

SINCRONIZACION DE LA EMERGENCIA DE LA ONDA FOLICULAR Y LA OVULACIÓN EN ANIMALES TRATADOS CON PROGESTAGENOS Y DIFERENTES ESTERES DE ESTRADIOL

Gabriel A. Bó¹, M.G. Colazo², M.F. Martínez², J.P. Kastelic² y R.J. Mapletoft²

RESUMEN

Sabemos que la dinámica de las ondas foliculares puede afectar la sincronía del celo después de un tratamiento con prostaglandina y la respuesta superovulatoria después de un tratamiento de gonadotropina. Pueden utilizarse progestágenos para controlar la fase luteal del ciclo estral pero la sincronía del celo y la ovulación después de la remoción depende del control del desarrollo folicular. Se ha demostrado que los estrógenos administrados en la fase de elevados niveles de progesterona inducen la regresión folicular y la emergencia de una onda folicular sincrónica, mientras que la administración en la fase de bajos niveles de progesterona induce liberación de LH y la ovulación. De los estrógenos probados, el Estradiol (E)-17 β fue el de acción más corta. Hubo emergencia de la onda folicular aproximadamente 4 d después de la administración de 5 mg de E-17 β en animales tratados con dispositivos con progestágenos. El benzoato de estradiol (EB) es un éster de acción algo más prolongada. Luego de la administración de 5 mg de EB, la emergencia de la onda folicular ocurrió aproximadamente a los 5 d con cierta variabilidad. Sin embargo, la administración de 2,5 mg de EB resultó en la emergencia de la onda folicular en 4 d con poca variabilidad. El estradiol-17 β y el benzoato de estradiol han sido utilizados indistintamente en programas de IA a tiempo fijo (IATF). El valerato de estradiol (EV) es de acción más prolongada. La administración de una dosis de 5 mg de EV resultó en la emergencia de una onda folicular en aproximadamente 5,5 d con una variabilidad considerable. Sin embargo dosis de 2 mg han resultado en una relativa menor variabilidad como para ser utilizado en sincronización de celos. El cipionato de estradiol (ECP) es de acción muy prolongada. A pesar de que, en promedio, la emergencia de la onda folicular ocurrió 4 d después de la administración de 1 mg de ECP, tuvo una variabilidad de 2 a 7 d. Sin embargo tiene una gran utilidad como inductor de la ovulación. Se revisarán varios estudios que utilizaron estos estrógenos en varios programas de superestimulación e IA a tiempo fijo, en un intento por simplificar la programación de vacas donantes y receptoras en un programa de transferencia de embriones.

INTRODUCCION

Durante los últimos años, el uso de nuevas tecnologías, especialmente las relacionadas con reproducción animal, han adquirido gran importancia para mejorar la producción agrícola en el mundo. Entre las nuevas tecnologías, aquellas relacionadas con la transferencia de embriones han sido utilizadas durante casi treinta años para reproducir y mejorar buena genética. En la actualidad, la transferencia de embriones es muy utilizada en todo el mundo y se transfieren más de 500.000 embriones por año (Thibier, 2003). Sin embargo, la variabilidad en la respuesta a los tratamientos hormonales, el tiempo y los esfuerzos necesarios para realizar tratamientos y detección

¹Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), J.L. de Cabrera 106 (X5000 GVD) Córdoba, Argentina

²Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada

de celo limitan tanto la aplicación generalizada como el éxito de esta tecnología. Los protocolos diseñados para controlar la función luteal y folicular permiten iniciar tratamientos de superestimulación en un momento arbitrariamente determinado y brindan muy buenas posibilidades para la sincronización de celo sin la necesidad de detectarlo en las receptoras. En esta presentación revisaremos el uso de estradiol- (E) 17β y ésteres de estrógeno específicos y discutiremos cómo éstos pueden afectar a la efectividad y a la aplicación de programas de transferencia de embriones e IATF.

A pesar de que hace décadas que se conocen los efectos de sincronización de los tratamientos que combinan progestágenos y estradiol, recién con los últimos descubrimientos de los efectos del estradiol sobre el desarrollo folicular se logró comprender completamente el motivo de dichos efectos. En una serie de experimentos, se encontró que el estradiol suprime el desarrollo del folículo antral (Bo et al., 1994, 1995a) y que dicha supresión es mayor cuando la aplicación se da después de la inserción de un implante de norgestomet en la oreja (Bo et al., 1995b). El mecanismo responsable de la supresión del crecimiento folicular inducida por estrógeno ser más sistémica que local (Bo et al., 2000) e incluyó la supresión de la FSH (Bo et al., 1994). Una vez que el estradiol fue metabolizado, hubo un pico de FSH en la circulación y emergió una nueva onda folicular. A la administración de 5 mg de E- 17β en animales implantados siguió la emergencia de una nueva onda folicular en un promedio de $4,3 \pm 0,2$ d más tarde (Bo et al., 1995a) sin importar la fase del desarrollo folicular al momento del tratamiento. Otros estudios evaluaron el efecto de diferentes ésteres de estradiol sobre el desarrollo de la onda folicular. El benzoato de estradiol (EB; Caccia y Bo, 1998) y el valerato de estradiol (EV; Mapletoft et al., 1999) en una dosis de 5 mg y el cipionato de estradiol (ECP) en una dosis de 1 mg (Thundathil et al., 1997) dieron como resultado un tiempo menos predecible de emergencia de onda. Sin embargo, la administración de 2 mg de EB combinado con 50 mg de progesterona tuvo como resultado la emergencia de una onda folicular en $4,1 \pm 0,1$ d con una variabilidad de 3,5 a 5 d (Moreno et al., 2001) y las dosis de 2 mg de EV ha resultado en un comienzo de la onda 2 a 5 días después (Colazo et al., 2004). Una dosis de 0,5 mg de ECP tuvo como resultado un intervalo más prolongado a la emergencia de la onda folicular (Thundathil et al., 1997)

EL ESTRADIOL Y SUS ÉSTERES

Los estrógenos naturales son esteroides con 18 átomos de carbono y un anillo fenólico A (anillo aromático con un grupo hidrófilo carbono 3) y un grupo hidrófilo β cetónico en el carbono 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la estructura responsable de la alta afinidad ligada a receptores de estrógeno. El estradiol- 17β es el más potente de los principales estrógenos que se encuentran tanto en humanos como en animales. Es el principal producto secretado por el ovario y se oxida fácilmente y se transforma en estrona en el hígado y está ligado en más del 50% a proteínas plasmáticas. Los estrógenos están distribuidos en todo el cuerpo y se acumulan en el tejido adiposo. La eliminación de estrógenos esteroides se da principalmente a través del metabolismo hepático. El estradiol- 17β estrona o estriol son eliminados como conjugados de glucurónido o sulfato. Los estrógenos y sus metabolitos son eliminados principalmente a través de la orina pero además son eliminados a través de la bilis donde la mayoría son reabsorbidos desde el tracto intestinal. Debido su baja solubilidad en agua, los ésteres de estradiol se absorben en un intervalo prolongado.

Los estrógenos en soluciones oleosas son absorbidos rápidamente, aunque la absorción puede continuar durante varios días después de su administración

intramuscular. Los estrógenos esterificados poseen absorción retardada después de su administración intramuscular. Dichos ésteres son absorbidos desde el lugar de inyección y el E-17 β activo es liberado después de la hidrólisis. El estradiol-17 β es la hormona activa que resulta del clivaje de los ésteres de estradiol. Un éster es una cadena compuesta principalmente por átomos de carbono están típicamente adheridos a la hormona esteroide matriz en la posición del carbono 17. La esterificación del grupo hidróxilo de 17 β de estradiol-17 β lleva a la protección de este grupo contra el ataque metabólico y prolongan el efecto. Por lo tanto, el cipionato de estradiol (C₂₆H₃₆O₃; PM 396,6) producido por la esterificación del estradiol con ácido ciclopentanopropionico, tiene una actividad biológica mucho más sostenida que el estradiol-17 β (C₁₈H₂₄O₂; PM 272,4). Por otra parte, el benzoato de estradiol (C₂₅H₂₈O₃; MW 376,5) se produce por la esterificación del carbono de la posición 3 y tiene un periodo de acción más corto. El valerato de estradiol (C₂₃H₃₂O₃; MW – 356,5) es de acción inmediata. Cuánto más larga es la cadena del éster, más baja es la solubilidad en agua y más demorará en absorberse la dosis completa. Una vez en la circulación, el éster es clivado por una enzima estearasa (lo hidroliza) y la actividad biológica vuelve a ser la del E-17 β normal. Por lo tanto la duración de la acción depende de la absorción y no del metabolismo.

LOS EFECTOS DEL ESTRADIOL Y SUS ÉSTERES

El efecto del estradiol y/o la progesterona al momento de la inserción de un dispositivo con progesterona en vacas ovariectomizadas.

Las concentraciones de estradiol y FSH en plasma luego de la administración de 5 mg de E-17 β , benzoato de estradiol o valerato de estradiol en vacas ovariectomizadas se muestran en la Figura 1. Las concentraciones de estradiol en plasma mostraron consistentemente un pico 6 h después del tratamiento con E-17 β y disminuyeron gradualmente a niveles basales a las 36 h (Martinez, 2002). También se ha informado que las concentraciones de estradiol aumentaron drásticamente a las 2 (Bo et al., 2000) y 6 h (Bo et al., 1994) después del tratamiento con E-17 β . Las concentraciones de estradiol en plasma aumentaron más rápidamente y alcanzaron un pico más elevado tras el tratamiento con E-17 β que con tratamientos con EB o EV. Además, el estradiol en plasma no regresó a niveles basales hasta las 96 h en vacas ovariectomizadas tratadas con EB y con EV (Martinez, 2002), tal como describimos anteriormente (Bo et al. con EV en vaquillonas intactas. (1990) describieron un descenso bifásico de las concentraciones de estradiol después del pico en animales tratados con EB. Una fase de eliminación de aproximadamente 48 h siguió a una fase inicial de distribución de aproximadamente 48 h. Vynckier et al. (1990) también mostraron que las concentraciones de estradiol en plasma durante el estro inducido con PGF llegó a 14 ± 2 pg/mL (rango, 11 a 28 pg/mL), similar a lo que sucedió después de una inyección de 1 mg de EB. Por otra parte, las concentraciones de estradiol en plasma durante la preñez avanzada duplican o triplican las alcanzadas después de una inyección de 5 mg de EB o EV.

Los picos en las concentraciones de estradiol después de la inyección de 5 mg de E-17 β , EB o EV dependieron del estrógeno utilizado. Por lo tanto, cada forma de estradiol tendrá diferentes efectos sobre las concentraciones de gonadotropina y los folículos ováricos. Las concentraciones de estradiol en plasma después de las inyecciones de EB o EV no aumentaron tan rápidamente como con E-17 β sino que alcanzaron un pico y disminuyeron más lentamente (Martinez, 2002). Vynckier et al., (1990) informaron que luego de una inyección de 10 mg, los niveles de los picos fueron menores y más prolongados con ECP que con EB.

El aumento en las concentraciones de estradiol circulante provocó una disminución en las concentraciones de FSH en plasma. El tratamiento con 5 mg de E-17 β en vacas ovariectomizadas resultó en una disminución de las concentraciones de FSH en plasma en 6 a 48 h (Martinez, 2002). En animales intactos, la supresión de concentraciones de FSH en plasma por este intervalo resultaría en la supresión de los folículos antrales. En experimentos anteriores, la inyección de 5 mg de E-17 β en animales intactos resultó en la supresión de FSH durante aproximadamente 36 a 48 h, seguida por un aumento durante las 36 a 48 h siguientes y la emergencia sincrónica de una onda folicular 1 d más tarde sin importar el estadio de la onda folicular al momento del tratamiento (Bo et al. En vacas ovariectomizadas, las concentraciones de FSH en plasma aumentaron antes y alcanzaron mayores concentraciones en el grupo con E-17 β que en los con EB o EV (Martinez, 2002). Mientras la FSH regresó a las concentraciones previas al tratamiento a las 60 h después del tratamiento en el grupo con E-17 β , en los grupos con EB y con EV, la FSH en plasma comenzó a aumentar 12 a 24 h más tarde que en el grupo con E-17 β . Esto resultaría en la emergencia de una onda folicular 1 d más tarde (es decir, un intervalo de 3 a 4 d en animales tratados con E-17 β y de 4 a 5 d en animales tratados con EB o EV). El retraso en el incremento de las concentraciones de FSH en plasma puede servir para explicar tanto la demora como la variabilidad en la emergencia de la onda folicular que se observa en animales intactos tratados con dosis de 5 mg de EB (Bo et al., 1996) o EV (Bo et al., 1993; Mapletoft et al., 1999). Sin embargo, después de la administración de 1 mg de EB, las concentraciones de FSH en plasma tuvieron un patrón de disminución similar al posterior a los 5 mg de E17 β (Martinez, 2002) y la emergencia de onda folicular ocurrió en 4 d (Martinez et al., 2002). Los resultados indican que la secreción y la liberación de FSH dependen de la dosis de estradiol y que diferentes ésteres de estradiol suprimen la liberación de FSH por intervalos variables que dependen del tiempo que el estradiol permanece en altas concentraciones en la circulación.

La administración intramuscular de 5 mg de EB, 24 horas después de la inserción de un CIDR, resultó en la emergencia de una nueva onda folicular 5,4 días después del tratamiento mientras que cuando se administró la misma dosis mediante una cápsula intravaginal hubo una mayor variabilidad en la respuesta (Bó et al., 1996). Cuando la dosis de 2,5 mg de EB fue usada por vía intramuscular en vacas Hereford, el intervalo desde el tratamiento a la emergencia de la nueva onda folicular fue más corto y menos variable que cuando se usó una dosis mayor (5 mg; Bó y Caccia 1998). El intervalo desde tratamiento a la emergencia de la nueva onda folicular fue de 4 días (mediana) en vacas a las que se les insertó CIDR al momento de tratarlas con EB. Lo mismo sucedió en vaquillas cruza de Hereford, Simmental y Charolais cuando 1 mg de EB fue usado (Martinez et al., 2005). La comparación directa entre dosis de 1 y 5 mg de E-17 β con EB favoreció el uso de 5 mg de E-17 β o de 1 mg de EB, en especial en vaquillas en las cuales la nueva onda folicular comenzó $3,4 \pm 0,5$ y $3,7 \pm 0,6$ días para 5 mg de E-17 β o de 1 mg de EB, respectivamente (Martinez et al., 2005). Moreno et al. (2001) demostraron que el uso de 2 mg de EB combinados con 50 mg de progesterona en vacas para carne indujo una sincronización de la onda folicular menos variable que sin la progesterona adicional. El cipionato de estradiol (ECP) en dosis de 5 y 1 mg, respectivamente, han resultado en intervalos a la emergencia de la onda folicular más largos y variables que E-17 β . En el caso de ECP, varios experimentos fueron realizados en los años 1990. Mediante ensayos en vacas de cría, una dosificación de 0,5 mg ECP pareció ser marginalmente eficaz ya que no existieron diferencias con los controles sin tratamiento (Thundathil et al., 1999). En experimentos más recientes comparando la eficacia de ECP con E-17 β , la emergencia de la onda folicular fue más variable ($P < 0.01$) en las vaquillas que recibieron ECP ($n=30$) que en aquellas que

recibieron E-17 β (n=28; 4,0 \pm 0,4 días vs. 3,3 \pm 0,1 días). Por lo que se confirmó la ineficiencia del ECP en la sincronización de ondas foliculares. Sin embargo, ECP puede ser usado para la sincronización de la ovulación, tal como se verá más adelante.

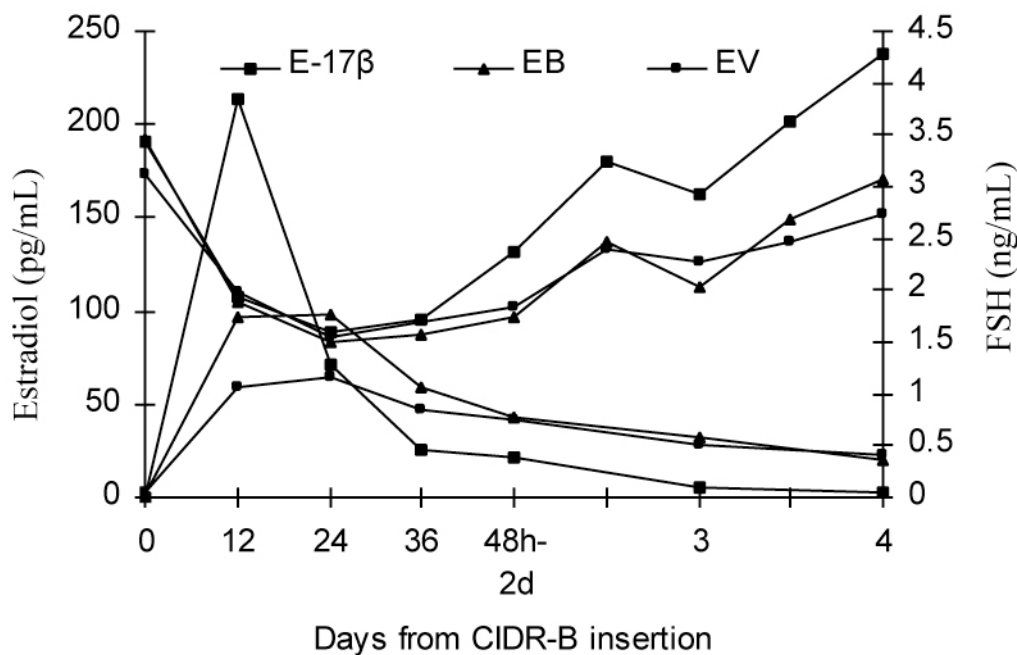


Figura 1. Las concentraciones plasmáticas de estradiol y FSH en vacas de carne ovariectomizadas a las que se les colocó un dispositivo CIDR el Día 0 y 5 mg de E-17 β , EB o EV más 100 mg de progesterona en ese momento.

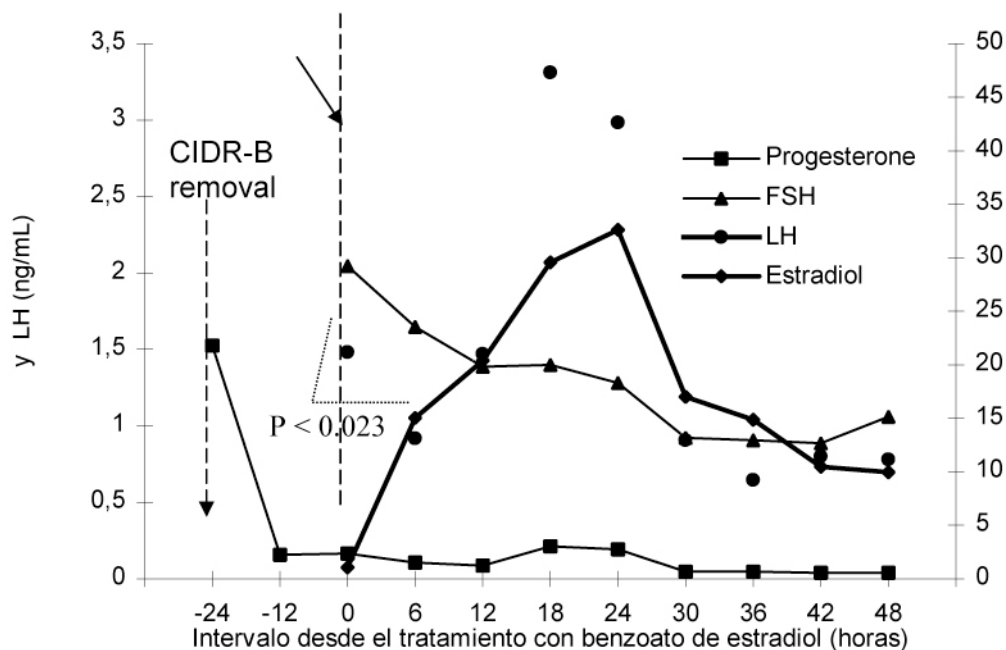


Figura 2. Las concentraciones de progesterona, estradiol, FSH y LH en plasma después del tratamiento con 1 mg de EB 24 h después de la remoción del CIDR en vacas de carne ovariectomizadas (n = 16).

EL USO DE ESTRADIOL EN PROGRAMAS DE SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACION

Se diseñó una serie de experimentos para investigar los efectos de un estrógeno de acción corta, el E-17 β , sobre la dinámica de las ondas foliculares. En vaquillonas implantadas con SMB, el folículo dominante detuvo su crecimiento 1 d después del tratamiento con 5 mg de E-17 β , lo cual resultó en la emergencia temprana de la siguiente onda folicular, en promedio, 4,3 d más tarde (Bo et al., 1994; 1995). Además, al inyectar E-17 β en presencia de un progestágeno, hubo una supresión de FSH y un pico de FSH precedió a la nueva onda folicular 4 a 5 d más tarde. En vaquillonas no implantadas con SMB, la respuesta fue menos predecible.

Todavía está en discusión la necesidad de aplicar 50 ó 100 mg de progesterona junto con el EB al momento de la inserción de un dispositivo con progesterona. A pesar de que la aplicación de 2 mg de EB y 50 mg de progesterona al momento de la inserción del dispositivo resultó en una emergencia de onda folicular más sincronizada que el tratamiento con sólo 2 mg de EB (Moreno et al., 2001), la administración de una inyección de 50 mg de progesterona además de estradiol y el dispositivo con progesterona en un protocolo de IA a tiempo fijo no resultó en un aumento en las tasas de preñez (Bo et al., 2000a; Whittaker et al., 2002). Sin embargo, el segundo tratamiento con EB (1 mg) administrado 24 h después de la remoción del dispositivo fue crítico ya que resultó en una ovulación más sincrónica (Cutaia et al., 2001) y en mayores tasas de preñez (Colazo et al., 1999; revisado por Mapletoft et al., 2003) que cuando no se utilizó EB después de la remoción del dispositivo.

Se han utilizado cada vez más tratamientos con estradiol y progestágenos/progesterona durante los últimos años en programas de sincronización de celo en ganado de carne y leche (Revisado por Bo et al., 2002). Los tratamientos consisten en la inserción de un dispositivo de progestágeno/progesterona y en la administración de estradiol el Día 0 (para sincronizar la emergencia de la onda folicular), PGF al momento de la remoción del dispositivo los Días 7, 8 o 9 (para asegurar la luteólisis) y la subsiguiente aplicación de una dosis menor de estradiol 24 h más tarde o GnRH/LH 48 a 54 h más tarde para sincronizar la ovulación (revisado por Bo et al., 2002). Las tasas de preñez en una sola IATF fueron similares a las esperadas luego de la detección espontánea de celo (Revisado en Bo et al., Mapletoft et al., 2003)

USO DEL CIPIONATO DE ESTRADIOL

Se realizaron experimentos para investigar la utilización de ECP para sincronizar d la emergencia de la onda folicular y la ovulación en vaquillonas de carne tratadas con un dispositivo CIDR (Colazo et al., 2002). En el primer experimento se investigó la eficacia de ECP para la inducción de la ovulación del folículo dominante de una onda folicular sincronizada. El Día 0 se administró un CIDR y 5 mg de E-17 β a vaquillonas puberales. El Día 7 se quitaron los CIDR y se administró PGF. Se dividió a las vaquillonas en tres grupos: uno no sería tratado (control), otro recibiría 0,5 mg de ECP al momento de la remoción del CIDR (ECP0) y otro 24 h más tarde (ECP24). Se realizó ecografía dos veces al día desde el Día 7 hasta la ovulación. Las vaquillonas que recibieron ECP tuvieron un intervalo más corto desde la remoción del CIDR hasta la ovulación que las vaquillonas del grupo control (81,6 \pm 5,0 h, 86,4 \pm 3,5 h y 98,4 \pm 5,6 h en ECP0, ECP24 y el grupo Control, respectivamente), pero las varianzas no fueron diferentes entre los grupos. Diecinueve de veinte vaquillonas en los grupos con ECP ovularon entre 72 y 96 h después de la remoción del CIDR. Además se ha informado que puede utilizarse

ECP para sincronizar la ovulación en programas con GnRH para programas de IA a tiempo fijo (revisado en Thatcher et al., 2001).

Se diseñó otro experimento para determinar los efectos de ECP sobre la emergencia de la onda folicular y la tasa de preñez con IA a tiempo fijo. El Día 0, se insertó un CIDR a las vaquillonas (n = 58), 5 mg de E-17 β y 100 mg de progesterona o 1 mg de ECP más 100 mg de progesterona. Los Días 7 (E-17 β) o 9 (ECP), se quitaron los CIDR y se administró PGF a las vaquillonas. Luego se asignaron las vaquillonas a tres grupos para administrarles 0,5 mg de ECP al momento de la remoción del CIDR o 24 h más tarde o 1 mg de EB 24 h después de la remoción del CIDR. Se inseminó a todas las vaquillonas alrededor de 58 h luego de la remoción del CIDR. Se realizó ecografía diaria desde el Día 0 hasta la ovulación para monitorear los cambios ováricos y 28 d después de la IA para detectar preñez. Aunque no difirió el día medio de la emergencia de la onda folicular, fue más variable en vaquillonas que recibieron ECP que en aquellas que recibieron E-17 β . El tamaño de folículo dominante al momento de la remoción del CIDR fue mayor en vaquillonas tratadas con ECP (11,3 \pm 2,1 mm) que en vaquillonas tratadas con E-17 β (9,8 \pm 1,5 mm). Sin embargo, no hubo diferencia en las tasas de preñez entre los grupos (media general: 71%).

Se diseñó un tercer experimento para comparar ECP, además de una fuente comercial de progesterona con GnRH en un programa de IATF. El Día 0, se administró a las vaquillonas (n = 979) un CIDR y 100 μ g de GnRH (n = 491) o 1 mg de ECP además de 50 mg de progesterona (Progesterona 5%, Vétoquinol N-A Inc., Lavaltrie, QC, Canadá; n = 488). Se quitaron los CIDR y se administró PGF los Días 7 y 8,5 en los grupos con GnRH y con ECP respectivamente. Luego se subdividió a las vaquillonas para administrarles 0,5 mg de ECP al momento de quitar el CIDR, o 24 h más tarde (con IA 58 a 60 h después de quitar el CIDR), o una segunda inyección de GnRH al momento de la IA (52 a 54 h después de quitar el CIDR). No hubo diferencia en las tasas de preñez entre grupos tratados con GnRH (276/491, 56%) o con ECP (277/488, 57%) el Día 0. Sin embargo, la tasa de preñez fue mayor (P<0,01) en vaquillonas que recibieron ECP 24 h después de quitar el CIDR (216/331, 65%) que al momento de quitar el CIDR (168/320, 52%) o GnRH al momento de la IA (169/328, 51%).

A pesar que el ECP no es efectivo para sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular, puede ser utilizado para reducir el número de veces que las hembras tienen que pasar por la manga. Giacusa et al. (2005) usaron este tipo de estradiol para la sincronización de la ovulación al momento de retirar el dispositivo con progesterona ó 24 h más tarde en vacas con cría en condiciones pastoriles de Argentina. Este protocolo resultó en tasas de preñez de por encima del 50%. El ECP administrado al tiempo del retiro del dispositivo con progesterona resultó en una tasa de preñez del 52% y las vaquillas que recibieron ECP 24 h después de quitar el CIDR tuvieron una tasa de preñez del 65% (Colazo et al., 2003). Por lo tanto, se demostró que el ECP es muy eficaz en inducir la ovulación del folículo dominante de una onda previamente sincronizada con E-17 β . A pesar de que el tratamiento con ECP resulta en muy bajos niveles de estradiol circulante comparado con otros estradiolos, incrementaría la concentración de estradiol por adición a aquella producida por el folículo preovulatorio en forma suficiente como para estimular la liberación de LH. Cuando se comparó ECP con EB administrados 24 h después del retiro del dispositivo con progesterona para sincronizar celos y ovulaciones, el porcentaje de preñez a la IATF no se vio afectado (en promedio, 69%; P>0.2; Colazo et al., 2004). El uso de este estradiol en la inducción del estro y la ovulación mostró ser eficaz y, por lo tanto, fue investigado más en detalle. Cutaia et al. (2005) no encontraron diferencias cuando el EB o ECP fueron dados 0 o 24 h después de la remoción del DIB (Tabla 1). Similares resultados se han encontrado recientemente en animales Nelore en Brasil (Baruselli et al., 2005).

Tabla 1. Efecto de la aplicación de EB o ECP al momento de retirado un dispositivo con progesterona ó 24 h más tarde sobre los porcentajes de preñez en vacas y vaquillonas afectadas a protocolos de sincronización para IATF.

Referencia	EB 0 h	EB 24 h	ECP 0 h	ECP 24 h	P
Colazo et al., 2002 (vaq. <i>Bos taurus</i>)		65/103 (63,1%)	62/98 (63,3%)	64/99 (64,6%)	>0,7
Colazo et al., 2003 (vaq. <i>Bos taurus</i>)			168/320 ^a (52,5%)	216/331 ^b (65,3%)	<0.01
Cutaia et al., 2005 (vaq. crúza cebú)	42/98 ^a (42,8%)	45/98 ^a (45,9%)	46/95 ^a (48,2%)	62/98 ^b (63,2%)	<0,05
Giacusa et al., 2005 (vacas con cría sin eCG)			26/51 (50,9%)	25/52 (49,1%)	>0,1
Giacusa et al., 2005 (vacas con cría con eCG)			27/54 (50,0%)	27/50 (54,0%)	>0,1

Los autores citados en la tabla son provenientes de la revisión de Bó et al., 2005.

P : valor de la probabilidad

NUEVOS TRATAMIENTOS CON DOSIS REDUCIDAS DE VALERATO DE ESTRADIOL

Una pequeña dosis de EV puede tener un efecto similar al de una pequeña dosis de EB en la liberación de gonadotropinas y en la emergencia de la onda folicular. Más recientemente, se llevaron a cabo dos experimentos con el objetivo de reducir la dosis del EV (en forma similar a los experimentos de dosis de EB). Los objetivos más específicos fueron la evaluación de los efectos de EV en la dinámica folicular y luteal, los intervalos al celo y la ovulación. El primer experimento comparó la eficacia de dos tipos de implantes de norgestomet (Crestar y el Syncro-Mate B; SMB) por 9 días (con prostaglandina al momento de remover el implante), combinado con 5 mg de estradiol-17 β y 100 mg de progesterona (EP) o con 5 mg de EV y 3 mg de norgestomet (EN) im en el momento de colocar el implante. No hubo el efecto del tipo de implante. El diámetro del CL fue afectado negativamente por el EV. La emergencia de la onda folicular ocurrió más temprano y fue menos variable en vaquillas del grupo EP ($3,6 \pm 0,1$ d) que en el grupo EN ($5,7 \pm 0,2$ d). Los intervalos desde la remoción del implante al celo y a la ovulación fueron más cortos en vaquillas del grupo EN ($45,7 \pm 11,7$ y $74,3 \pm 12,6$ h) que en las vaquillas del grupo EP ($56,4 \pm 14,1$ y $83,3 \pm 17,0$ h). En el segundo experimento, se comparó el efecto de 0, 1, 2, 5 mg de EV im en vacas de cría tratadas al mismo tiempo con un CIDR (n=43). La emergencia de la onda folicular ocurrió dentro de 7 días en 7/10 (70%) vacas Control y 31/32 (97%; P<0.04) vacas tratadas con EV. El intervalo desde el tratamiento a la emergencia de la próxima onda folicular fue más largo (P<0.03) en aquellas vacas tratadas con 5 mg de EV ($4,8 \pm 1,2$ d) que en aquellas tratadas con 1 mg ($3,2 \pm 0,9$ d) ó 2 mg ($3,4 \pm 0,8$ d) de EV, mientras que en vacas Control fue $3,8 \pm 2,0$ días. Estos resultados sugieren que ésteres de estradiol, tales como EV y EB pueden ser usados para la sincronización de la emergencia de onda folicular en el ganado bovino.

Recientemente se diseñaron dos experimentos para comparar las tasas de preñez en

receptoras de embriones que fueron tratadas con valerato de estradiol administrado en diferentes dosis al comienzo de un tratamiento con progestágenos. Se utilizaron 300 vacas que recibieron un implante detrás de la oreja (Crestar, Intervet, Brasil; Día 0) y fueron asignadas al azar en 4 grupos de tratamiento, para recibir en el mismo momento 2 mg de EB más 50 mg de progesterona (Grupo EB/8D), 5 mg de valerato de estradiol (EV) más 3 mg de norgestomet (Crestar porción inyectable, Intervet, Brasil; Grupo 5 mg EV/9D) o 2 mg de EV y 1,2 mg de norgestomet (Grupos 2 mg EV/8D y 2 mg EV/9D). En el Día 5 las receptoras del grupo 2 mg EB/8D y 2 mg EV/8D recibieron 400 UI de eCG (Folligon 5000, Intervet, Brasil) más 150 µg de D (+) cloprostenol im (PGF; Preloban, Intervet, Brasil). En el Día 6, todas las vacas del grupo 5 mg EV/9D y 2 mg EV/9D recibieron también 400 UI de eCG más PGF. Los implantes fueron retirados en el Día 8 (Grupos 2 mg EB/8D, 2 mg EV/8D) o en el Día 9 (Grupos 2 mg EV/9D y 5 mg EV/9D) y todas las vacas recibieron 24 h después de la remoción 1 mg de EB. A los 7 días de la inyección de 1 mg de EB las receptoras fueron examinadas por ultrasonografía y aquellas con un CL >256 mm² de área recibieron al día siguiente, un embrión congelado/descongelado en eltilen glicol 1.5 M por transferencia de directa en el cuerno ipsilateral al CL. Los resultados se encuentran en la Figura 3. Las tasas de aprovechamiento fueron numéricamente menores en el grupo de receptoras tratadas con 5 mg de EV. A su vez las vacas tratadas con 2 mg EV pero en el cual se removió el dispositivo en el Día 9 tuvo una menor ($P < 0,05$) tasa de preñez que los grupos tratados con 2 mg de EB o EV pero en los cuales los Crestar fueron removidos en el Día 8. A su vez, no hubo diferencias entre el uso de 2 mg de EB o 2 mg EV en los protocolos de 8 días.

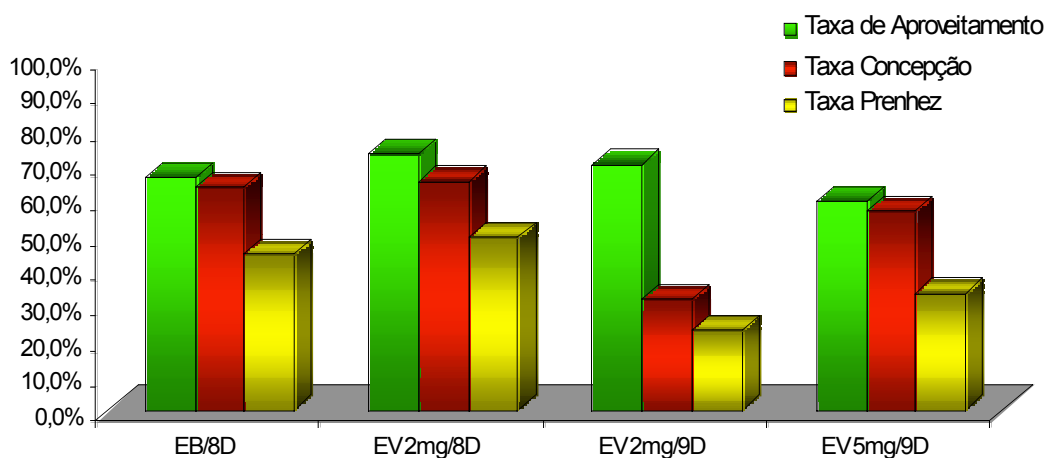


Figura 3. Tasas de aprovechamiento, concepción y preñez en receptoras de embriones tratadas con Crestar y diferentes dosis de Valerato de Estradiol (EV) o Benzoato de Estradiol (EB). Las tasas de preñez fueron menores ($P < 0,05$) en el grupo EV 2mg/9D que en los grupos EB/8D y EV 2 mg/8D. Las tasas de preñez en el grupo EV 5 mg/9D fueron intermedias y no son diferentes a los otros grupos.

Para confirmar estos resultados se realizó un segundo experimento utilizando 200 vacas del mismo campo y con las mismas características de las anteriores y que fueron tratadas con los dos grupos que dieron resultados superiores (2 mg EB/8D y 2 mg EV/8D; Peres et al. 2006, datos no publicados). Como se puede ver en la Figura 4, no hubo diferencias significativas entre los grupos demostrando que la dosis reducida de

EV se comporta de forma equivalente a la dosis de 2 mg de EB en programas de sincronización de receptoras a tiempo fijo.

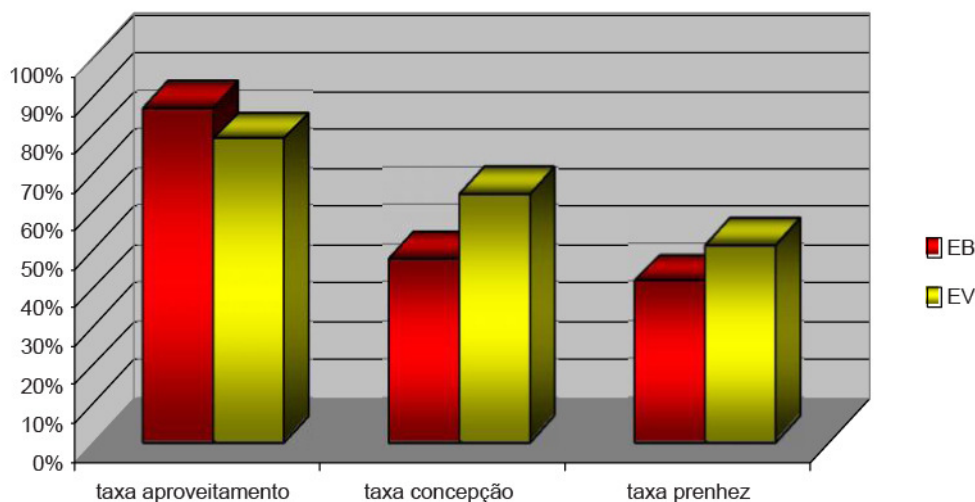


Figura 4. Tasas de aprovechamiento, concepción y preñez en receptoras de embriones tratadas con Crestar y 2 mg de Valerato de Estradiol (EV) o Benzoato de Estradiol (EB). Las tasas de preñez no son diferentes entre a los grupos ($P>0,6$).

CONTROL DEL DESARROLLO DE ONDA FOLICULAR PARA SUPERESTIMULACIÓN

El protocolo convencional de iniciación de superestimulación ovárica durante la mitad del ciclo, se basó en un principio en información experimental y anecdótica en la que se informaba una mayor respuesta superovulatoria al comenzar los tratamientos de superestimulación 8 a 12 d después del estro (revisado por Bo et al., 1995b). Sin embargo, ninguno de estos primeros estudios evaluó el estado folicular específico de los animales al comenzar con los tratamientos de superestimulación. A través de información obtenida por ecografía se conoce que de 8 a 12 d después del celo (equivalente a los Días 7 a 11 después de la ovulación) sería el momento aproximado de emergencia de la segunda onda folicular en ciclos de dos o tres ondas (Ginther et al., 1989) y alrededor de ese momento se encontraría una cohorte de folículos en crecimiento. Sin embargo, se ha observado que el día de emergencia de la segunda onda folicular es diferente entre ciclos de dos y tres ondas (1 o 2 d antes en ciclos de tres ondas) como así también entre animales individuales (Ginther et al., 1989). En este aspecto hemos mostrado claramente que las respuestas superovulatorias son mayores cuando se inician los tratamientos superestimuladores al momento de la emergencia de la onda folicular y no más tarde (Adams et al., 1994; Nasser et al., 1993). El comienzo de tratamientos con gonadotropina a sólo 1 d de la emergencia de onda resultó en respuestas superovulatorias menores si se compara con el comienzo de los tratamientos el día de emergencia de la onda folicular. Según la duración de las fases de desarrollo del folículo dominante en intervalos interovulatorios de dos y tres ondas, la probabilidad en cualquier momento de que el folículo dominante no sea funcionalmente dominante (fase estática tardía o regresiva) es de aproximadamente el 30% (6 de 20 d) para vaquillonas de dos ondas y el 35% (8 de 23 d) para vaquillonas de tres ondas. Más importante aún, sólo durante alrededor del 20% (4 ó 5 d) del ciclo

estral es posible comenzar el tratamiento al momento de la emergencia folicular. Por lo tanto, el 80% del ciclo estral no es conductivo para una respuesta superovulatoria óptima. La necesidad de esperar hasta el ciclo medio para comenzar un tratamiento superestimulador implica la detección de celo y una demora obligatoria. Un enfoque alternativo para evitar estos problemas es comenzar los tratamientos de superestimulación después del control de la emergencia de la onda folicular.

Los métodos para el reclutamiento activo de folículos para superestimulación han sido orientados hacia el control de la dinámica de la onda folicular para contar con un grupo mayor y con respuesta más uniforme al momento de comenzar tratamientos con gonadotropina. Se ha demostrado que es posible imitar los efectos del folículo dominante y suprimir el desarrollo de todos los folículos antrales. Se espera que las gonadotropinas administradas en determinados momentos después de terminar con los tratamientos de supresión folicular estimulen el desarrollo de una cohorte de folículos al retomar su crecimiento.

Existen varias alternativas para controlar el desarrollo folicular en ganado bovino. Se ha alterado en forma experimental la emergencia de onda folicular por medio de la ablación folicular mecánica o por medio de tratamientos hormonales. La aspiración folicular por medio de ecografía (utilizada para la obtención de ovocitos en programas de IVF) ha sido utilizada como método de ablación folicular (Baracaldo et al., 2000; Bergfelt et al., 1994a; 1994b) y los tratamientos con estradiol y progesterona (para suprimir hormonalmente el desarrollo folicular) han sido ampliamente investigados en nuestro laboratorio (Bergfelt et al., 1997; Bo et al., 1995b; 1996). Dedicaremos el resto de este trabajo a mostrar cómo puede utilizarse estos enfoques para controlar el desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación.

Nuestro tratamiento preferido para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para superestimulación incluye el tratamiento con 5 mg de E-17 β y 100 mg de progesterona al momento de la inserción de un progestágeno, seguido de FSH 4 d más tarde (Bo et al., 1996). La información obtenida de experimentos (revisado por Bo et al., 1995b) y programas comerciales de superovulación (revisado por Bo et al., 2002) ha demostrado que la respuesta superovulatoria de las donantes tratadas con E-17 β y progesterona en estadios desconocidos del ciclo estral es comparable a la de las donantes superestimuladas 8 a 12 d después del celo detectado.

El estradiol-17 β no está comercialmente disponible en muchos países. Por lo tanto, investigamos la posibilidad de utilizar otros ésteres de estrógeno disponibles en el mercado como EB o EV. El tratamiento con 2,5 mg de EB y 50 mg de progesterona administrados al momento de la inserción del CIDR-B, resultó en la emergencia sincronizada de una nueva onda folicular 3 a 4 d más tarde (Caccia et al., 1998). Los tratamientos superestimuladores iniciados 4 d después del tratamiento con 2,5 mg de EB y 50 mg de progesterona resultaron en respuestas superovulatorias comparables con aquellos iniciados 4 d después del tratamiento con 5 mg de E-17 β y 50 mg de progesterona o 2,5 mg de E-17 β y 50 mg de progesterona o aquellos iniciados 8 a 12 d después del estro (revisado por Bo et al., 2002). El tratamiento con 5 mg de EV y 3 mg de norgestomet resultó en la emergencia menos sincronizada de una onda folicular y una respuesta superovulatoria menor que la de 5 mg de E-17 β y 100 mg de progesterona en vacas con dos implantes de SMB (Mapletoft et al., 1999). Lamentablemente todavía no hemos probado dosis más bajas de EV en programas de superovulación. Todos estos estudios demostraron que el control exógeno de la emergencia de la onda folicular tiene la ventaja de iniciar tratamientos superestimuladores en un momento óptimo para el reclutamiento de folículos, sin importar el estadio del ciclo estral. El tratamiento es práctico, fácil de seguir para el personal del campo y lo que es más importante, se elimina la necesidad de detectar

celo u ovulación y esperar de 8 a 12 d para iniciar tratamientos de gonadotropina. Es importante resaltar que en estudios relacionados con superestimulación coincidente con emergencia de onda folicular, la respuesta a una única inyección de FSH no hubo diferencias con la respuesta a un programa de inyecciones múltiples (Bergfelt et al., 1997; Bo et al., 1996). El nadir entre los picos de FSH no permite la emergencia de una nueva onda folicular (Bergfelt et al., 1994b). La administración de FSH exógena durante el período de nadir en FSH puede impulsar el crecimiento de pequeños folículos antes del tiempo esperado de la emergencia de la nueva onda (es decir que la FSH exógena inhibió los efectos de la supresión del folículo dominante). Esto puede contribuir a explicar como grandes dosis de FSH exógeno en programas convencionales de superestimulación pueden superar el ritmo endógeno y tapar el efecto de la onda sobre la respuesta ovárica. Si se administra un tratamiento superestimulador durante un intervalo suficientemente largo se notará el reclutamiento folicular sin importar el estado de la onda folicular al momento del tratamiento con gonadotropina. Sin embargo, el reclutamiento asincrónico puede llevar a una mayor variabilidad en la respuesta folicular ovárica y a reducir la calidad de los embriones colectados (revisado por Bo et al, 2002).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La variabilidad en la respuesta sigue siendo uno de los principales problemas asociados con los programas de sincronización de celo y superovulación en ganado bovino. La incorporación de técnicas diseñadas para el control de la dinámica de la onda folicular como las que se discuten en el presente trabajo reducirá la variabilidad al tratar vacas en diferentes estadios del ciclo estral. Los programas de sincronización del celo que controlan tanto el aspecto luteal como el folicular del ciclo estral brindan posibilidades para la IA y la Transferencia de Embriones a tiempo fijo, eliminando la necesidad de detectar celo. A pesar de que la mayoría de los trabajos de sincronización del desarrollo folicular se han realizado con estradiol-17 β , benzoato de estradiol y valerato de estradiol, la información indica que el cipionato de estradiol puede utilizarse eficientemente par inducir la ovulación. Los protocolos con sincronización de la emergencia de onda folicular tienen la ventaja de poder iniciar rápidamente tratamientos superestimuladores en un momento arbitrariamente determinado sin la necesidad de detectar celo y sin sacrificar resultados.

REFERENCIAS

- ADAMS GP, NASSER LF, BO GA, MAPLETOFT RJ, GARCIA A, DEL CAMPO MR. Superstimulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 1103-1113.
- BARACALDO MI, MARTINEZ M, ADAMS GP, MAPLETOFT RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-1250.
- BARUSELLI PS, BÓ GA, REIS EL, MARQUES MO, SÁ FILHO MF. Introdução da IATF no manejo reproductivo de rebanhos bovinos de corte no Brasil. Proc VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, June 24-26 2005, Córdoba, Argentina, pp 151-176.
- BERGFELT DR, LIGHTFOOT KC, ADAMS GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994a; 42: 895-907.
- BERGFELT DR, PLATA-MADRID H, GINTHER OJ. Counteraction of inhibitory effect of follicular fluid by administration of FSH in heifers.

BERGFELT DR, BO GA, MAPLETOFT RJ, ADAMS GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 1-12.

BO GA, ADAMS GP, NASSER LF, PIERSON RA AND MAPLETOFT RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 225-239.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, TRIBULO HE, CACCIA M, MAPLETOFT RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 1994; 41: 1555-1569.

BO GA, ADAMS GP, CACCIA M, MARTINEZ M, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 1995a; 39: 193-204.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995b; 43: 31-40.

BO GA, CACCIA M, MARTINEZ M, MAPLETOFT RJ. Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. 13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia, 1996; 7: 22 abstr.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Effect of progestogen plus E-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 1996; 45: 897-910.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen ear implants. *Anim Reprod Sci* 2000; 59: 141-157.

BO GA, BARUSELLI, PS, MORENO D, CUTAIA L, CACCIA M, TRIBULO R, TRIBULO H, AND MAPLETOFT RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.

BÓ GA, CUTAIA L, CHESTA P, BALLA E, PINCINATO D, PERES L, MARAÑA D, AVILÉS M, MENCHACA A, VENERANDA G, BARUSELLI PS. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. Resúmenes del VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina 2005; 97-128.

BURKE CR, MACMILLAN KL, BOLAND MP. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomized cows. *Anim Reprod Sci* 1996; 45: 13-28.

Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. *Anim Reprod Sci* 1999; 55:23-33.

COLAZO MG, MARTINEZ MF, WHITTAKER PR, KASTELIC JP AND MAPLETOFT RJ. Estradiol cypionate (ECP) in CIDR-B-based programs for fixed-time AI in beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 371 abstr.

COLAZO MG, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. Estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-B-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 2003; 60: 855-865.

COLAZO MG, KASTELIC JP, MARTÍNEZ MF, WHITTAKER PR, WILDE R, AMBROSE JD, CORBETT R, MAPLETOFT RJ. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. *Theriogenology* 2004; 61: 1115-1124.

COLAZO MG, MARTINEZ MF, SMALL JA, KASTELIC JP, BURNLEY CA, WARD DR, MAPLETOFT RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology* 2005; 63: 1454-68.

CUTAIA L, MORENO D, VILLATA ML AND BO GA. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology* 2001; 55: 244 abstr.

CUTAIA, L., BALLA, E., BÓ, G.A. Efecto del momento de la administración de benzoato o cipionato de estradiol para inducir la ovulación en vaquillonas tratadas con DIB e inseminadas a tiempo fijo. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 2005; 394 abstr.

- GINTHER OJ, KNOPF L AND KASTELIC JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert* 1989; 87: 223-230.
- KESNER JS, PADMANABHAN V, CONVEY EM. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Biol Reprod* 1982; 26: 571-578.
- MACMILLAN KL, THATCHER WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 1991; 45: 883-889.
- MACMILLAN KL, PETERSON AJ. A new intravaginal progesterone-releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. *Anim Reprod Sci* 1993; 33: 1-25.
- MAPLETOFT RJ, MARTINEZ MF, ADAMS GP, KASTELIC J, BURNLEY CA. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology* 1999; 51: 411 abstr.
- MARTÍNEZ MF, COLAZO MG, KASTELIC JP, AND MAPLETOFT RJ. Effects of estradiol-17 β or estradiol benzoate on follicular dynamics in CIDR-B-treated beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 382 abstr.
- MARTINEZ MF. Synchronization of follicular wave dynamics and ovulation for fixed-time artificial insemination in cattle. PhD thesis, University of Saskatchewan 2002; Chapter 5
- MARTÍNEZ MF, KASTELIC JP, BÓ GA, CACCIA M, AND MAPLETOFT RJ. Effects of oestradiol-17 β and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2005; 86: 37-52.
- MORENO D, CUTAIA L, VILLATA ML, ORTISI F, BO GA. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 2001; 55: 408 abstr.
- NATION DP, BURKE CR, PARTON G, STEVENSON R, MACMILLAN KL. Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week post-partum. *Anim Reprod Sci* 2000; 63: 13-25.
- NASSER L, ADAMS GP, BO GA, MAPLETOFT RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-724.
- PERES L.C. Tratamientos de sincronización de la ovulación y factores que afectan las tasas de preñez en receptoras de embriones bovinos congelados en etilenglicol y transferidos a tiempo fijo. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Córdoba. 2005/06.
- THATCHER WW, MOREIRA F, SANTOS JEP, MATTOS RC, LOPEZ FL, PANCARCI SM, RISCO CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001; 55: 75-90.
- THUNDATHIL J, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. Effect of estradiol cypionate administration on ovarian follicular wave dynamics in cattle. *Can J Vet Res* 1997; 61: 314-316.
- THIBIER, M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. *Embryo Transfer Newsletter, IETS*, 2003; 12-19.
- WHITTAKER PR, COLAZO MG, MARTÍNEZ, M.F, KASTELIC JP, AND MAPLETOFT RJ. New and used CIDR-B devices and estradiol benzoate, with or without progesterone, for fixed-time AI in beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 391 abstr.