

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA EN LLAMAS

Jesús Palomino C.¹, Wilfredo Huanca L.² y Teodosio Huanca M.³

ABSTRACT

The effect of exogenous oestradiol and progesterone on embryonic survival around the period of maternal recognition of pregnancy was evaluated in 80 adult llamas with ≥ 15 days after parturition. An ultrasound evaluation was conducted to detect a preovulatory follicle (≥ 7 mm), and then, animals were mated with a male for ≥ 15 minutes of copulation time. Animals were allocated into 4 groups: G0, placebo; G1, 0.2 mg/llama/day of estradiol; G2, 15 mg/llama/day of proligestone, and G3, 0.2 mg/llama/day of estradiol and 15 mg/llama/day of proligestone. Injection of hormones and placebo was done at days 8 and 9 after copula. Mating day was considered as day 0. Ultrasound evaluations were done on day 2 to determine ovulation, on day 9 to measure the size of the corpus luteum, and on days 20, 25, 30 and 35 to observe the presence of the embryonic vesicle and the embryo. Sexual behaviour was evaluated to verify female receptivity on day 0 and to diagnose early pregnancy on day 15. Embryonic survival was higher in G1 (75%) as compared to other groups: G0 (57.9%), G2 (52.6%), and G3 (55.0%) until day 35, but without significant differences. The size of corpus luteum on day 9 was larger in pregnant (12.8 mm) than in non pregnant llamas (10.8 mm). In conclusion, the results suggested that the application of estradiol between days 8 and 9 after mating may improve embryonic survival rate in llamas.

Key words: oestradiol, progesterone, embryonic survival, maternal recognition of pregnancy, llama

RESUMEN

El efecto de la aplicación de estradiol y progesterona, alrededor del momento de reconocimiento maternal de la preñez, sobre la supervivencia embrionaria, fue evaluada en 80 llamas adultas con descanso post parto ≥ 15 días. Se les hizo una ecografía para determinar la presencia del folículo preovulatorio (≥ 7 mm) y luego fueron sometidas a monta por un tiempo de cópula ≥ 15 minutos. Las llamas fueron distribuidas en 4 grupos: G0, placebo; G1, 0.2 mg/llama/día de estradiol; G2, 15 mg/llama/día de proligestona; y G3, 0.2 mg/llama/día de estradiol y 15 mg/llama/día de proligestona. La administración de los compuestos se hizo el día 8 y 9 post cópula. El día de la monta fue el día 0. Se hicieron evaluaciones ecográficas el día 2 para determinar ovulación, el día 9 para medir cuerpo lúteo y los días 20, 25, 30 y 35 para observar vesícula embrionaria y presencia del embrión. La conducta sexual fue evaluada para determinar receptividad frente al macho el día 0 y

¹ Práctica privada

² Laboratorio de Reproducción Animal, FMV-UNMSM. E-mail: wilfredo.huanca@gmail.com

³ Estación Experimental ILLPA-INIA, Puno

para diagnosticar gestación temprana el día 15. El porcentaje de supervivencia embrionaria entre los días 20 y 35 fue mayor en el G1 (75%), en comparación con los otros grupos: G0 (57.9%), G2 (52.6%) y G3 (55.0%), aunque sin encontrar diferencia estadística entre grupos. Por otro lado, el tamaño del cuerpo lúteo al día 9 post cópula tuvo un diámetro mayor en llamas preñadas (12.8 mm) que en no preñadas (10.8 mm) al día 35. En conclusión, estos resultados indicaron que con la aplicación de estradiol entre los días 8 y 9 post cópula se presentaría una mejor respuesta sobre el porcentaje de supervivencia embrionaria en la llama.

Palabras clave: estradiol, progesterona, supervivencia embrionaria, reconocimiento maternal de la preñez, llama

INTRODUCCIÓN

Los niveles de progesterona en llamas son basales al momento de la monta, incrementan en el día 4 a 0.9 nmol/l y en el día 8 alcanzan 12.1 nmol/l, para comenzar a declinar si no hay concepción o mantenerse en alto durante toda la gestación (Aba *et al.*, 1995). Las llamas preñadas muestran un descenso momentáneo en los niveles séricos de progesterona entre los días 8 y 10 (Adams *et al.*, 1991), probablemente debido al inicio de la regresión luteal inducida por el útero, pero rescatada por el embrión presente y en desarrollo (Adams *et al.*, 1991; Aba *et al.*, 1995); lo cual estaría relacionado con la elevación de niveles de estradiol 17 β los días 11-13 y de un ligero incremento de concentraciones de PGF_{2 α} al día 9 de gestación (Aba *et al.*, 1995). La luteólisis ocurre en llamas no preñadas entre los días 9-11 post monta, observándose un aumento de los niveles séricos de la PGF_{2 α} , que coincide con el periodo de regresión del cuerpo lúteo (Adams *et al.*, 1991).

Se estima que entre los días 8 y 15 post monta se produce el reconocimiento maternal de la preñez (RMP) en las llamas, donde el embrión sería el responsable de dar la señal para evitar la luteólisis (Aba *et al.*, 1995). En el dromedario se han hecho estudios que indican que el estradiol podría jugar un rol importante en el RMP (Skidmore *et al.*, 1997). El mecanismo del RMP en camélidos no está establecido; sin embargo, se cree que éste

sea producido de una manera similar como ocurre en las cerdas, donde el estradiol 17 β secuestra a la PGF_{2 α} del útero y hace que sea liberada a la luz uterina impidiendo su paso a la circulación y su llegada al ovario para producir luteólisis (Bazer *et al.*, 1986).

En camélidos sudamericanos se ha demostrado que hay una pérdida embrionaria de 50% a los 30 días de gestación (Fernández-Baca *et al.*, 1970). Se ha reportado en alpacas que la aplicación de GnRH al día 4 post ovulación incrementa la supervivencia embrionaria (Arañga, 2002), y que aplicando estradiol 17 β y progesterona a los 8 y 9 días post ovulación se obtiene un efecto benéfico, llegándose a un 80% de supervivencia embrionaria (Chipayo, 2002). Estos reportes sugieren que a través del manejo hormonal se puede mejorar la supervivencia embrionaria; por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la aplicación de estradiol y progesterona a los días 8 y 9 post cópula, sobre la tasa de supervivencia embrionaria en llamas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El experimento fue realizado entre los meses de enero y marzo del 2003 en el anexo Quimsachata, perteneciente a la Estación Experimental ILLPA del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). La Esta-

ción está ubicada a 4,200 msnm, entre los distritos de Santa Lucía y Cabanillas de las provincias de Lampa y San Román, respectivamente, en el departamento de Puno.

Animales

Se utilizaron 80 llamas adultas con historial reproductivo de haber tenido al menos un parto anterior y con descanso postparto ≥ 15 días. Las hembras seleccionadas fueron evaluadas mediante ultrasonografía, utilizando un ecógrafo portátil ALOKA SSD 500 equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz de frecuencia, para determinar la presencia de un folículo ≥ 7 mm y ser servidas por el sistema de empadre controlado. Todos los animales seleccionados recibieron las mismas condiciones de manejo y fueron alimentados con pastos naturales.

Diseño experimental

Luego de las montas, los animales fueron asignados al azar en uno de los cuatro grupos, recibiendo inyecciones vía im los días 8 y 9 post cópula según el siguiente esquema:

- G0 (n=20): 2 ml/animal/día de suero fisiológico.
- G1 (n=20): 0.2 mg/animal/día de benzoato de estradiol.
- G2 (n=20): 15 mg/animal/día de proligestona.
- G3 (n=20): 0.2 y 15mg/animal/día de benzoato de estradiol y proligestona, respectivamente.

Procedimiento experimental

El día de la monta fue el día 0. Se realizaron ecografías en el día 2 para determinar ovulación por desaparición del folículo dominante, en el día 9 para determinar presencia y tamaño del cuerpo lúteo, y en los días 20, 25, 30 y 35 para observar vesícula embrionaria y presencia del embrión.

Se realizó una prueba de receptividad sexual el día 15. Las hembras no receptivas al macho fueron consideradas preñadas, mien-

tras que las que adoptaban la posición de cópula fueron consideradas vacías.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STATA 8.0 (Statistic Data Analysis). La supervivencia embrionaria por grupos fue analizada mediante curvas de supervivencia utilizando la prueba estadística de Kaplan Meier. La tasa de supervivencia embrionaria al día 35 fue analizada con la prueba de Log-Rank. El porcentaje de ovulación y el tamaño del cuerpo lúteo de los diferentes grupos al día 9 post cópula fue analizado por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía.

RESULTADOS

Tasa de ovulación

En el 97.5% de las llamas ocurrió la ovulación, verificada por ecografía al día 2 postcópula (Cuadro 1). El promedio de tamaño del folículo dominante al momento del servicio fue similar para todos los grupos, siendo el menor tamaño individual ≥ 7 mm. El 100% de los animales presentó receptividad frente al macho.

Tasa de supervivencia embrionaria (TSE)

La TSE obtenida al día 15 por prueba de receptividad sexual fue ligeramente superior en G2 (84.2%) en comparación con los demás grupos. Sin embargo, al día 20 y 35 fue mayor en G1 (75%) aunque no hubo diferencias significativas entre grupos (Cuadro 2).

Tamaño del cuerpo lúteo (día 9) y su relación con la TSE

No hubo diferencias significativas entre grupos con relación al tamaño del cuerpo lúteo al día 9 post cópula; sin embargo, se encontró un mayor tamaño del cuerpo lúteo en los animales que presentaron mayor supervivencia embrionaria en comparación con los que tuvieron mortalidad embrionaria (Cuadro 3).

Cuadro 1. Tasa de ovulación en llamas sometidas a monta controlada

Ovulación	G0 n=20	G1 n=20	G2 n=20	G3 n=20	Total n=80
Nº	19	20	19	20	78
%	95	100	95	100	97.5

G0: Testigo; G1: 02 mg estradiol; G2: 15 mg proligestona; G3: 0.2 mg estradiol y 15 mg proligestona. Las hormonas se aplicaron los días 8 y 9 post cópula

Cuadro 2. Porcentaje de supervivencia embrionaria¹ en llamas sometidas a monta controlada

Día de evaluación post cópula	G0 n=19	G1 n=20	G2 n=19	G3 n=20	Total n=78
15 ²	79.0	75.0	84.2	80.0	79.5
20	57.9	75.0	63.2	55.0	62.8
25	57.9	75.0	52.6	55.0	60.3
30	57.9	75.0	52.6	55.0	60.3
35	57.9	75.0	52.6	55.0	60.3

G0: Testigo; G1: 02 mg estradiol; G2: 15 mg proligestona; G3: 0.2 mg estradiol y 15 mg proligestona. Las hormonas se aplicaron los días 8 y 9 post cópula

¹ Verificado por ultrasonografía

² Realizado por prueba de receptividad sexual

Cuadro 3. Tamaño del cuerpo lúteo (mm) al día 9 post cópula en llamas en relación con la supervivencia (SE) y la mortalidad embrionaria (ME) al día 35 post cópula

Grupos	G0	G1	G2	G3	Total
SE	12.9±1.9 (11) ¹	13.3±2.3 (15)	11.8±1.8 (10)	12.8±2.1 (11)	12.8±2.1 (47)
ME	11.4±2.2 (8)	11.4±2.7 (5)	10.3±1.6 (9)	10.3±2.6 (9)	10.8±2.2 (31)

G0: Testigo; G1: 0.2 mg estradiol; G2: 15 mg proligestona; G3: 0.2 mg estradiol y 15 mg proligestona. Las hormonas se aplicaron los días 8 y 9 post cópula

¹ Número de animales

DISCUSIÓN

El presente estudio reporta el efecto de la aplicación de estradiol y progesterona los días 8 y 9 post cópula, que se sugiere como el momento de inicio del RMP en camélidos

sudamericanos (Aba *et al.*, 1995); así como la posibilidad de que el estradiol desempeñe un rol importante en este proceso basado en la presencia de folículos estrogénicos (≥ 7 mm) hallados por Araínga (2002) alrededor de los días 10-12 post-ovulación.

Los resultados sobre la frecuencia de supervivencia embrionaria demuestran una tendencia hacia un mejor efecto por parte del grupo de estradiol (G1); coincidiendo con los resultados de Chipayo *et al.* (2003) en alpacas.

El G2 de proligestona no presentó diferencias con el grupo control, lo cual podría ser explicado por el efecto progestagénico leve de la proligestona sobre el tejido endometrial (Van Os, 1982). Este resultado contrasta con lo reportado por Chipayo *et al.* (2003), quienes tuvieron respuesta a la administración de progesterona a los días 8 y 9 post ovulación en alpacas.

La combinación de estradiol + proligestona (G3) fue estudiada en ovejas para sincronizar ondas foliculares (Raw *et al.*, 1995) donde se obtuvo un incremento en la liberación de $PGF_{2\alpha}$, que produciría la regresión del cuerpo lúteo y posteriormente la mortalidad embrionaria. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias con el grupo control.

Dos de las 80 hembras no ovularon frente al estímulo coital. Existe información que indica que puede existir hasta 10% de fallas ovulatorias, posiblemente por las variaciones en el estadio de desarrollo folicular en el que podrían haber estado las hembras durante el periodo de monta (Novoa, 1992).

No hubo diferencia significativa entre grupos en tamaño del cuerpo lúteo al día 9 post cópula. Sin embargo, se encontró en llamas preñadas una tendencia a presentar CLs ligeramente mayores que en las vacías, al igual que en otros reportes (Adams *et al.*, 1991).

CONCLUSIONES

- Se encontraron evidencias no conclusivas que la aplicación de estradiol exógeno a los 8 y 9 días post-cópula en

llamas permite tener una mayor supervivencia embrionaria al día 35 de la cópula.

- El tamaño del cuerpo lúteo al día 9 post cópula en llamas preñadas es ligeramente mayor que el de llamas no preñadas.

LITERATURA CITADA

1. **Aba, M.; M. Forsberg; H. Kindahl; J. Sumar; L. Edqvist. 1995.** Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.* 36: 489-498.
2. **Adams, G; J. Sumar; O. Ginther. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 127-138.
3. **Araínga, M.; V. Leyva; W. García. 2003.** Efecto de la GnRH en el proceso de reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Rev. Inv. Vet., Perú* 14: 104-110.
4. **Bazer, F.; J. Vallet; R. Roberts; D. Sharp; W. Thatcher. 1986.** Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 76: 841-850.
5. **Chipayo, Y.; V. Leyva; W. García. 2003.** Efecto del estradiol en el periodo de reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Rev. Inv. Vet., Perú* 14: 111-118.
6. **Fernández Baca, S.; W. Hansel; C. Novoa. 1970.** Embryonic mortality in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3: 243-251.
7. **Novoa, C. 1992.** Reproducción en camélidos. *Rev. Cien. Vet., Perú* 8: 9-11.
8. **Raw, R.; W. Silvia; T. Curry. 1995.** Effects of progesterone and estradiol on prostaglandin endoperoxide synthase in ovine endometrial tissue. *Anim. Reprod. Sci.* 40: 17-30.

9. **Skidmore, J.; W. Allen; R. Heap. 1997.** Maternal recognition of pregnancy in the dromedary camel. *J. Camel Pract. Res.* 4: 187-192.
10. **Van Os, J. 1982.** Oestrus control in the bitch with proligestone. A clinical study. PhD Thesis. University of Utrecht. Netherlands. 56 p.