

## El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en bovinos\*

*Combined use of reduced doses of FSH-P and eCG as superovulatory treatment in cattle*

Callejas<sup>1</sup>, S.S., Alberio<sup>2</sup>, R., Cabodevila<sup>1</sup>, J.A., Dulout<sup>3</sup>, F.,  
Aller<sup>2</sup>, J. y Catalano<sup>1</sup>, R.

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce  
Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata

### Resumen

Para evaluar la respuesta ovárica después de administrar dosis reducidas de: FSH-P, eCG o su combinación, se utilizaron 12 vacas y 24 vaquillonas (Angus, condición corporal:  $6,9 \pm 0,1$ ;  $x \pm e.e.$ ; escala 1 a 9). Se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos:  $\frac{1}{2}$ FSH-P: FSH-P, 5 ó 6 mg Armour vía intramuscular (IM) y 10 u 11 mg vía subcutánea (SC) en vaquillonas y vacas, respectivamente, administrados en dosis única y simultánea.  $\frac{1}{2}$ eCG: 1000 o 1250 UI de eCG, SC, en vaquillonas y vacas, respectivamente. FSH-P+eCG: Vaquillonas: 5 mg de FSH-P, IM, y al mismo tiempo, 1000 UI de eCG y 10 mg de FSH-P, SC. Vacas: idem vaquillonas con: 6 mg, 1250 UI y 11 mg, respectivamente. Se inyectó Cloprostenol a las 48 h (500  $\mu$ g) y 60 h (250  $\mu$ g) de comenzado el tratamiento superovulatorio [día  $10,0 \pm 0,1$  ( $x \pm ee$ ) del ciclo estral]. Se inseminaron a las 60 y 72 h post Cloprostenol con semen congelado/descongelado. Siete días después se recolectaron los ovocitos/embriones. El análisis estadístico se realizó utilizando el SAS. No se observaron efectos de la categoría de animal. La respuesta superovulatoria ( $p < 0,01$ ) fue superior en FSH-P+eCG (100%) comparada con  $\frac{1}{2}$ FSH-P (6,25%) y  $\frac{1}{2}$ eCG (25%). El número de CL, embriones totales, transferibles y congelables fue superior en FSH-P+eCG ( $p < 0,01$ );  $\frac{1}{2}$ FSH-P y  $\frac{1}{2}$ eCG no difiriendo entre sí (CL:  $7,6 \pm 0,8$ ;  $1,3 \pm 0,2$ ;  $1,9 \pm 0,4$ ; Embriones totales:  $6,3 \pm 0,7$ ;  $0,06 \pm 0,06$ ;  $0,7 \pm 0,4$ ; transferibles:  $4,3 \pm 0,5$ ;  $0,06 \pm 0,06$ ;  $0,3 \pm 0,2$ ; congelables:  $3,0 \pm 0,4$ ;  $0,06 \pm 0,1$ ;  $x \pm ee$ ; FSH-P+eCG;  $\frac{1}{2}$ FSH-P y  $\frac{1}{2}$ eCG, respectivamente). La presencia de un folículo dominante en crecimiento y la concentración de progesterona afectaron la respuesta superovulatoria. En conclusión, las dosis reducidas utilizadas de FSH-P o de eCG son insuficientes para producir una respuesta ovárica compatible con tratamientos superovulatorios convencionales. La presencia de un folículo dominante en crecimiento y

Recibido: diciembre 2003

Aceptado: febrero 2005

\* El presente es uno de los trabajos que forman parte de los requisitos que Callejas, S. cumplimentó para optar al título de Doctor en Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los resultados preliminares fueron presentados en el 25º Congreso Argentino de Producción Animal.

1. Med. Vet. Profesores de la Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Campus Universitario. (7000) Tandil. Buenos Aires. Argentina. E-mail: callejas@vet.unicen.edu.ar

2. Med. Vet. Técnico de la EEA INTA Balcarce. C.C. 276 (7620) Balcarce.

3. Ing. Zootecnista. Profesor de la Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. (1900) La Plata.

la concentración de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio afectan la respuesta al mismo.

**Palabras clave:** superovulación, FSH-P, eCG, embriones, bovino.

## Summary

To evaluate the ovarian response after administration of reduced doses of FSH-P, eCG or a combination of both, 12 cows and 24 heifers (Angus, body condition:  $6.9 \pm 0.1$ ;  $x \pm s.d.$ ; scale 1 to 9) were assigned to three treatments:  $\frac{1}{2}$ FSH-P: FSH-P, 5 or 6 mg Armour intramuscularly (IM) and 10 or 11 mg subcutaneously (SC) in heifers and cows, respectively, administered as a sole and simultaneous dose.  $\frac{1}{2}$ eCG, 1000 or 1250 UI of eCG were SC administered to heifers and cows, respectively. FSH-P+eCG, heifers: 5 mg FSH-P and, at the same time, 1000 UI eCG + 10 mg FSH-P, SC. The same administration scheme was used for cows with: 6 mg, 1250 UI and 11 mg, respectively. All the animals were injected Cloprostenol at 48 h (500  $\mu$ g) and 60 h (250  $\mu$ g) after the beginning superovulatory treatment [day  $10.0 \pm 0.1$  ( $x \pm sd$ ) of the estrous cycle]. The animals were inseminated at 60 and 72 h post Cloprostenol with frozen semen. After seven days, oocytes/embryos were collected. Statistical analyses were performed by SAS. No animal category effect was observed. The superovulatory response were greater in the FSH-P + eCG (100%) ( $p < 0.01$ ) than  $\frac{1}{2}$ FSH-P (6.25%) and  $\frac{1}{2}$ eCG (25%). The number of CL, total embryos, transferable and freezable from FSH-P+eCG was greater ( $p < 0.01$ ) than  $\frac{1}{2}$ FSH-P and  $\frac{1}{2}$ eCG; no difference was observed between the latter (CL:  $7.6 \pm 0.8$ ;  $1.3 \pm 0.2$ ;  $1.9 \pm 0.4$ ; total embryos:  $6.3 \pm 0.7$ ;  $0.06 \pm 0.06$ ;  $0.7 \pm 0.4$ ; transferable:  $4.3 \pm 0.5$ ;  $0.06 \pm 0.06$ ;  $0.3 \pm 0.2$ ; freezable:  $3.0 \pm 0.4$ ;  $0$ ;  $0.06 \pm 0.1$ ;  $x \pm sd$ ; FSH-P+eCG;  $\frac{1}{2}$ FSH-P and  $\frac{1}{2}$ eCG, respectively). The presence of a growing dominant follicle and progesterone concentration at the beginning of the superovulatory treatment affected negatively treatment response. It is concluded that reduced doses of FSH-P or eCG utilized are insufficient to produce an ovarian response compatible with those of conventional superovulatory treatments. The presence of a growing dominant follicle and the progesterone concentration at the beginning of treatment affect the superovulatory response.

**Key words:** superovulation, FSH-P, eCG, embryos, bovine.

## Introducción

En los programas de transferencia embrionaria la inducción a la superovulación se realiza con diferentes preparaciones hormonales, entre las que se encuentran el extracto de pituitaria de origen porcino (FSH-P) y la gonadotrofina coriónica equina (eCG) y la hMG (gonatrofina menopáusica humana).

La FSH-P requiere de múltiples inyecciones para obtener una adecuada respuesta superovulatoria, consecuencia de su corta vida media (Demoustier et al., 1988). Por otro lado, la eCG, con una mayor vida me-

dia, produce estimulación ovárica con una sola administración (Mapletoft, 1980). Sin embargo, esta estimulación ovárica prolongada se traduce en folículos grandes no ovulados observados 7 u 8 días después de finalizado el tratamiento (Springmann et al., 1986; Yadav et al., 1986) los que afectan la calidad embrionaria y provocan una disminución del porcentaje de embriones transferibles (Zeitoun et al., 1988). En base a esto, Callejas et al., (2002) combinaron dosis reducidas de FSH-P y de eCG, administradas en un mismo momento, con resultados en número de embriones transferibles equi-

valentes a los obtenidos con el tratamiento que utiliza FSH-P en dosis completa, fraccionada en múltiples aplicaciones (3,8 y 4,4 embriones transferibles, respectivamente).

En el trabajo realizado por Callejas et al. (2002) no se pudo discernir si la respuesta superovulatoria obtenida por la combinación de dosis reducidas de FSH-P con eCG se debió al efecto combinado de ambas gonadotropinas o fue consecuencia de una de ellas en particular. Además, existen resultados en la bibliografía que indican que dosis reducidas de eGC (1500-1800 UI) por sí solas, han provocado una respuesta ovárica caracterizada por 14 (Eldsen et al., 1978) y 6 (Zeitoun et al., 1991) cuerpos lúteos. En consecuencia, se diseñó el presente experimento con el objetivo de determinar la respuesta ovárica después de la aplicación de dosis reducidas de eCG administradas por vía subcutánea, de FSH-P aplicada por vía intramuscular y subcutánea, y de la combinación de ambas.

Por último, algunos estudios han determinado que, tanto la presencia de un folículo dominante (Grasso et al., 1989; Guilbault et al., 1991; Bungartz y Niemann, 1994) como el nivel de progesterona en el momento de iniciar un tratamiento de estimulación ovárica (Callesen et al., 1988; Goto et al., 1987; Goto et al., 1988) afectan la respuesta al mismo. Así, la presencia de un folículo dominante en crecimiento la deprime (Guilbault et al., 1991) y un mayor nivel de progesterona la favorece (Goto et al., 1987, 1988). Por lo tanto se consideró de interés evaluar estos parámetros durante la aplicación de tratamientos superovulatorios con el fin de posibilitar un mejor análisis de la respuesta a los mismos.

## Materiales y Métodos

### *Animales y tratamientos*

Se utilizaron 12 vaquillonas y 24 vacas con actividad sexual cíclica, distribuidas según un diseño completamente aleatorizado en tres tratamientos de acuerdo con el tipo de estimulación ovárica realizada.

*½FSH-P:* Dos aplicaciones simultáneas (Intramuscular –IM- y Subcutánea –SC-) de FSH-P™ (Schering- Plough, Animal Health Corp., Kenilworth, NJ) que variaron según la categoría de las hembras donantes (en vaquillonas: 5 µg IM y 10 µg SC; en vacas; 6 µg IM y 11 µg SC).

*½eCG:* Una aplicación por vía SC de 1000 o 1250 UI de eCG (Novormon®, Syntex) según se tratara de vaquillonas o vacas, respectivamente.

*FSH-P+eCG:* Se aplicaron simultáneamente los tratamientos ½FSH-P y ½eCG (½FSH-P + ½eCG).

La condición corporal de las hembras al inicio del tratamiento no difirió entre categorías, ni entre tratamientos ( $6,9 \pm 0,1$ ;  $x \pm ee$ ; escala 1-9; Richards et al., 1986).

El tratamiento superovulatorio se realizó el día  $10 \pm 0,1$  ( $x \pm ee$ ) del ciclo estral y los animales fueron inyectados con un análogo de la PGF2α (Cloprostenol, CX0.1® López & Villanueva, Argentina) a las 48 hs (500 µg) y 60 hs (250 µg) después de comenzado dicho tratamiento.

La detección de celos se realizó por observación visual durante 30 minutos, tres veces por día después de finalizado el tratamiento superovulatorio. Se consideró animal en celo

aquel que permaneció inmóvil al ser montado por otro.

Todos los animales fueron inseminados con semen congelado/descongelado procesado en pastillas, a las 60 y 72 hs después de la primera PGF2 $\alpha$ , hubiese o no presentado celo. Las inseminaciones las realizó un solo operador y el semen provino de un toro con fertilidad probada.

En el caso de las vaquillonas, las mismas fueron reutilizadas en una única oportunidad, luego de un periodo de espera superior a 6 meses para no tener efecto residual de los tratamientos anteriores.

#### *Respuesta ovárica, recolección de embriones y evaluación de los mismos*

Se consideró que el animal respondió al tratamiento superovulatorio cuando presentó tres o más cuerpos lúteos (determinados por ultrasonografía) al momento de la recolección de embriones. Esta se realizó el día 7 u 8 post celo, utilizando el método no quirúrgico por vía transcervical (Eldsen et al., 1978).

Los embriones recuperados fueron contados y evaluados bajo lupa estereoscópica (40x) de acuerdo a su calidad según las normas de la International Embryo Transfer Society (IETS; Stringfellow y Seidel, 2000) para determinar el número de embriones transferibles y congelables. Aquellos de calidad excelente, buena y regular fueron considerados transferibles (grados 1 y 2; manual IETS) y los de calidad excelente y buena como congelables (grado 1, manual IETS). Los embriones de mala calidad (degenerados) y los ovocitos sin fertilizar fueron considerados no transferibles (grados 3 y 4, manual IETS).

#### *Ultrasonografía, muestreo sanguíneo y medición de progesterona*

Los estudios ecográficos se realizaron con un ecógrafo SonoAce 1500® (Medison, Korea), modo-B, tiempo real, equipado con un transductor convexo transvaginal de 6,5 MHz.

En cada ecografía, cada uno de los ovarios fue revisado varias veces en al menos 2 planos

y se midió el folículo de mayor tamaño. Se registró una sola medida cuando el folículo era esférico y el promedio de 2 diámetros perpendiculares, cuando no lo era.

Las ecografías se realizaron el día -2 (día 0: inicio del tratamiento superovulatorio), el día 0 y en el momento de la recolección de embriones.

Las dos primeras observaciones ecográficas fueron realizadas para determinar las características del o los folículos existentes en el momento de iniciar el tratamiento superovulatorio: folículo dominante en fase de crecimiento (> 1 mm de diferencia entre las dos observaciones), en meseta (sin diferencias) o en regresión (< 1 mm de diferencia). La última observación ecográfica se realizó para evaluar la respuesta ovárica, la que fue caracterizada por la suma del número de folículos  $\geq$  10 mm de diámetro y del número de cuerpos lúteos.

Los muestreos de sangre se realizaron en todos los animales el día de inicio del tratamiento superovulatorio y, en los animales que no manifestaron celo, en el momento del celo esperado. Las muestras se tomaron por punción yugular, colocándolas en tubos heparinizados, se las centrifugó inmediatamente de extraídas y el plasma sobrenadante se conservó a -20°C hasta el momento en que se determinó la concentración de progesterona. Cuando la muestra de sangre coincidió con el estudio ecográfico, ésta fue tomada en primer lugar.

La medición de progesterona se realizó por radioinmunoanálisis utilizando el Kit comercial ImmunoChem™ provisto por ICN Pharmaceuticals, Inc. El trazador radiactivo utilizado fue <sup>125</sup>I, con una sensibilidad de 0,15 ng/ml y coeficientes de variación inter e intraensayo, en niveles equivalentes a una fase luteal, de 9,1% y 5,9% respectivamente.

El nivel de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio fue relacionado con la respuesta a dicho tratamiento, independientemente de la categoría de animal. Para esto, los animales se agruparon en: Grupo A, el nivel fue  $\geq$  5 ng/ml y Grupo B, valores inferiores al mencionado nivel (Callejas et al., 2002).

### Análisis estadístico

Las respuestas experimentales fueron analizadas utilizando los procedimientos CATMOD (variables discretas) y GLM (variables continuas) pertenecientes al SAS (1989). El modelo estadístico utilizado incluyó los efectos de tratamiento, categoría y de la interacción tratamiento x categoría. Para estudiar el efecto del estadio del folículo dominante (en fases de crecimiento, meseta o en regresión) o el nivel de progesterona al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio se realizó un ANOVA, considerando dichos efectos en el modelo de análisis.

Las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron evaluadas mediante el test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas a  $p < 0,05$ .

El número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar fue transformado utilizando la ecuación  $y = \log(x + 1)$ .

Los porcentajes de recolección de embriones en relación al número de cuerpos lúteos, de embriones transferibles y de embriones congelables en relación al número de embriones totales fueron transformados mediante la ecuación  $y = \arcseno \sqrt{x}$ , analizándose los por ANOVA (Sokal y Rohlf, 1981).

Todos los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar ( $\pm$ e.e.).

### Resultados

En ninguna de las variables analizadas se observaron efectos de la categoría de animal, ni de la interacción tratamiento por categoría ( $p > 0,05$ ). En consecuencia, los resultados se presentan agrupando vaquillonas y vacas.

La totalidad de los animales ovularon luego del tratamiento superovulatorio. Con respecto a la respuesta superovulatoria ( $\geq$  de 3 cuerpos lúteos), el 100% de las hembras respondió al tratamiento FSH-P+eCG, difiriendo significativamente ( $p < 0,01$ ) de los tratamientos que utilizaron la mitad de la dosis de FSH-P (6,25%) o eCG (25,0%).

El porcentaje de hembras que manifestaron celo post tratamiento fue significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) en el grupo que recibió una dosis reducida de FSH-P (25%), no existiendo diferencias entre los grupos eCG y FSH-P+eCG (75% y 100%, respectivamente).

El intervalo prostaglandina-celo del grupo FSH-P+eCG ( $46,9 \pm 2,1$  h) resultó inferior al de los tratamientos  $\frac{1}{2}$ FSH-P ( $82,5 \pm 18,4$  h;  $p < 0,01$ ) y  $\frac{1}{2}$ eCG ( $70,5 \pm 7,5$  h;  $p < 0,05$ ). Esto es consecuencia del menor intervalo observado en los animales que respondieron al tratamiento superovulatorio comparado con los que no lo hicieron ( $46,9 \pm 2,1$  y  $85,6 \pm 7,8$  h, respectivamente;  $p < 0,01$ ).

En el grupo FSH-P+eCG se observó un mayor número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles y congelables ( $p < 0,01$ ) así como de embriones degenerados y de ovocitos sin fertilizar ( $p < 0,05$ ) que el obtenido con los tratamientos que utilizaron la mitad de la dosis de FSH-P o de eCG, quienes no difirieron entre sí ( $p > 0,05$ , Cuadro 1).

El número de folículos  $\geq 10$  mm de diámetro presentes en el momento de realizar la recolección de embriones, fue similar entre tratamientos ( $1,6 \pm 0,3$ ;  $p > 0,05$ ).

La tasa de recuperación de embriones (embriones recuperados /  $n^\circ$  de cuerpos lúteos x 100) fue  $84,1 \pm 4,5\%$  en el grupo FSH+eCG. En este grupo, los porcentajes de embriones transferibles y congelables en relación al número de embriones totales fueron  $68,0 \pm 2,6\%$  y  $45,9 \pm 4,7\%$  respectivamente. Esta información no fue analizada en los otros tratamientos dado que la mayoría de los animales no presentaron respuesta superovulatoria.

El porcentaje de animales que presentaron los distintos estadios del folículo dominante (crecimiento, meseta y regresión) al comenzar la estimulación ovárica fue similar entre tratamientos ( $p > 0,05$ ; Cuadro 2).

Para el análisis del efecto del estadio del folículo dominante y del nivel de progesterona plasmática en el día de inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta ovárica

**Cuadro 1:** Respuesta ovárica después de diferentes tratamientos estimulatorios ( $\bar{x}\pm e.e.$ ).

**Table 1:** Ovarian response after different stimulation treatments (means $\pm$ sem).

Tratamientos	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
$\frac{1}{2}$ FSH-P <sup>1</sup> (n: 16)	1,3 $\pm$ 0,2a	0,06 $\pm$ 0,06a	0,06 $\pm$ 0,06a	0,06 $\pm$ 0,06a	0,0 $\pm$ 0,0c	0,0 $\pm$ 0,0c
$\frac{1}{2}$ eCG <sup>2</sup> (n: 16)	1,9 $\pm$ 0,4a	0,7 $\pm$ 0,4a	0,3 $\pm$ 0,2a	0,1 $\pm$ 0,1a	0,1 $\pm$ 0,1c	0,06 $\pm$ 0,1c
FSH-P+eCG <sup>3</sup> (n: 16)	7,6 $\pm$ 0,8b	6,3 $\pm$ 0,7b	4,3 $\pm$ 0,5b	3,0 $\pm$ 0,4b	0,9 $\pm$ 0,2d	0,9 $\pm$ 0,3d

Referencias: <sup>1</sup>5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas y vacas respectivamente.

<sup>2</sup>1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas y vacas respectivamente.

<sup>3</sup>5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas y vacas respectivamente.

ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente: a,b (p<0,01) y c,d (p<0,05).

**Cuadro 2:** Porcentaje de animales en los distintos estadios del folículo dominante al momento de comenzar la estimulación ovárica con los diferentes tratamientos superovulatorios.

**Table 2:** Proportion (%) of animals with different stages of dominant follicle at the beginning of ovarian stimulation with different superovulatory treatments.

Tratamientos	Estadio del folículo dominante (%)		
	Crecimiento	Meseta	Regresión
$\frac{1}{2}$ FSH-P <sup>1</sup>	43,8 (7/16)	31,3 (5/16)	25,0 (4/16)
$\frac{1}{2}$ eCG <sup>2</sup>	43,8 (7/16)	31,3 (5/16)	25,0 (4/16)
FSH-P+eCG <sup>3</sup>	50,0 (8/16)	25,0 (4/16)	25,0 (4/16)

Referencias: <sup>1</sup>5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas y vacas respectivamente.

<sup>2</sup>1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas y vacas respectivamente.

<sup>3</sup>5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas y vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas y vacas respectivamente.

sólo se consideró al grupo FSH-P+eCG debido a que fue el único en que hubo este tipo de respuesta.

Las hembras con un folículo dominante en fases de meseta o regresión al inicio del tratamiento superovulatorio tuvieron un mayor número de cuerpos lúteos y de embriones totales, transferibles y congelables en comparación con las hembras que presentaron un folículo dominante en crecimiento (Cuadro 3).

Los dos primeros estadios no difirieron entre sí (p>0,05).

En los animales del grupo FSH-P+eCG con un nivel de progesterona inferior a 5 ng/ml de plasma en el día de inicio del tratamiento superovulatorio, se observó un menor número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables que en aquellos con un nivel igual o mayor a dicho valor (p<0,01; Cuadro 4).

**Cuadro 3:** Número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y de ovocitos sin fertilizar según el estadio del folículo dominante al momento de comenzar el tratamiento superovulatorio en el Grupo FSH-P+eCG.

**Table 3:** Numbers of corpus luteum, total, transferable, freezeable and degenerated embryos and unfertilized ova according to dominant follicle stage at the beginning of superovulatory treatment in FSH-P+eCG group ( $\bar{x}\pm s.e.$ ).

F D	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
C (n: 4)	4,3±0,3c	3,0±0,0a	2,0±0,0a	1,0±0,2a	1,0±0,0	0
M+R (n: 12)	8,7±0,5d	7,4±0,4b	5,1±0,3b	3,7±0,2b	0,9±0,2	1,25±0,2

Referencias: FD: Estadio del folículo dominante. C: Crecimiento, M: Meseta, R: Regresión  
 ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente: a,b (p<0,01) y c,d (p<0,05).

**Cuadro 4:** Número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y de ovocitos sin fertilizar según el nivel de progesterona plasmática al día de inicio de los tratamientos superovulatorios ( $\bar{x}\pm e.e.$ ).

**Table 4:** Numbers of corpus luteum, total, transferable, freezeable and degenerated embryos and unfertilized ova according to level of plasmatic progesterone at day of beginning of superovulatory treatment ( $\bar{x}\pm s.e.$ ).

P4 (ng/ml)	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
<5 (n: 5 )	4,6±0,4a	3,6±0,5a	2,4±0,4a	1,4±0,4a	1,0±0,0	0,2±0,2
³5 (n: 11)	8,9±0,9b	7,5±0,8b	5,2±0,7b	3,7±0,4b	0,9±0,4	1,3±0,4

Referencias: ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos.

a,b Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente (p<0,01).

### Discusión

La reducción de la dosis de las gonadotrofinas (hMG: a un 25%; Mc Gowan et al., 1985; FSH-P: a ~10 mg Armour et al., 1988; González et al., 1990), administradas en un esquema de múltiples aplicaciones, no fue suficiente para obtener una buena respuesta superovulatoria y coincide con los resultados observados en el presente trabajo.

Con respecto a la vía de administración, la dosis total de gonadotrofina inyectada por vía SC provocó una respuesta superovulatoria comparable a la observada después de la aplicación de múltiples inyecciones intramusculares (Bo et al., 1991; Hockley et al., 1992; Staigmillier et al., 1992; Misra et al., 1992;

Kasiraj et al., 1992; Schalleberger et al., 1994). Otros autores sin embargo, utilizando la misma vía de aplicación, obtuvieron resultados menores y postularon que los niveles plasmáticos de FSH fueron insuficientes (Kelly et al., 1997; Walsh et al., 1993). Inclusive, ha sido determinado que el nivel plasmático de FSH a las 48 hs de administrada la gonadotrofina por vía SC, fue similar al detectado previo a la aplicación del tratamiento (Takedomi et al., 1993). En el presente trabajo, en el grupo ½FSH-P además de aplicarse una dosis reducida de FSH, esta se inyectó en una sola aplicación, por lo que se puede hipotetizar que los niveles plasmáticos de FSH generados por el tratamiento no fueron suficientes para

provocar una adecuada estimulación ovárica.

Con respecto a la eCG, algunos investigadores trabajando con dosis reducidas de eCG (1500-1800 UI) obtuvieron una respuesta superovulatoria caracterizada por 14 y 6 cuerpos lúteos, respectivamente (Eldsen et al., 1978 y Zeitoun et al., 1991). En el presente experimento, si bien las dosis reducidas de eCG fueron levemente inferiores a las utilizadas por estos investigadores, estas resultaron insuficientes para producir una respuesta ovárica equivalente a la obtenida cuando se utilizaron dosis de 2000 a 3000 UI (Wubisshet et al., 1986; Zeitoun et al., 1991; Boland et al., 1991).

La respuesta superovulatoria (número de cuerpos lúteos y embriones) obtenida en el grupo FSH-P+eCG es coincidente a la obtenida en un estudio previo (Callejas et al., 2002). En función de los resultados obtenidos en los grupos  $\frac{1}{2}$ FSH-P y  $\frac{1}{2}$ eCG, es posible afirmar que la respuesta observada en el grupo FSH-P+eCG es el resultado del efecto combinado de ambas gonadotropinas y no del efecto de alguna de ellas en particular.

Existen numerosos factores que afectan la respuesta a un tratamiento superovulatorio (Kafi y McGowan, 1997), entre los cuales se encuentra el estado ovárico al iniciar el tratamiento. En el presente trabajo los resultados observados en el grupo FSH-P+eCG demostraron claramente que la presencia de un folículo dominante en crecimiento es un severo depresor de tal respuesta en coincidencia con lo observado por otros autores (Guilbault et al., 1991; Bungartz y Niemann, 1994; Lussier et al., 1995).

El nivel de progesterona plasmática es otro de los factores que explicaría una parte de la variabilidad en la respuesta al tratamiento superovulatorio. Como en otros trabajos (Goto et al., 1987, 1988; Herrler et al., 1990), en el presente se observó una relación positiva entre niveles de progesterona al inicio del tratamiento con la respuesta al mismo. No obstante, otros autores no han encontrado tal relación (Saumande,

1980; Tamboura et al., 1985; Walton y Stubbings, 1986).

Los animales que tuvieron un nivel de progesterona  $\geq$  a 5 ng/ml al inicio del tratamiento superovulatorio presentaron un folículo dominante en fases de meseta o regresión. Por el contrario, los animales con una concentración inferior presentaron, en un 80%, un folículo dominante en fase de crecimiento. Por tal motivo se puede sospechar que gran parte de la relación observada entre la respuesta superovulatoria y el nivel de progesterona se debería a que cuando estos últimos niveles son bajos, esto coincide con la presencia de un folículo dominante en crecimiento.

En los animales que no manifestaron celo después del tratamiento, el nivel de progesterona en el momento esperado del celo fue menor a 1 ng/ml de plasma, descartándose una falla en el mecanismo de luteólisis. En consecuencia y dado que los animales ovularon, habría que atribuir esto a una falla en la detección de los celos. Es difícil encontrar una explicación al respecto, dado que la metodología y el momento de detección del celo fueron los mismos en los diferentes grupos experimentales.

Por último, el intervalo primera dosis de prostaglandina-celo en las hembras tratadas con gonadotropinas se encuentra en el rango citado en la bibliografía (Canseco et al., 1982; McGowan et al., 1985; Lindsell et al., 1986; Lopez Gatus et al., 1988; Larocca et al., 1999). Los animales que no tuvieron respuesta superovulatoria presentaron un intervalo mayor, comportándose como si no hubieran recibido tratamiento de estimulación ovárica (Seidel et al., 1978; citado por Canseco et al., 1992).

## Conclusiones

La dosis reducida de FSH-P (5 o 6 mg por vía intramuscular y 10 u 11 mg vía subcutánea, según sean vaquillonas o vacas, respectivamente) o de eCG (1000 o 1250 UI, vía subcutánea, según sean vaquillonas o vacas

respectivamente) es insuficiente para producir una respuesta ovárica equivalente a la obtenida con los tratamientos superovulatorios convencionales.

La respuesta superovulatoria que se obtiene con el tratamiento combinado de dosis reducidas de gonadotrofinas aplicadas en dosis única (FSH-P+eCG) es debida al efecto combinado de ambas gonadotrofinas y no de una de ellas en particular. Esta respuesta es similar en vaquillonas y vacas y similar a la obtenida en tratamientos convencionales.

La presencia de un folículo dominante en crecimiento al momento de comenzar el tratamiento superovulatorio afecta negativamente la respuesta ovárica.

El nivel de progesterona al momento de iniciar un tratamiento superovulatorio afecta la respuesta al mismo. Niveles mayores o iguales a 5 ng/ml de plasma se relacionan con una mayor respuesta medida en cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables.

### Bibliografía

- Bo, G.A., Hockley, D., Tribulo, H., Jofre, F., Tribulo, R., Busso, N., Barth, A.D. and Mapletoft, R.J. 1991. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology* 35:186 (Abstr.).
- Boland, M.P., Goulding, D. and Roche, J.F. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35:5-17.
- Bungartz, L. and Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fert.* 101:583-591.
- Canseco, R.S., Gwazdauskas, F.C., Toole, R.J., Rajamahendran, R., Whittier, W.D. and Vinson, W.E. 1982. A retrospective study on the effects of FSH and Prostaglandin on superovulation responses in dairy cattle. *Virginia J. Sci.* 43:325-332.
- Callejas, S., Alberio, R., Cabodevila, J., Dulout, F., Aller, J. y Teruel, M. 2002. Efecto de la estimulación ovárica con FSH-P en dosis única disuelta en polivinylpirrolidona y la combinación de FSH-P y eCG en dosis reducidas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 22:141-151.
- Callesen, H., Greve, T. and Hyttel, P. 1988. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. *Theriogenology* 30:477-488.
- Demoustier, M., Becker, J., Swalman, P., Closset, J., Gillard, J. and Ectors, F. 1988. Determination of porcine plasma Folltropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30:379-386.
- Eldsen, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E. 1978. Superovulating cows with Follicle Stimulating Hormone and Pregnant Mare's Gonadotrophin. *Theriogenology* 9: 17-26.
- Gonzalez, A., Lussier, J.G., Carruthers, T.D., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J. 1990. Superovulation of beef heifers with Folltropin. A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 33: 519-529.
- Goto, K., Nakanishi, Y., Ohkutsu, S., Ogawa, K., Tasaki, M., Ohta, M., Inohae, S., Tateyama, S. and Kawabata, T. 1987. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese black cattle. *Theriogenology* 27:819-826.
- Goto, K., Ohkutsu, S., Nakanishi, Y., Ogawa, K., Tasaki, M., Ohta, H., Inohae, S., Tateyama, S., Kaewabata, T., Ishi, S., Miyamoto, A., Furusawa, T., UMEZU, M. and Masaki, J. 1988. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. *Theriogenology* 29:615-629.
- Grasso, F., Guilbault, L.A., Roy, G.L., Matton, P. and Lussier, J.G. 1989. The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. *Theriogenology* 31: 199 (Abstr.).
- Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G., Rouillier, P. and Matton, P. 1991. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* 91:81-89.
- Herrier, A., Elsaesser, F. and Niemann, H. 1990. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 33:415-422.
- Hockley, D.K., Bo, G.A., Palasz, A.T., Del Campo, M.R. and Mapletoft, R.J. 1992. Superovu-

- lation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37:224 (Abstr.).
- Kafi, M. and Mc Gowan, M.R. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48:137-157.
- Kasiraj, R., Mutha, M., Rangareddi, N.S. and Misra, A.K. 1992. Superovulatory response in buffaloes following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. *Theriogenology* 37:234 (Abstr.).
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F. and Boland, M.P. 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 1-14.
- Larocca, C., Caorsi, C., Algorta, M., Garcia Pintos, H. y Fernandez, A. 1999. Aplicación de Lutropin-V en la superovulación de vacas donantes de embriones. 3<sup>er</sup> Simposio Internacional de Reproducción Animal (Villa Carlos Paz; Córdoba, Argentina). pag. 218.
- Lindsell, C.E., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26:209-219.
- Lopez-Gatius, F., Camon-Urgel, J. and Angulo-Asensio, E. 1988. Effects of single deep insemination on transferable embryo recovery rates in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 30:877-885.
- Lussier, J.G., Lamothe, P. and Pacholek, X. 1995. Effects of follicular dominance and different Gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* 43:270 (Abstr.).
- Mapletoft, R. 1980. Effect of progestagen ear implant on superovulatory response in the cow. *Theriogenology* 13: 102 (Abstr.).
- Mapletoft, R.J., Gonzalez, A., Lussier, J.G., Murphy, B.D. and Carruthers, T.D. 1988. Superovulation of beef heifers with Folltropin or FSH-P. *Theriogenology* 29:274 (Abstr.).
- Misra, A.K., Krishna, K.G., Rajashwaran, S., Joshi, B.V. and Jaiwal, R.S. 1992. Superovulatory response to single subcutaneous injection of Folltropin in Holstein and Sahiwal cows. *Theriogenology* 37:260.
- Mc Gowan, M.R., Johnson, W., Mapletoft, R.J. and Jochle, W. 1985. Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG). A dose response trial. *Theriogenology* 19:141 (Abstr.).
- Mc Gowan, M.R., Braithwaite, M. and Jochle, W. 1985. Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG): A dose response trial. *Theriogenology* 24: 173-184.
- Richards, M.W., Spitzer, J.C. and Warner, M.B. 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 62: 300-306.
- SAS. 1989. Institute Inc., SAS/STAT<sup>®</sup> User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC, SAS Institute Inc., 846 pp.
- Saumande, J. 1980. Concentration of luteinizing hormone, estradiol 17 beta and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrinol.* 84:425-437.
- Schalleberger, E., Ulrich, P., Mostl, E., Fuchs, S. and Tenhumberg, H. 1994. Induction of superovulation in cattle comparing single subcutaneous and repeated injections with standard intramuscular administration of FSH. *Theriogenology* 41: 290 (Abstr.).
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981. *Biometry*. 2nd. ed. Freeman, W.H. San Francisco.
- Springmann, K., Holtz, W. and Zerobin, K. 1986. Hormonal imbalances after superovulation of beef heifers with PMMSG. *Theriogenology* 25:201 (Abstr.).
- Staigmiller, R.B., Bellows, R.A., Anderson, G.B., Seidel, G.E., Foote, W.D., Menino, A.R. and Wright, R.W. 1992. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology* 37:1091-1099.
- Stringfellow, D.A. y Seidel, S.M. 2000. Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones. Guía de procedimientos e información general para el uso de la tecnología de la transferencia embrionaria con especial énfasis en los procedimientos sanitarios. Tercera Edición, 1111 North Dunlap Avenue, Savoy Illinois, 61874 USA, 181 p.
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G. and Sasamoto, S. 1993. Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 39: 327 (Abstr.).
- Tamboura, D., Chupin, D. and Saumande, J. 1985. Superovulation in the cow: A relationship between progesterone secretion before ovulation and the quality of embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 8:327-334.
- Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Roche, J.F. and

- Boland, M.P. 1993. Superovulatory response in beef heifers following once or twice daily pFSH injection. *Theriogenology* 39:335 (Abstr.).
- Walton, J.S. and Stublins, R.B. 1986. Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows. *Theriogenology* 26:167-177.
- Wubishet, A., Graves, C.N. Spaht, S.L., Kesler, D.J. and Favero, R.J. 1986. Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows. *Theriogenology* 25: 423-427.
- Yadav, M.C., Walton, J.S. and Leslie, K.E. 1986. Plasma concentrations of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology* 26:523-540.
- Zeitoun, M.M., Yassen, A.M., Hassan, A.A., Fathelbab, A.Z., Wise, T.N. and Maurer, R.R. 1988. Superovulation using PMSG and anti-PMSG in beef cows. *Theriogenology* 29: 339 (Abstr.).
- Zeitoun, M.M., Yassen, A.M., Hassan, A.A., Fathelbab, A.Z., Echterkamp, S.E., Wise, T.H. and Maurer, R.R. 1991. Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology* 35: 653-667.