debido a diversos factores intrínsecos y extrínsecos del animal; así como por lo compleja de su aplicación comercial desde un punto de vista técnico-metodológico. En este Capítulo se describen algunos aspectos básicos sobre la superovulación de donantes y en los avances que existen en los distintos protocolos hormonales que buscan incrementar y/o

mantener la respuesta superovulatoria, al igual que, aquellos diseñados para facilitar el manejo desde el punto de vista metodológico.

## **BASES FISIOLÓGICAS PARA LA SUPEROVULACIÓN**

Desde el punto de vista fisiológico, recordemos que la vaca es una especie mono-ovular (una sola ovulación), cuyos mecanismos regulatorios intrínsecos están dados por lo que conocemos como ondas de crecimiento folicular. En estas ondas participan una compleja y solo parcialmente conocida cascada de actividades combinadas del sistema nervioso central, cierto número de tejidos secretores, tejidos efectores u órganos blanco y diversas hormonas, además de factores de crecimiento a través de interacciones endocrinas, paracrinas y autocrinas.

Tanto en vacas y novillas, el crecimiento folicular durante el ciclo estral se caracteriza por la presencia de dos o tres (raramente cuatro) ondas de desarrollo folicular (Adams *et al.*, 2008). Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos antrales pequeños (en promedio 20 por onda dependiendo de la raza), a través de tres etapas denominadas: reclutamiento, selección y dominancia folicular. El reclutamiento folicular se caracteriza por el desarrollo de una cohorte de folículos, de los cuales va a emerger un folículo dominante como resultado de la selección folicular. El reclutamiento, en líneas generales, es un proceso bajo la responsabilidad de la hormona FSH, en el cual un conjunto de folículos antrales tempranos, de 2-3 mm de diámetro, comienzan a crecer. Un folículo determinado es seleccionado, se hace dominante e inhibe el crecimiento de otros folículos ováricos, siendo éste un proceso mediante el cual un único folículo evade la atresia y adquiere competencia para alcanzar la ovulación, en un proceso que ha sido definido como desviación (Ginther *et al.*, 1996); los demás folículos reclutados que no continuaron creciendo, sufren atresia o regresionan. Mientras exista la dominancia del folículo seleccionado, se inhibe el reclutamiento de una nueva serie de folículos (Sunderland *et al.*, 1994).

Durante las ondas foliculares no ovulatorias (1<sup>ra</sup> onda en vacas de dos, 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> onda en vacas de tres ondas; 1<sup>ra</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> en las de cuatro), el folículo dominante continúa creciendo hasta que pierde su dominancia y se hace atrésico, y otra cohorte de folículos crece e inicia una nueva onda folicular. Este mecanismo está dado por el feed-back negativo que ejerce la progesterona producida por la onda ovulatoria del ciclo anterior para la producción de un pico de LH. Si la fase de dominancia coincide con la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo), este folículo dominante será el próximo folículo ovulatorio (Webb *et al.*, 1992); suponiendo entonces que quien determina el número de ondas foliculares en las vacas podría ser la vida del cuerpo lúteo.

El mecanismo de la dominancia no ha sido totalmente establecido, pero se ha determinado que el control hormonal del desarrollo folicular parece ser llevado a cabo de una manera orquestada por hormonas secretadas por el hipotálamo, la hipófisis y otros factores de crecimiento secretados por los folículos ováricos (Díaz, 1999); entre estos factores tenemos las inhibinas, activina, IGF-I, IGF-II, proteínas transportadoras de IGF, TGF- $\alpha$ , EGF, TGF- $\beta$ . Estradiol e inhibina, se complementan mutuamente para regular la secreción hipofisaria de FSH por vía endocrina, aunque al mismo

tiempo la inhibina parece tener un efecto parácrino al incrementar la síntesis de andrógenos en las células tecales, inducida por LH (Wrathall & Knight, 1995).

El desarrollo del folículo dominante hasta las dimensiones preovulatorias depende estrictamente de las gonadotropinas (FSH y LH). Los folículos dominantes antrales adquieren los receptores para LH en la teca y para FSH en la granulosa. La FSH estimula el desarrollo de los folículos ováricos y la LH estimula en las células de la teca la síntesis de andrógenos (androstenediona) a partir del colesterol (Orisaka *et al.*, 2006). La androstenediona se convierte en testosterona, que se aromatiza en las células de la granulosa del folículo, bajo la influencia de la FSH a  $17\beta$  estradiol (Roberts & Skinner, 1990). Los estrógenos ( $17\beta$  estradiol) producen un *feed-back* negativo a nivel hipofisiario para la secreción de FSH y un *feed-back* positivo para la liberación de LH.

El cambio clave, o la llave que determina la competencia ovulatoria de un folículo es la adquisición de receptores para LH por las células de la granulosa. En los folículos donde esto ocurre, la LH actúa induciendo la síntesis de grandes cantidades de estrógenos en sinergia con la FSH. Este proceso es un refuerzo en el que los estrógenos inducen la formación de más receptores de LH, la cual con la FSH producen una nueva secreción de estrógenos. Los folículos bovinos que se vuelven dominantes o estrógeno-activos producen mucho más estrógenos que los subordinados y tienen de manera considerable mayor número de receptores tanto de LH como de FSH (Mihm & Evans, 2008).

Producto del incremento en el número de receptores de LH, el folículo dominante puede ser capaz de seguir creciendo, aún en un medio con bajas concentraciones plasmáticas de FSH, mientras que los folículos subordinados expiran con estos bajos niveles (Webb *et al.*, 1992). Durante el progreso 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* (Ginther *et al.*, 1996) y 6,2 mm en la vaca *Bos indicus* (Gimenes *et al.*, 2005). Después de ese tamaño, el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa, por lo que se dice que su crecimiento hasta la ovulación pasa a ser LH dependiente (Mihm & Evans, 2008).

Las terneras al nacimiento pueden tener entre 40.000 a 80.000 folículos primordiales, reduciéndose aproximadamente a 3.000 hacia los 15 a 20 años de edad (Erickson, 1966). En condiciones normales, el 99% de los folículos primordiales no son ovulados durante la vida del animal (Hsueh *et al.*, 1994), por lo que el desarrollo de un folículo ovulatorio es un hecho biológico raro y la foliculogénesis es un proceso complejo (Ireland, 1987).

En bovinos hay una jerarquía marcada en la gran población de folículos antrales, presentando entre 20 a 30 folículos de 3 a 4 mm de diámetro que tienen la capacidad de responder a las gonadotropinas, aunque no necesitan de ellas. En la actualidad, se desconocen los factores que determinan las fases iniciales de crecimiento folicular en el ovario en un determinado momento. El destino de un folículo puede ser permanecer en latencia, empezar a desarrollarse para luego hacerse atrésico, o madurar y ovular.

En los ciclos estrales de dos ondas de desarrollo folicular, la primera onda se puede detectar a las pocas horas de haber ocurrido la ovulación (día 0), dado a que se suprime el efecto inhibitorio de los estrógenos y la inhibina sobre la secreción de

FSH. El destino de esa onda es la atresia como se describió anteriormente, pudiéndose observar el día 10 post ovulación, una segunda onda folicular. Este último folículo es el que ovulará, ya que la regresión del cuerpo lúteo ocurre entre los días 16-17 del ciclo. En ciclos estruales con tres ondas foliculares, se pueden detectar los días 0, 8-9 y 16 después de la ovulación; siendo las dos primeras ondas anovulatorias debido a que la fase luteal se mantiene hasta el día 18-19 del ciclo (Adams *et al.*, 2008).

La superovulación (SO) en el ganado bovino consiste en hacer de esa especie mono-ovular individuos que logren producir múltiples óvulos en un mismo ciclo. Para ello son utilizadas gonadotropinas exógenas provenientes de diferentes extractos. Las hormonas mayormente utilizadas han sido la antes llamada gonadotropina sérica de la yegua preñada (PMSG), en la actualidad denominada gonadotropina coriónica equina (eCG); y aquellas provenientes de extractos de hipófisis porcina que generalmente se conocen como FSH-p, las cuales contienen diferentes proporciones o relación FSH:LH de acuerdo al producto y/o lote comercial.

La eCG es una glicoproteína producida por los cálices endometriales de la yegua entre 40 a 130 días de gestación (Murphy & Martinuk, 1991). La relación FSH/LH de esta hormona varía durante la preñez (Papkoff, 1981). La eCG debido a su elevado peso molecular no atraviesa el filtro renal y por lo tanto, tiene larga vida media en la sangre de alrededor de tres días. Esto permite inducir SO en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 12 del ciclo estral (Saugmande *et al.*, 1984). Sin embargo, su permanencia prolongada en sangre provoca un crecimiento folicular disperso, con niveles altos de estrógenos que afectan tanto la tasa de fertilización como la calidad embrionaria, además de generar procesos inmunitarios que hacen necesario, en tratamientos posteriores, emplear una mayor dosis de hormona para lograr el mismo efecto (Ramakrishna & Ramachandraiah, 1989).

La FSH-p es la gonadotropina más empleada en el pasado y en el presente de la SO de hembras bovinas. Se caracteriza por tener una vida media corta (alrededor de 5 horas), por lo que el tratamiento de SO con esta hormona se basa en la administración de dos dosis diarias a intervalos de 12 horas durante 4 días (Looney *et al.*, 1981), de forma decreciente. Generalmente se administra el 40% de la dosis el primer día de la SO, luego el 30%, 20% y 10%, el segundo, tercer y cuarto día, respectivamente. La dosis varía de acuerdo con la especie, pero en general se utilizan concentraciones menores en ganado *Bos indicus* (100-133 mg; Baruselli *et al.*, 2006) y mayores en ganado *Bos taurus* (200-320 mg; Bó *et al.*, 2009). En menor medida, se han utilizado extractos de pituitaria equina (EPE) u ovina (FSH-o) (Alberio *et al.*, 1991) y una gonadotropina aislada de la orina de mujeres menopáusicas (hMG) (Lauria *et al.*, 1982).

## **AVANCES EN LOS PROTOCOLOS HORMONALES DE SUPEROVULACIÓN**

### **Programas de superovulación mediante manipulación de la onda folicular**

Tradicionalmente existen unas premisas fisiológicas que determinan el momento del inicio de los tratamientos SO. Se requiere de un número importante de folículos capaces de responder al estímulo de las gonadotropinas exógenas (en fase no

atrésica); así como el control de la ovulación de los mismos una vez hayan alcanzado la talla ovulatoria. Para ello, es necesario que estén dadas dos condiciones: iniciar el estímulo gonadotrópico en conjunto con el inicio de una onda folicular y que exista un ambiente alto de progesterona (P4), que inhiba la producción de un pico de LH lo que permitirá controlar la respuesta superovulatoria.

En ese sentido, si se inicia el tratamiento superovulatorio en la 1<sup>ra</sup> onda de desarrollo folicular (uno a dos días después del celo), se lograría el estímulo y el reclutamiento de varios folículos, pero los niveles de P4 podrían ser bajos e insuficientes para bloquear la producción de un pico de LH. Ese hecho no permitiría controlar las ovulaciones de aquellos folículos que alcancen la talla ovulatoria, produciendo dispersión entre las ovulaciones y limitando la determinación de un momento preciso para efectuar la Inseminación Artificial (IA).

La variabilidad en la respuesta de las donadoras al tratamiento SO con gonadotropinas continúa siendo uno de los mayores problemas de los programas comerciales de TE en el ganado bovino (Mapletoft *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*, 2006). Esta variación individual a los tratamientos de SO ha sido descrita tanto en vacas Nelore (*Bos indicus*; Baruselli *et al.*, 2003), como en vacas Holandesas de alta producción (*Bos taurus*; Martins, 2005; revisado por Baruselli *et al.*, 2009).

El protocolo tradicional de SO o tratamiento gonadotrópico, por lo general, se inicia hacia la mitad del ciclo estral, 8-12 días después de la ovulación. Esto se debe a que en la mayoría de las vacas, bien sea de dos o de tres ondas foliculares, la segunda onda folicular puede comenzar entre los días 8 y 12 del ciclo (Adams *et al.*, 2008), independientemente del número de ondas; en ese momento la P4 se encuentra alta lo que favorece el control de las ovulaciones. En ese sentido, este tratamiento convencional presenta como inconvenientes, que se requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos las 24 horas del día, así como una respuesta 100% efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado “celo base”; además, desde el punto de vista práctico, que es imposible tener a todas las donantes a ser superestimuladas al inicio de una onda folicular, el día que elegimos comenzar con la aplicación de las gonadotropinas (Bó *et al.*, 2009).

La ausencia de un folículo dominante y la realización de la SO al inicio de la onda de crecimiento folicular aumenta la eficiencia de los programas MOET (Mapletoft *et al.*, 2002). Diversos estudios han demostrado que la respuesta superovulatoria suele ser mayor cuando los tratamientos se inician en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 ó 2 días más tarde (Nasser *et al.*, 1993), aunque esa precisión haría necesaria realizar evaluaciones ultrasonográficas periódicas, lo que sería una limitación para la aplicación comercial de la TE.

Las alternativas para controlar la emergencia de la onda de crecimiento folicular, en momentos aleatorios del ciclo estral sin la necesidad de la detección del celo para establecer el “estro base”, pueden facilitar el manejo de las donadoras tanto *Bos taurus* como *Bos indicus* y aumentar la eficiencia de los programas de TE (Baruselli *et al.*, 2006).

Como se discutió al inicio de este capítulo, existen dos eventos fisiológicos que determinan el inicio de una nueva onda folicular, ellos son la ovulación o la atresia de

un folículo dominante. Para manipular la onda folicular y predecir con mayor precisión el inicio de un tratamiento SO a fin de encontrar una mejor respuesta, se han diseñado diferentes tratamientos que permiten producir esos eventos fisiológicos y de esa manera iniciar programas de TE en cualquier etapa del ciclo estrual. Uno de esos tratamientos ha sido la utilización de progestágenos y esteroides de estradiol de vida media corta como el  $17\beta$  estradiol (E- $17\beta$ ) y el Benzoato de Estradiol (BE), que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 3-4 días después (Bó *et al.*, 1994; Baruselli *et al.*, 2009); permitiendo el desarrollo de protocolos hormonales para la SO de donantes bovinos sin la detección de un celo base (Baruselli *et al.*, 2006). Sin embargo, la utilización de ésteres de estradiol para la manipulación de las ondas foliculares ha sido restringida recientemente en países como USA, Nueva Zelandia y la Unión Europea (Bó *et al.*, 2009); lo cual ha creado la necesidad de desarrollar tratamientos que sincronicen el comienzo de una nueva onda folicular sin utilizar estas hormonas.

Una alternativa diferente al uso de estradiol consiste en eliminar por punción guiada por ultrasonografía todos los folículos  $\geq 5$  mm y de esta manera inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después (Bergfelt *et al.*, 1994). La superovulación podría ser iniciada entonces uno o dos días después de la ablación del folículo dominante o de todos los folículos presentes en el ovario (Baracaldo *et al.*, 2000). Algunas de las limitaciones que tiene este método es que se requiere de un equipo de ultrasonografía y de personal capacitado para realizar dicho trabajo.

Otra alternativa para manipular la onda folicular e iniciar un tratamiento superovulatorio ha sido la utilización de factores liberatorios de gonadotropinas (GnRH) y Hormona Luteinizante porcina (pLH), las cuales pueden inducir la ovulación del folículo dominante (Macmillan & Thatcher, 1991) y generar el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después (Pursley *et al.*, 1995). Este método tiene como limitante que el comienzo de la onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en la ovulación del folículo dominante (Martinez *et al.*, 1999). En diferentes estudios con el uso de estas hormonas se han reportado tasas de ovulación del folículo dominante muy variables, las cuales oscilan entre 55% y 85%. Pursley *et al.* (1995) reportaron una tasa de ovulación del 85% después de la administración de GnRH, aunque otros trabajos más recientes (Colazo *et al.*, 2007) han reportado un promedio de ovulación de 62,4% después de la administración de LH porcina y 44,3% cuando las vacas fueron tratadas con GnRH ( $P < 0,01$ ).

En el Cuadro 1, se resume la respuesta superovulatoria en vacas *Bos indicus* y *Bos taurus* después de la manipulación de la onda folicular, que incluye la utilización de progestágenos combinados con esteroides de estradiol, ablación folicular mediante punción guiada por ultrasonido y la aplicación de GnRH y pLH utilizando diferentes hormonas superovulatorias.

Estos trabajos demuestran que después de la manipulación de la onda folicular es posible obtener tanto en animales *Bos taurus* como *Bos indicus* una buena respuesta a la SO con los diferentes extractos hormonales (FSH-p y eCG). La adopción de cualquiera de los métodos de manipulación de la onda dependerá de las particularidades de cada país y de la disponibilidad de cualquiera de los métodos sugeridos, así como de su viabilidad técnica y económica. Los protocolos de SO con la hormona eCG mos-

**Cuadro 1**  
**Respuesta superovulatoria en ganado bovino *Bos indicus* y *Bos taurus***  
**con diversos extractos hormonales (FSH-p y eCG) después de la manipulación**  
**de la onda folicular mediante diferentes métodos**

Método de manipulación de la onda	Inicio de la SO, hormona y dosis	Total de embriones/estructuras	Embriones Transferibles	Tipo de animales	Fuente
D0: E2+P4: (DIB+3mgBE)	Día 5-8 133mg FSH-p (Folltropin-V)	13,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	<i>Bos indicus</i> Vacas Nelore	(1)
D0: E2+P4: (CIDR+3mgBE)	Día 4-8 133mg FSH-p (Folltropin-V)	8,67 ± 1,29 <sup>a</sup>	7,42 ± 1,11 <sup>a</sup>	<i>Bos indicus</i> Vacas Nelore	(2)
D0: E2+P4 (CIDR+2mgBE)	Día 4 2000 UI eCG (Novormon)	7,67 ± 0,98 <sup>a</sup>	6,67 ± 1,08 <sup>a</sup>	<i>Bos indicus</i> Vacas Nelore	(2)
D0: E2+P4 (CIDR+2mgBE)	Día 4-8 200mg FSH-p (Folltropin-V)	9,58 ± 1,21 <sup>a</sup>	7,92 ± 1,05 <sup>a</sup>	<i>Bos taurus</i> Vacas Holandesas	(3) <sup>1</sup>
D0: E2+P4: (CIDR+5mg17βE)	Día 4 2500 UI eCG (Novormon)	10,41 ± 0,82 <sup>a</sup>	8,08 ± 0,74 <sup>a</sup>	<i>Bos taurus</i> Vacas Holandesas	(3) <sup>1</sup>
D0: AFTU Fol Dom	Día 1-4 200 mg FSH-p (Folltropin)	11,0 ± 1.4 <sup>a</sup>	8,2 ± 1.2 <sup>a</sup>	<i>Bos taurus</i>	(4)
D0: AFTU Fol > 5mm	Día 4-7 200 mg FSH-p (Folltropin)	12,2 ± 1.3 <sup>a</sup>	8,4 ± 1.3 <sup>a</sup>	<i>Bos taurus</i>	(4)
D0: E2+P4: (CIDR+5mg17βE)	Día 4-7 200 mg FSH-p (Folltropin)	8,5 ± 1.3 <sup>b</sup>	6.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	<i>Bos taurus</i>	(4)
D0: E2+P4 (CIDR+4mg17βE)	Día 4-7 200 mg FSH (Folltropin)	9,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	<i>Bos taurus</i> Vacas Lecheras	(5)
D0: P4+D3:GnRH (CIDR+100 μgGnRH)	Día 5-8 200 mg FSH (Folltropin)	9,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	<i>Bos taurus</i> Vacas Lecheras	(5)

(1) Baruselli *et al.*, 2006; (2) Martins *et al.*, 2007; (3)<sup>1</sup> Martins *et al.*, 2008, revisado en Baruselli *et al.*, 2009; (4) Baracaldo *et al.*, 2000; (5) Wock *et al.*, 2008. AFTU: Ablación folicular transvaginal guiada por ultrasonido. Fol Dom: Folículo dominante; Fol > 5mm: Folículo mayores de 5 milímetros. (<sup>a,b</sup>) superíndices diferentes dentro de columnas en el mismo experimento difieren significativamente (P < 0,05).

traron una respuesta satisfactoria; sin embargo, en un estudio presentado por Baruselli *et al.*, (2009) indican que al cuarto tratamiento consecutivo de SO con eCG los animales produjeron menor cantidad de embriones transferibles cuando se comparó con el método de FSH-p. En ese mismo experimento, las donadoras del grupo eCG fueron SO por una quinta vez con FSH-p, encontrándose una recuperación en la respuesta SO, al producir similar cantidad de embriones comparado con el grupo control (FSH-p).

### **Aplicación de una dosis única de FSH para la superovulación**

Existen dos tipos de hormonas utilizadas tradicionalmente en la superovulación de donantes bovinos. Una de ellas, consiste en la aplicación intramuscular de una dosis alta (2000-3000 UI) de gonadotropina coriónica equina (eCG); el otro método consta de dos aplicaciones diarias cada 12 horas durante cuatro días de extractos hipofisarios que contienen FSH (Mapletoft *et al.*, 1991), en este caso son más utilizados los extractos hipofisarios de origen porcino.

La eCG, por ser una glicoproteína de vida media larga (más de 40 h), representa una ventaja desde el punto de vista práctico, ya que una sola aplicación sería suficiente para provocar una apropiada estimulación ovárica (Murphy & Martinuk, 1991). Sin embargo, los tratamientos SO que utilizan eCG se han caracterizado por presentar resultados más variables y generalmente más pobres cuando se comparan con los tratamientos que utilizan hormonas de origen hipofisario. Así mismo, la prolongada estimulación con eCG provoca un incremento en la cantidad de folículos anovulatorios en el momento de la colecta de embriones (González *et al.*, 1994); esto sería debido a que esta glicoproteína es capaz de inducir una respuesta inmunológica en los animales después de tratamientos sucesivos, generando anticuerpos que podrían comprometer una posterior respuesta superovulatoria. Por el contrario, la vida media de la FSH en la vaca es corta (5 horas) (Demoustier *et al.*, 1988), lo que conlleva a la necesidad de aplicaciones frecuentes para inducir una adecuada respuesta superovulatoria.

Los esquemas de aplicación de dos veces/día durante un mínimo de 4 días (ocho aplicaciones) de la FSH de origen hipofisario, ameritan un mayor manejo de los animales y una mayor atención. Además, el manejo de estas hormonas debe ser estricto en cuanto a la dosis, aplicación y cuidado, dado a que errores en ello pueden conllevar al fracaso de la respuesta superovulatoria, requiriendo personal debidamente entrenado para cumplir tal tarea. Estos aspectos limitan en muchos casos su uso cuando no están dadas las condiciones en los establecimientos para implementar estos programas de TE. Por otra parte, la generación de estrés por el manejo de los animales puede disminuir la respuesta superovulatoria al interferir con el pico de LH (Ribadu *et al.*, 2000). Recientemente el equipo de Bó *et al.* (2009) han propuesto el desarrollo de un tratamiento SO con una sola aplicación de FSH, el cual además 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 (Bó *et al.*, 2009).

Para inducir una respuesta superovulatoria con una única inyección de FSH, sería conveniente combinarla con agentes de liberación lenta y sostenible de la hormona durante varios días. Algunos de los agentes utilizados han sido el gel de hidróxido de aluminio (Kimura *et al.*, 2007) o polietilenglicol (PEG) (Choi *et al.*, 2002); ambos han demostrado ser efectivos para inducir una respuesta superovulatoria similar al tratamiento de 8 aplicaciones de FSH durante 4 días (Bó *et al.*, 2009).

En los últimos años se han realizado 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 (Bó *et al.*, 2009) fueron efectuados en donantes

de varias razas de carne (Angus, Brangus, Bonsmara y Braford) para probar la efectividad del protocolo. En el día 0, todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol  $17\beta$ , 50 mg de progesterona y un dispositivo Cue-Mate. El día 4, las vacas fueron superestimuladas con dos tratamientos: las vacas del Grupo Control ( $n=61$ ) recibieron Folltropin-V en dosis decrecientes por vía im cada 12 h durante 4 días, mientras que las vacas del Grupo Dosis Simple ( $n=64$ ) 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  $\text{PGF}_{2\alpha}$  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 inyectar la pLH y 12 h más tarde.

Los embriones se colectaron en el día 15 y fueron clasificados siguiendo las normas de la IETS (Internacional Embryo Transfer Society). En el día de la colecta, las donantes recibieron  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , para ser nuevamente tratadas entre 13 y 20 días después (30 a 40 días de intervalo entre colectas). EL número de ovocitos/embriones totales fue similar en ambos grupos (Control:  $12,2 \pm 0,6$  vs Dosis simple:  $12,0 \pm 0,8$ ;  $P > 0,05$ ). Así mismo, no se encontraron diferencias en la cantidad de embriones grado 1 y grado 2 en ambos tratamientos (Control:  $5,7 \pm 0,3$  vs Dosis simple:  $5,8 \pm 0,4$ ;  $P > 0,05$ ). Estos resultados, representan una alternativa de gran importancia a la hora de diseñar protocolo de SO simples.

### **Aplicación de la eCG al final de los tratamientos de superovulación**

Al inicio de este capítulo se mencionó la necesidad que tienen los folículos al final de su crecimiento, en especial de LH. Esto ha llevado a especular, que si los tratamientos SO incluyen una mayor cantidad de LH al final del tratamiento, la respuesta superovulatoria de alguna manera podría beneficiarse.

La eCG se liga a los receptores de FSH y LH de los folículos y a los receptores de LH del cuerpo lúteo (Stewart & Allen, 1981). En ese sentido se asume que la eCG tiene su acción FSH, pero también carácter luteotrópico (LH). En los equinos, la eCG causa la ovulación o la luteinización de los folículos durante la preñez, con el consiguiente aumento de la progesterona circulante (Murphy & Martinuk, 1991).

Estudios recientes con el objeto de evaluar el efecto que tiene la adición de eCG en los últimos días de superovulación, en un régimen de FSH han sido realizados por Reano *et al.* (2009), para lo cual diseñaron el siguiente experimento: 38 vacas y 25 novillas Brangus fueron divididas al azar para conformar tres grupos; el día 0 todas las donantes recibieron un dispositivo de liberación lenta de progesterona, junto a 50 mg de progesterona inyectable y 2,5 mg de benzoato de estradiol im. En la tarde del día 4 se iniciaron los tratamientos SO. Las donantes del Grupo Control recibieron 8 aplicaciones de Folltropin-V en forma decreciente cada 12 h y por 4 días, con una dosis total de 200 a 320 mg de acuerdo a la categoría (vaca o novilla). En la mañana y tarde del día 6 se aplicó  $\text{PGF}_{2\alpha}$  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 del día 6 recibieron solo las primeras 4 aplicaciones de Folltropin-V en forma decreciente, recibiendo en la mañana del día 6 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.

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 PGF<sub>2</sub>α, remoción del dispositivo, GnRH e IATF en estos dos grupos fueron realizadas como en el Grupo Control. El día 15 se colectaron los embriones y fueron evaluados según las normas de la IETS. Los resultados en el Cuadro 2, demuestran que los tratamientos SO con Folltropin-V combinados con eCG aumentaron la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones. Los autores concluyeron que posiblemente esos resultados pudieron ser debidos a la mayor necesidad de LH que requieren los folículos al final del tratamiento.

**Cuadro 2**  
**Respuesta superovulatoria (medias ± EE) en donantes Brangus tratadas con Folltropin-V (Control) o con Folltropin-V más eCG (FSH+400 UI eCG día 6 y FSH+200 UI eCG c/12 horas día 7) (Reano *et al.*, 2009)**

Grupos	N	Cuerpos Lúteos	Ovocitos/Embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones Gr1	Embriones Gr1, 2 y 3
Control	18	14,2±1,1 <sup>a</sup>	10,9±1,2 <sup>a</sup>	7,4±1,1 <sup>a</sup>	4,9±1,0 <sup>a</sup>	6,4±1,1 <sup>a</sup>
FSH+eCG Día 6	21	14,1±1,5 <sup>a</sup>	12,2±1,8 <sup>a</sup>	9,6±1,4 <sup>ab</sup>	6,4±1,1 <sup>ab</sup>	8,0±1,2 <sup>ab</sup>
FSH+eCG Día 7	21	18,8±1,3 <sup>b</sup>	15,8±1,6 <sup>a</sup>	11,6±1,3 <sup>b</sup>	8,8±1,1 <sup>b</sup>	10,7±1,2 <sup>b</sup>
Valor P	0,021	0,1009	0,0805	0,0364	0,0426	

## CONCLUSIONES

El desarrollo de un régimen hormonal que permita en primera instancia evadir los controles fisiológicos de la regulación folicular, y en segunda instancia que garantice el aporte de las hormonas necesarias, en las dosis requeridas y en los momentos más oportunos permitirá el desarrollo folicular y la ovulación de múltiples folículos, cuyos óvulos podrán tener la mayor competencia y probabilidad de ser fecundados.

Los programas de superovulación que incorporan protocolos hormonales para manipular la dinámica folicular y la ovulación parecen ser los más efectivos y se caracterizan por presentar los resultados más homogéneos. Adicionalmente tienen la ventaja que permiten la programación de tratamientos sin la necesidad de la detección del celo, lo que facilita el manejo.

El estradiol que ha probado ser el más útil para cumplir con estos objetivos está siendo prohibido en muchos países alrededor del mundo. Otros métodos de manipulación del desarrollo folicular que incluyen el uso de GnRH y ablación folicular mediante punción ovárica guiada por ultrasonido pueden representar alternativas diferentes al estradiol. Sin embargo, ambos métodos requieren superar varios aspectos; el primero en inducir efectivamente la manipulación de la onda folicular y el segundo, aumentar su viabilidad en los programas comerciales a nivel de campo.

La aplicación de FSH en una sola dosis para lograr la estimulación ovárica representa una alternativa muy interesante para la simplificación de los tratamientos SO. El uso de eCG en combinación con la FSH al parecer mejora significativamente la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones obtenidos. Sin embargo, es necesario mayor cantidad de estudios con el fin de determinar si esa respuesta puede ser mantenida en superovulaciones sucesivas.

Finalmente, la implementación de un programa de TE requiere del total conocimiento de la fisiología, la determinación del mejor momento para iniciar la superovulación, los productos hormonales utilizados, su principio activo, mecanismo de acción, dosis; así como todos aquellos aspectos técnicos, metodológicos y de manejo que permitan obtener la mayor respuesta y hacer de la transferencia de embriones una tecnología comercialmente viable.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, Jaiswal R, Singha J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69 (1): 72-80.
- Alberio R, Cabodevila J, Iovannitti B, Torquati S, Palma G. 1991. Comparación de tratamientos superovulatorios en cuatro cursos de transferencia de embriones (TE). VI Reunión Anual Soc Brasil Transf Embrion. Curitiba, Brasil.
- Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ. 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 53 (6): 1239-1250.
- Baruselli PS, Marques MO, Reis EL, Nasser LFT, Silva RCP, Menegatti JA, Valentin, R, Santos ICC. 2003. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). *Acta Scient Vet* 31: 244-245.
- Baruselli PS, Sá Philo M, Matins CM, Naser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos Indicus* cattle. *Theriogenology* 65 (1): 77-88.
- Baruselli PS, Sales JN, Crepaldi GA, Sá filho MF. 2009. Uso de la eCG en biotecnologías reproductivas en bovinos. *Memorias VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC 2009, Córdoba Argentina*. Ponencias: 1-26.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Caccia M, Tribulo H, Mapletoft RJ. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol 17- $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41, 1555-1569.
- Bó GA, Carballo-Guerrero D, Tríbulo A, Tríbulo H, Tríbulo R, Mapletoft R. 2009. Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. *Memorias III Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC 2009, Córdoba Argentina*. Ponencias: 1-18.
- Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42, 895-907.
- Colazo MG, Ambrose DJ, Mapletoft RJ. 2007. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. *J Dairy Sci* 90: 328 (abstr).
- Choi SH, Park YS, Cho SR, Kang TY, Sin SH, Kang SS, Rho GJ, Choe SY. 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.

Demoustier JM, Beckers JF, Van Der Zwalmen P, Closset J, Gillard J, Ectors FR. 1988. Determination of porcine plasma Follitropin-V levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30:379-386.

Díaz T. Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. 1999. *Rev Fac Ciens Vets UCV* 40 (1): 3-18.

Erickson BH. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 25: 800-805.

Gimenes L, Sá Filho MF, Madureira EH, Trinca LA, Barros CM, Baruselli PS. 2005. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos Indicus*). *Acta Scienc Vet* 33 (supl. 1): 210 (abstract).

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55: 1187-1194.

González A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft, R.J. 1994. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotropin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J* 35: 158-162.

Hsueh AJW, Billig H, Tsafri A. 1994. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endoc Rev* 15:707-724.

Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fert* 34 (Suppl.): 39-54.

Kimura K, Hirako M, Iwata H, Auki M, Kawaguchi M, Seki M. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* 68: 633-639.

Lauria A, Oliva O, Genazzani A, Cremonesi F, Crotti S, Barbetti M. 1982. Improved method to induced superovulation in cattle using menopausal gonadotrophin (HMG). *Theriogenology* 18:357-372.

Looney C, Boutte B, Archpald L, Godke R. 1981. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology* 15:13-22.

Macmillan KL, Thatcher WW. 1991. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 45:883-889.

Mapletoft RJ, Bo GA, Murphy BD. 1991. The effect of biological activity of gonadotropins on superovulation in the cow. *Proc IX Congresso Brasileiro de Reproducao Animal* 1: 74-92.

Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 42: 601-611.

Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in weifers. *Anim Reprod Sci*, 57:23-33.

Martins CM, Oliveira LG, Crepaldi GA, Sales JNS, Baruselli PS. 2007. Efeito de diferentes doses de eCG na resposta superovulatória de doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. *Acta Sci Vet* 35: 1237.

Mihm M, Evans ACO. 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.

Murphy BD, Martinuk D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12:27-44.

- Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40: 713-724.
- Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S, Yoshida Y, Kotsuji F. 2006. Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. *Biol Reprod* 75:734-740.
- Papkoff H. 1981. Variations in the properties of equine chorionic gonadotrophin. *Theriogenology* 15: 1-11.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 44:915-923.
- Ramakrishna O, Ramachandraiah S. 1989. Repeated superovulation in crossbred cows. *Indian J Anim Sci* 59: 94-96.
- Reano I, Carballo D, Tribulo A, Tribulo P, Balla E, Bó GA. 2009. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. *Memorias VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC 2009, Córdoba Argentina.* (Abstract).
- Roberts AJ, Skinner MK. 1990. Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell-granulosa cell interactions. *Endocrin* 127:2918-2929.
- Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci*, 64:21-31.
- Saumande J, Procureur R, Chupin D. 1984. Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology* 21: 727-731.
- Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MB, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fert* 101: 547-555.
- Stewart F, Allen WR. 1981. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *J Reprod Fert* 62: 527-536.
- Wrathall JHM, Knight PG. 1993. Production of immunoreactive inhibin by bovine granulosa cells in serum-free culture: effects of exogenous steroids and FSH. *Dom Anim Endocr* 10: 289-304.
- Webb R, Gong JG, Law AS, Rusbridge SM, 1992. Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fert* 45(Suppl.): 141-156.
- Wock JM, Lyle LM, Hockett ME. 2008. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 $\beta$  at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod Fertil Dev* 20:228 (abstract).