

Efecto de la hormona Folículo-estimulante administrada vía epidural, sobre la respuesta ovárica y el perfil hormonal en vacas Holstein

Effect of Follicle-stimulating hormone administered epidural on ovarian response and hormone profile in Holstein cows

Maria Gabriela Farias-Delgado^{1,3} , Juan José Zambrano¹ , Andrés Santiago Jácome-Aucay² , Jorge Bolívar Dután-Sanango² ,
Gabriela Sofía Garay-Peña² , Luis Eduardo Ayala-Guanga^{2*} 

¹Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Veterinarias. Manabí, Ecuador.

²Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria. Cuenca, Ecuador.

³Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Carrera Agropecuaria, Extensión Chone. Chone, Ecuador.

*Autor para correspondencia: luis.ayala@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

El estudio se realizó en vacas Holstein mestizas, criadas en el trópico alto del Ecuador. Se determinó el efecto de la administración de hormona Folículo-estimulante (FSH), vía epidural en dosis única, sobre la respuesta ovárica, el número de estructuras y embriones transferibles colectados; así como, el perfil hormonal. Se probaron dos tratamientos (T): T1 (n=14; convencional) recibieron 300 mg de FSH repartidas en 8 dosis decrecientes vía intramuscular (IM), los días (d) 4; 5; 6 y 7 del protocolo en la mañana y en la tarde, en T2 (n=14; epidural) se administró 200 mg de FSH en una sola dosis vía epidural en el d 4. En una segunda instancia se determinó la concentración de FSH a las 0; 2; 4; 12; 24; 26; 28; 36; 48; 50; 52; 60; 72; 74; 76 y 84 h del protocolo de superovulación (SOV). El número de folículos antrales (FA) que respondieron a la aplicación de la FSH fue similar ($P>0,05$) entre protocolos (T1=17,9±1,55 folículos; T2=14,3±1,69 folículos); así como también lo fue el tamaño de éstos. Sin embargo, los animales de T2 (5,8±1,83 CLs: cuerpos lúteos) presentaron 2,4 veces menos CLs que los observados en T1 (13,9±1,57 CLs; $P<0,05$). Se obtuvo mayor cantidad de estructuras en T1 (9,4±1,05) que en T2 (4,5±1,29) e igual sucedió con los embriones transferibles. La FSH alcanzó los valores más altos a las 4 h y mantuvo concentraciones similares durante las primeras 50 h. Luego la concentración en T2 disminuyó a valores basales inferiores a los observados en T1. Se concluye que 200 mg de FSH aplicados por vía epidural provocaron una superestimulación similar al protocolo convencional; sin embargo, el número de ovulaciones y de embriones transferibles obtenidos fueron dos veces menos que los observados en T1.

Palabras clave: Hormona folículo-estimulante; epidural; vacas Holstein; superovulación

ABSTRACT

The study was carried out in crossbred Holstein cows, raised in the high tropics of Ecuador. The effect of single dose epidural follicle-stimulating hormone (FSH) administration on ovarian response, structure number and collected transferable embryos was determined; as well as the hormonal profile. Two treatments (T) were tested: T1 (n=14; conventional) received 300 mg of FSH divided into 8 decreasing doses intramuscular (IM), on days (d) 4, 5, 6 and 7 of the protocol in the morning and in the afternoon, in T2 (n=14; epidural) 200 mg of FSH was administered in a single epidural dose on d 4. In a second instance, FSH levels were determined at 0, 2, 4, 12, 24, 26, 28, 36, 48, 50, 52, 60, 72, 74, 76 and 84 h of the superovulation (SOV) protocol. The number of antral follicles (AF) that responded to the application of FSH was similar ($P>0.05$) in the two Treatments (T1=17.9±1.55 follicles; T2=14.3±1.69 follicles); as well as their size. However, the animals of T2 (5.8±1.83 CLs: corpus luteum) presented 2.4 times fewer CLs than those observed in T1 (13.9±1.57 CLs), with a statistical difference ($P<0.05$). A greater number of structures was obtained in T1 (9.4±1.05) than T2 (4.5±1.29), and the same occurred with the transferable embryos. FSH reached the highest values at 4 h and remained at similar concentration throughout the first 50 h. Then the concentration in T2 decreased to basal values lower than those observed in T1. In conclusion 200 mg of FSH applied via epidural causes an superstimulation similar to the conventional protocol: however, the number of ovulations and transferable embryos obtained were two times less than those observed in T1.

Key words: Follicle-stimulating hormone; epidural; cows Holstein; superovulation

INTRODUCCIÓN

La superovulación (SOV) y la transferencia de embriones (TE) son herramientas que se utilizan para multiplicar animales de alto valor genético [1]. En los protocolos de SOV comúnmente se utiliza la hormona folículo-estimulante (FSH), gonadotropina que impulsa el crecimiento y desarrollo de varios folículos secundarios hasta el estadio de dominancia [2], característica que permite obtener mayor número de ovocitos listos para ser fecundados y por ende, embriones a ser colectados [3]. Sin embargo, la vida media de 2 h de la FSH genera la necesidad de administrar esta hormona dos veces al día (d) (cada 12 h), por 4 d consecutivos como mínimo [4]. Por lo tanto, es necesario llevar a la donadora 8 veces a la manga de sujeción (Lux, Campo, Ecuador), lo cual provoca estrés y esto a su vez reduce la respuesta superovulatoria; además, la administración consecutiva de la hormona puede llevar a errores en la dosificación del producto [5].

Varios estudios han buscado reducir el número de aplicaciones de FSH mediante la administración intramuscular (IM) o subcutánea (SC) de esta gonadotropina disuelta en agentes de liberación lenta, como la polivinilpirrolidona [6] e hidróxido de aluminio en gel (AH-gel) en bovinos (*Bos taurus*) [5]. Pero estos diluyentes mezclados con la FSH producen una solución viscosa difícil de preparar y homogenizar; además, estos agentes de liberación lenta incrementan el costo final del protocolo.

En el año 2018 se describió que la aplicación de una dosis de FSH por vía epidural (400 mg) provocó estimulación ovárica en bovinos, generando resultados alentadores en cuanto a número de embriones colectados, que fueron similares a los obtenidos al aplicar múltiples dosis de FSH por vía IM [7]. La liberación lenta de la FSH en la circulación periférica se consiguió gracias a la cantidad de grasa que contiene el conducto epidural del ganado bovino con una condición corporal (CC) alta (> 3 CC).

Sin embargo, en un trabajo reciente en ganado bovino, con una CC entre 3-3,5, la administración de 400 mg de FSH vía epidural en una sola dosis, produjo menos folículos mayores a 9 mm comparado con los animales que recibieron FSH por vía IM (8 dosis), esto influyó directamente en el número de ovulaciones, estructuras y embriones transferibles colectados en las donadoras que recibieron la FSH vía epidural [8], probablemente como consecuencia de que esta vía de administración (epidural) no permitió mantener niveles altos de la hormona al menos por 72 h, tiempo mínimo requerido para que los folículos puedan proliferar, crecer y adquirir capacidad ovulatoria [9]. Estos resultados contradictorios crean la necesidad de valorar la concentración de FSH post-administración vía epidural de la hormona en donadoras de tendencia lechera.

El estudio determinó el efecto de la administración de 200 mg de hormona FSH vía epidural en dosis única, sobre la respuesta ovárica y el perfil hormonal en vacas Holstein mestizas, criadas en el trópico alto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y granja

Veintiocho vacas multiparas de genotipo Holstein mestizo de dos granjas comerciales, ubicadas sobre los 2.500 metros sobre el nivel del mar, en el trópico alto del Ecuador, fueron seleccionadas y divididas al azar en dos tratamientos (T): T1=Convencional (n=14) y T2=Epidural (n=14). Las vacas presentaron pesos promedios similares de 565,9 ± 19,68 y 591,2 ± 15,43 kg, respectivamente, CC de 2,8 ± 0,05 (T1) y 2,7 ± 0,06 (T2) en escala de 1-5, de acuerdo a lo

determinado por Hoedemaker y col. [10], con un recuento de folículos antrales (RFA) de 19,3 ± 0,75 en T1 y 17,9 ± 1,55 en T2. Tenían una edad promedio de 6,4 ± 0,49 (T1) y 6,5 ± 0,41 años (T2), con 3,6 ± 0,32 partos (T1) y 3,5 ± 0,29 partos (T2) y una producción promedio de 22,9 ± 1,45 y 22,35 ± 1,43 kg de leche, respectivamente. Al momento de la selección de donantes, éstas fueron evaluadas mediante palpación transrectal de órganos reproductivos para corroborar su estado cíclico, la morfología cervical adecuada para permitir el paso del embrión a través del catéter de recolección (determinado al pasar un catéter de transferencia en cada donante, a través de su cérvix), y la ausencia de patologías en el tracto reproductivo [11].

En el segundo experimento se utilizaron 8 de las 21 vacas Holstein mestizas utilizadas en el primer ensayo, estas pertenecían a la granja experimental de la Universidad de Cuenca, Ecuador. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: tratamiento convencional (T1) y tratamiento epidural (T2). Con una edad media de 6,6 ± 0,81 años (T1) y 6,5 ± 0,64 años (T2), CC promedio de 2,9 ± 0,08 (T1) y 2,8 ± 0,06. El peso corporal fue de 647,5 ± 43,84 kg (T1) y 641,5 ± 55,93 kg (T2), y la producción láctea promedio 19,3 ± 0,66 kg (T1) y 19,2 ± 0,64 kg (T2). Durante la realización del estudio se tuvo presente la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7,8 "Utilización de animales en la investigación y educación", de la Organización Mundial de Sanidad Animal [12].

Diseño experimental

La investigación fue de tipo experimental, y en un primer ensayo se valoró el efecto de la administración de FSH por vía intramuscular (300 mg) repartidos en 8 dosis (T1) y la vía epidural (200 mg) en una sola dosis (T2), sobre la respuesta al protocolo de SOV. En el segundo ensayo se comparó la concentración plasmática media de FSH en los d 4; 5; 6 y 7 del protocolo, luego de administrar FSH por vía intramuscular (T1) y vía epidural (T2).

Estadística

Los datos fueron procesados en Excel y analizados en el programa estadístico SPSS versión 25. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk. La comparación de la concentración de FSH, el análisis del RFA (d 4) y la respuesta a la superovulación (d 9), ovulación (CL=d 16) y el número de embriones obtenidos (d 16) del protocolo fue realizada mediante la prueba de t de Student.

Protocolo convencional (T1)

Los 14 animales de T1 recibieron 300 mg de FSH repartidas en 8 dosis decrecientes en los d 4; 5; 6 y 7 del protocolo de SOV. El d 0 (06h00) se colocó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR[®]; 1,9 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol[®]; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía IM y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona[®]; ERMA, Quito, Ecuador). A partir del d 4 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00), las donadoras recibieron dosis decrecientes de FSH (Folltropin-V[®]; Vetoquinol, Québec, Canada) por cuatro d (60; 60; 40; 40; 30; 30; 20; 20 mg), tal como se indica en FIG. 1. El d 6 en la mañana y la tarde se aplicaron 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse[®]; Zoetis, Lima, Perú), y el d 7 por la mañana se retiró el implante. El d 8 se detectó el celo por observación directa con ayuda de un parche indicador de estro (Estroprotect[™], EUA), en la tarde se administró una dosis de 0,25 mg de gonadorelina (GnRH[®], MSD, Nueva York, EUA). En la mañana del d 9 se realizó la primera inseminación artificial (IA) y 12 h después se efectuó la segunda IA.

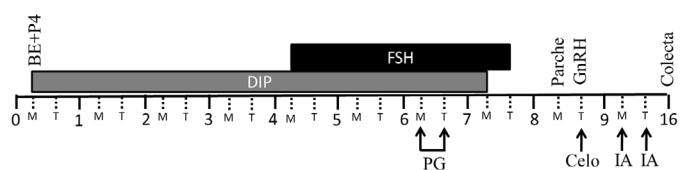


FIGURA 1. Protocolo de superovulación convencional (T1). BE: Benzoato de estradiol. P4: Progesterona inyectable. DIP: Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH: Hormona folículo-estimulante. PG: Prostaglandina. Parche: Parche detector de celo. GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina. IA: inseminación artificial. Colecta: colecta de embriones

Protocolo epidural (T2)

Las donadoras del protocolo epidural recibieron el d 0 a las 06h00 un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR®; 1,38 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía IM, y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona®; ERMA, Quito, Ecuador). En la mañana (06h00) del d 4 los animales recibieron 200 mg de FSH (Folltropin-V®, Vetoquinol, Québec, Canada) diluidos en 5 mL de solución salina estéril por vía epidural (dosis única), entre la última vértebra sacra y la primera coccígea. El d 6 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00) se aplicó una dosis de 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Lima, Perú). El d 7 en la mañana se retiró el implante de progesterona. Al d siguiente (d 8), a las 06h00 se colocó un parche detector de celo (Estroprotect™, EUA) y en la tarde se aplicaron 0,25 mg de gonadorelina (GnRH®, MSD, Nueva York, EUA). El d 9 en la mañana se realizó la primera IA y en la tarde la segunda IA, la colecta de los embriones se ejecutó en el d 16 del protocolo (FIG. 2).

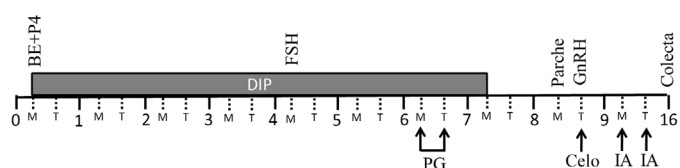


FIGURA 2. Protocolo de superovulación epidural (T2). BE: Benzoato de estradiol. P4: Progesterona inyectable. DIP: Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH: Hormona folículo-estimulante (200 mg). PG: Prostaglandina. Parche: Parche detector de celo. GnRH: Gonadotropina. IA: inseminación artificial. Colecta: colecta de embriones

Recuento de folículos antrales (d 4), valoración de la respuesta al proceso de SOV (d 9) y evaluación del número de cuerpos lúteos (d 16)

El RFA >4 mm fue realizado mediante valoración endorrectal con un ecógrafo (Aloka ProSound 2®, Tokyo-Japón) provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz, el d 4 del protocolo de superovulación (SOV). La exploración de los ovarios se realizó según lo describió Ayala y col. [13] que brevemente consistió en un barrido latero-medial, dorso-ventral y cráneo-caudal, primero del ovario derecho y luego el izquierdo. Las valoraciones ecográficas fueron realizadas siempre por el mismo técnico.

Para determinar la respuesta superovulatoria se contó el número de FA mayores a 8 mm en cada uno de los ovarios (d 9), mediante la técnica

indicada para el RFA. La respuesta ovulatoria se estableció mediante el recuento de cuerpos lúteos (CLs) presentes en los dos ovarios en el d 16 del protocolo, luego del proceso de colecta de los embriones.

Colecta de embriones

Siete d después de la primera IA (d 16), las donadoras fueron colocadas en una manga, teniendo presente las normas de bioseguridad, tanto para el operador como para el animal. Se realizó asepsia del área vulvar y perineal. Para la insensibilización y tranquilización, se utilizó una mezcla de 4 mL de clorhidrato de lidocaína al 2%, (Lidocaine™, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina) y 0,4 mL de xilacina al 2% (Xilacina20, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina), aplicada por vía epidural. Los embriones fueron colectados mediante técnica no quirúrgica, con un sistema de circuito abierto con flujo continuo [2]. Se utilizó el medio de lavado comercial (ViGRO™, Vetoquinol, Québec, Canada) y los embriones se colectaron en un filtro EmCon de 75 µm, (Arbiatech, Culiacán, México). El grado de desarrollo y calidad de los embriones fue determinado en base a los parámetros establecidos por la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS) [14].

Valoración de la concentración de FSH plasmática

Al inicio del protocolo se colocó un catéter intravenoso para animales grandes en la vena yugular de las vacas de T1 y T2, que facilitó la toma de las muestras de sangre (5 mL) en tubos Vacutainer con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA, Vacutainer®). El muestreo se inició a las 06h00 del d 4 considerándose ésta como la hora 0, luego se tomaron muestras a las 2; 4; 12; 24; 26; 28; 36; 48; 50; 52; 60; 72; 74; 76 y 84 h (TABLA I). Las muestras fueron colocadas en un cooler (Chiller, 16 QT, Coleman®, EUA) con hielo (5°C) y se transportaron al laboratorio para ser centrifugadas (Hettich, Micro 200, Alemania) a 3.000 gravedades (G) × 10 min. El sobrenadante fue colectado y congelado a -20°C hasta su análisis (Congelador SMC, CG11HB, China).

TABLA I
Protocolo de toma de muestras de sangre

D 4		D 5		D 6		D 7	
Hora	Muestra	Hora	Muestra	Hora	Muestra	Hora	Muestra
06:00	0h	06:00	24h	06:00	48h	06:00	72h
08:00	2h	08:00	26h	08:00	50h	08:00	74h
10:00	4h	10:00	28h	10:00	52h	10:00	76h
18:00	12h	18:00	36h	18:00	60h	18:00	84h

La determinación de la concentración de FSH se realizó por inmunoensayo enzimático competitivo (Bovine follicle-stimulating hormone (FSH) ELISA Kit). La dosis mínima detectable de FSH bovina según el fabricante fue inferior a 2 miliunidades internacionales·mL⁻¹ (mUI·mL⁻¹). Precisión intra-ensayo: CV%<15 %, precisión entre ensayos: CV%<15 %.

Debido a que la mayoría de los trabajos publicados sobre la concentración de FSH en la especie bovina se describe en ng·mL⁻¹, las concentraciones obtenidas en mUI·mL⁻¹ en el presente estudio fueron transformadas a ng·mL⁻¹, considerando que 1 mUI·mL⁻¹ equivale a 0,047 ng·mL⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de folículos antrales el d del reinicio de la onda folicular (d 4)

El número de FA menores a 4 mm valorado el d del inicio de la onda folicular (d 4) fue similar ($P>0,05$) en T1 ($19,3\pm 0,75$) y T2 ($19,9\pm 0,62$; FIG. 3A), lo cual permitió iniciar el estudio en condiciones similares en cuanto al RFA en los dos T. Los resultados del RFA observados fueron similares al reportado previamente en vacas Holstein mestizas alimentadas al pastoreo en el trópico alto ecuatoriano ($17,26\pm 0,38$ folículos [15], o el descrito para esta raza ($18,5\pm 9,0$ folículos) en zonas altas de países de cuatro estaciones [16].

Respuesta al protocolo de superovulación (d 9)

Al valorar mediante ecografía el número de folículos que respondieron a la aplicación de la FSH en el d 9 del protocolo, se determinó que el 92,75 % de FA en T1 ($17,9\pm 1,55$ folículos) y el 71,86 % en T2 ($14,3\pm 1,69$ folículos; FIG. 3B), respondieron a la aplicación de la gonadotropina, sin diferencia estadística ($P>0,05$) entre grupos; además, el tamaño de los folículos fue mayor a 8 mm en los dos T (T1= $10,92\pm 0,41$ mm; T2= $10,15\pm 0,50$ mm), característica necesaria para que el folículo obtenga capacidad para ovular ($11,6\pm 0,5$ mm) en vacas de raza Holstein [17].

El número de folículos observado el d 9 del protocolo fue similar a los reportados por Sakaguchi y col. [7], quienes describieron $18,3\pm 7,5$ folículos que respondieron a la SOV al aplicar 8 dosis de FSH vía IM y $15,4\pm 6,0$ folículos al administrar una dosis de FHS vía epidural, sin presentar diferencia estadística entre ($P>0,05$) grupos, estos animales eran de predominio cárnico con una condición corporal mayor a 3 puntos en escala de 1 a 5. La evidencia científica señala que una buena CC produce mayor depósito de grasa en el canal vertebral, lo cual contribuye a un movimiento más lento y sostenido de la FSH hacia la circulación periférica [18]. Sin embargo, en ganado lechero se observó que la aplicación de FSH IM produce mayor respuesta a la SOV ($17,1\pm 1,5$ folículos) comparado con animales que recibieron FSH vía

epidural ($8,5\pm 1,5$ folículos) [8]; esto podría estar ligado a una menor CC ($2,75$ a 3) que este tipo de ganado presentan en la fase de producción láctea, factor que reduce la respuesta superovulatoria [19]. En estos casos, los folículos preovulatorios normalmente alcanzaron tamaños menores a 10 mm, lo cual no es suficiente para que el folículo adquiera capacidad ovulatoria en los bovinos de leche [20]. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente estudio. Por lo tanto, se considera que la aplicación de 200 mg de FSH por vía epidural (T2) en este estudio, fue suficiente para estimular el crecimiento de los folículos a tamaños similares al tratamiento 1 ($10,15\pm 0,50$ y $10,92\pm 0,41$ mm, respectivamente), sin diferencias estadísticas ($P>0,05$) entre tratamientos (FIG. 3C).

Recuento de cuerpos lúteos y folículos que no ovularon

Los animales que recibieron FSH vía epidural presentaron 2,1 veces más folículos ($8,07\pm 1,13$) que no llegaron a ovular (FNO) comparado con las vacas del tratamiento convencional ($3,71\pm 0,9$; $P<0,05$; FIG. 4C). Esto generó que los animales de T2 ($5,8\pm 1,83$ CLs) presentaran 2,4 veces menos CLs que los observados en T1 ($13,9\pm 1,57$ CLs) con diferencia estadística entre grupos (FIG. 4A). Sin embargo, el tamaño de los CLs en los dos T (T1= $15,4\pm 0,85$ mm y T2= $16,7\pm 1,21$ mm) fue similar ($P>0,05$; FIG. 4B). Se especula que la disminución de ovulaciones y por ende el número de CLs en los animales que recibieron una dosis de hormona vía epidural, estuvo relacionado con el incremento rápido de FSH por un periodo corto de tiempo al inicio del protocolo (2-4 h), seguido de una disminución brusca a las 52 h, lo cual impidió que los folículos contaran con niveles adecuados de FSH en la etapa final de maduración y adquisición de capacidad ovulatoria [21]. Estos resultados guardan concordancia con los descritos por Chumchai y col. [8], quienes aplicaron 400 mg de FSH vía epidural y 400 mg vía IM y observaron que el tratamiento convencional presentó más CLs $15,3\pm 1,0$ que los animales que recibieron FSH vía epidural ($8,5\pm 1,3$ CLs).

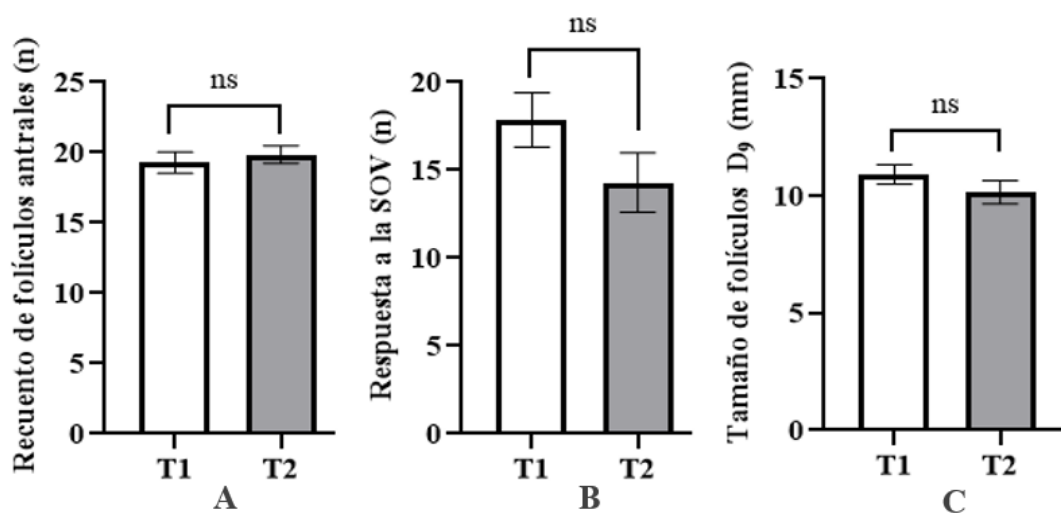


FIGURA 3. Media y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA) en el d 4 del protocolo de superovulación (Panel A). Folículos que respondieron al protocolo de SOV en el d 9 (Panel B). Tamaño promedio de los folículos que respondieron a la SOV (Panel C). Prueba de t de Student 5%

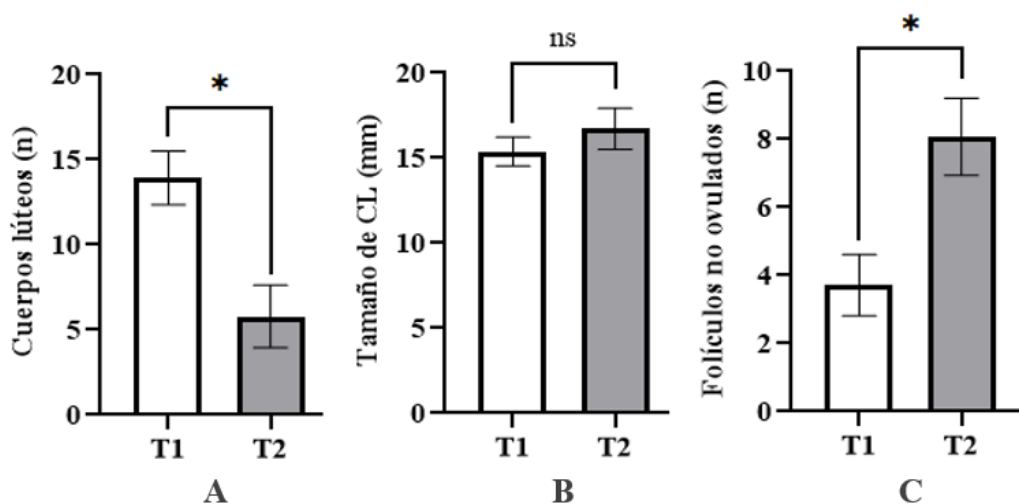


FIGURA 4. Media y error estándar del número de CLs (Panel A). Tamaño de CLs (Panel B). Número de folículos que no llegaron a ovular (Panel C). Valorado el d 16 del protocolo. Prueba de t de Student 5%

Número de embriones colectados

En T1 se recuperaron $9,4 \pm 1,05$ estructuras, y de éstas, el 70,2 % fueron embriones transferibles y 27,8 % ovocitos no fecundados (UFO's), difiriendo estadísticamente ($P < 0,05$) de T2, donde se colectaron $4,5 \pm 1,29$ estructuras, de las cuales el 57,8 % fueron embriones transferibles y el 42,2 % UFO's (FIG. 5). El número de estructuras colectadas en el presente estudio en T1 y T2 fueron similar a los obtenidos en donadoras Holstein [8], donde se aplicaron 400 mg de FHS vía convencional ($8,6 \pm 1,4$ estructuras) y 400 mg vía epidural ($4,9 \pm 2,0$ estructuras); sin embargo, los autores describieron que no existió diferencia estadística entre sus dos T, lo cual difiere de los resultados obtenidos por nosotros en T1 y T2. Esta controversia podría estar relacionada con el número de animales utilizados en el presente estudio y su CC al momento de la SOV ($14 \times T$; $2,9$, respectivamente) con respecto al trabajo realizado por Chumchai y col. [8] que fueron 8

animales por T y su CC fue de 3,5 al momento de la SOV. Sin embargo, Chumchai y col. [8] describieron que el porcentaje de embriones transferibles colectados en los animales que recibieron FSH en forma convencional (66,3 %) fue superior al porcentaje de embriones recuperado en los animales que recibieron FSH vía epidural (22,4 %), con diferencia estadística entre T, lo cual coincide con los resultados obtenidos (FIG. 5B).

En un trabajo realizado en ganado de predominio cárnico se describió que, la administración de FSH por vía IM (tratamiento convencional) y por vía epidural permitió obtener un número de estructuras ($18,3 \pm 5,4$; $10,9 \pm 7,6$, respectivamente) y blastocistos transferibles ($9,0 \pm 6,0$ vs $4,7 \pm 3,5$) similares estadísticamente [7], lo cual difiere de los presentes resultados (FIG. 5B y 5C). Probablemente, estaría relacionada con la raza y tendencia productiva de los animales utilizados en los dos experimentos.

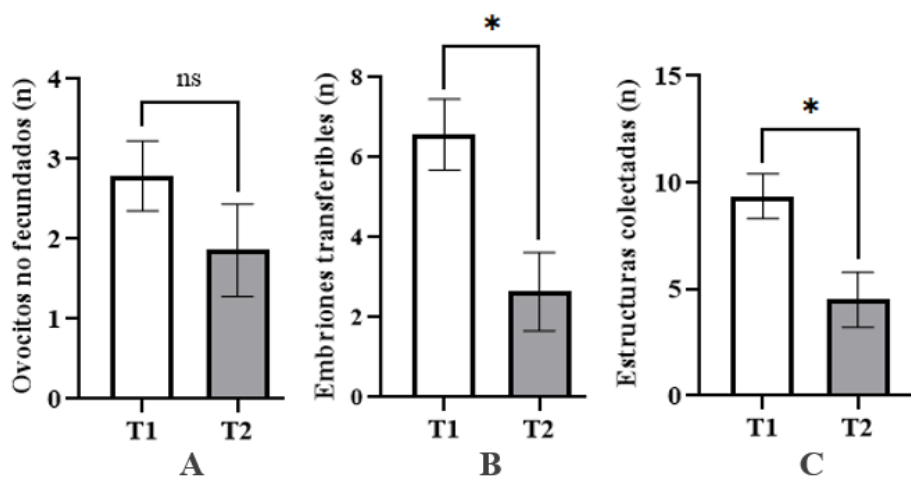


FIGURA 5. Media y error estándar del número de ovocitos no fecundados (UFOs; Panel A). Número de embriones transferibles (Panel B). Número de estructuras colectadas (Panel C). Valorado el d 16 del protocolo. Prueba de t de Student 5%

Concentración de la hormona Folículo-estimulante

La muestra tomada a las 0 h del d 4 (06h00 am), antes de aplicar la primera dosis de FSH, mostró una concentración similar ($P>0,05$) en los dos T: T1 ($1,41 \pm 0,21 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y T2 ($1,26 \pm 0,09 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Estos valores son considerados basales ($<1,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) en la especie bovina [22].

En la segunda valoración del d 4 (hora 2), la concentración de la FSH se elevó a $20,74 \pm 9,74 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (T1) y en T2 a $25,46 \pm 6,15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin diferencia entre tratamientos ($P>0,05$). Este incremento es concordante con lo descrito en otro trabajo dos h post aplicación de FSH vía IM en vacas Holstein ($>25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); sin embargo, los animales que recibieron FHS vía epidural, si bien incrementaron la concentración de esta hormona ($>10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), el aumento fue menor [8]. Está descrito que un protocolo ideal de superovulación requiere aumentar la FSH circulante a concentraciones superiores a las observadas antes de la aparición de una onda folicular ($2,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y mantenerse por al menos por 72 h para que el crecimiento de los folículos sea continuo y puedan alcanzar el tamaño mínimo de 8 mm para adquirir capacidad para ovular [23], este principio se cumplió en los dos T a partir de las 2h post-administración de la FSH.

El valor máximo de la FSH en T1 (convencional) fue observado a las 4 h post aplicación de la hormona ($28,65 \pm 7,55 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), sin diferencia estadística con T2 ($23,05 \pm 9,26 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). A partir de este momento, la caída de la concentración de la FSH en ambos T fue sostenida y continua hasta la cuarta toma (12 h: $13,68 \pm 8,13 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $18,47 \pm 4,17 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente), llegando al valor mínimo a las 24 h en T1 ($10,81 \pm 8,22 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Sin embargo, en T2 ($20,80 \pm 10,06 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), la

concentración de la FSH a las 24h fue el doble de la observada en T1, indicando que la vía epidural permite mantener una liberación lenta y constante de la FSH comparada con la administración IM [24]. Esto probablemente se deba al contenido de grasa que poseen el espacio vertebral; así como a la cantidad y disponibilidad de venas epidurales y a la solubilidad de la sustancia aplicada [18].

En el d 5 luego de la administración de la FSH en los animales de T1, la concentración de esta hormona mostró valores similares a los observados en el cuarto d, es decir, se elevó hasta 4 h post-administración de la FSH, para luego disminuir paulatinamente. En los animales de T2 la concentración de FSH en el d 5 mostró valores más estables que los observados en T1 sin diferencia ($P>0,05$) entre T.

Sin embargo, en el sexto d del muestreo a las 52 h, se determinó 2,3 veces menos hormona en T2 ($8,87 \pm 1,77 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) que en T1 ($20,84 \pm 3,23 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), con diferencia estadística entre T ($P<0,05$). Estos resultados demuestran que la vía epidural permitió mantener por 50 h concentraciones de FSH similares a las observadas en los animales de T1 y que a partir de las 52h la concentración de FSH en los animales de T2 bajó rápidamente a niveles basales, mientras que en T1 se mantuvieron elevados. Probablemente, la baja concentración de FSH a las 52h del protocolo de SOV contribuyó para que un gran número de folículos de las donadoras de T2 obtuvieran capacidad para ovular [23], factor que redujo el número de FA que llegaron a ovular, provocando que se obtuvieran menor número de estructuras y embriones transferibles el d de la colecta.+

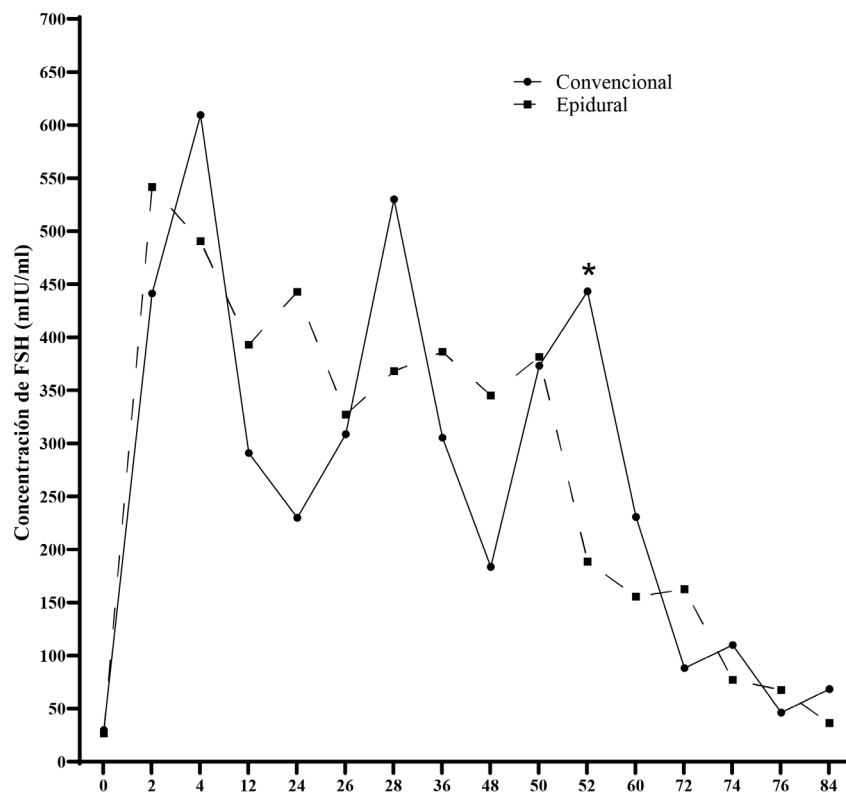


FIGURA 6. Concentración de FSH valorada a partir de las 06h00 del d 4 del protocolo de SOV, en la siguiente secuencia: h= 0; 2; 4; 12; 24; 26; 28; 36; 48; 50; 52; 60; 72; 74; 76; 84; T1 (convencional): línea negra continua. T2(epidural): línea entrecortada. *: Diferencia estadística al 5%

CONCLUSIONES

La administración de 200 mg de hormona foliculo-estimulante en una sola dosis por vía epidural produce respuesta superovulatoria satisfactoria en vacas Holstein mestizas, criadas en el trópico alto, gracias a la alta concentración de FHS presente en las primeras 50 h del protocolo. Sin embargo, la caída abrupta de la hormona a partir de las 52 h genera un bajo porcentaje de ovulación y por consiguiente un menor número de embriones transferibles colectados.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se recomienda valorar dosis más altas de FSH aplicadas por vía epidural, en busca de mejorar el porcentaje de ovulación y embriones colectados en un protocolo de SOV. Otra alternativa sería probar la administración de una dosis de refuerzo vía intramuscular a las 52 h para mantener niveles altos en la fase final del protocolo de SOV. Finalmente, se podría valorar diferentes dosis de FSH vía epidural, para estimular el ovario previo a la aspiración ecoguiada (OPU).

Conflicto de interés

Los autores confirman que no existen conflictos en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenol.* 2014; 81(1):152-169.
- [2] Bautista VM, Jiménez SP, Meza CD, Ramos TI, Toledo JR. FSH in bovine superovulation. *Rev. Bionatura.* 2019; 4(1):812-816.
- [3] Becaluba F. Factores que afectan la superovulación en bovinos. *Sitio Argentino Prod. Anim.* [Internet] 2007 [Consultado 3 Mar 2023]; 18 p. Disponible en: <https://bit.ly/3NIPPTZ>.
- [4] Bó G, Mapletoft R. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenol.* 2014; 81(1):38-48.
- [5] Kimura K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *J. Reprod. Dev.* 2016; 62:423-429.
- [6] Ratsiri T, Ratchamak R, Chumchai R, Boonkum W, Vongpralub T, Chankitisakul V. A novel route of follicle-stimulating hormone administration with a split-single ischio-rectal fossa in Thai-holstein crossbred superovulation programs under heat stress conditions. *Anim. Sci. J.* 2021; 92(1):e13574.
- [7] Sakaguchi K, Ideta A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S, Konishi M. Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for *in vivo* and *in vitro* embryo production in Japanese black cows. *J. Reprod. Dev.* 2018; 64(5):451-455.
- [8] Chumchai R, Ratsiri T, Ratchamak R, Vongpralub T, Boonkum W, Chankitisakul V. Ovarian responses and FSH profiles at superovulation with a single epidural administration of gonadotropin in the Thai-Holstein crossbreed. *Anim. Reprod.* 2021; 18(3):e20210053.
- [9] Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pöhland R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002; 42(6): 587-99.
- [10] Hoedemaker M, Prange D, Gundelach Y. Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 2009; 44(2):167-173.
- [11] Naranjo F, Montiel F, Canseco R, Ahuja-Aguirre C. Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and an increased eCG dose. *Theriogenol.* 2020; 141:168-172.
- [12] Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código sanitario para los animales terrestres. 19na. ed. 2015; 357 p.
- [13] Ayala L, Pesantez JL, Rodas ER, Dután J, Calle G, Murillo Y, Vázquez J, Nieto P, Ortega V, Samaniego J. Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Arch. Zoot.* 2019; 68(262):184-190.
- [14] Stringfellow DA, Givens MD. International Embryo Transfer Society (IETS). Embryo classification. En: *Manual of the International embryo transfer society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary precautions.* 4th. ed. 2010; p 25-38.
- [15] Ayala L, Astiz S, Dután J, Samaniego J, López R, Perea F, Hernández-Fonseca H, Pesántez JL. Relationship between the concentration of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in pasture-managed Holstein cows in the high tropics. *J. Dairy Res.* 2022; 89(1):60-64.
- [16] Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012; 95(5):2355-2361.
- [17] Sartori R, Gimenes L, Monteiro P, Melo M, Baruselli PS, Bastos M. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenol.* 2016; 86(1): 32-40.
- [18] Lee I, Yamagishi N, Oboshi K, Yamada H. Effect of epidural fat on xylazine-induced dorsolumbar epidural analgesia in cattle. *Vet. J.* 2003; 165(3):330-332.
- [19] Bó G, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. Superovulatory response to a single subcutaneous ejection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenol.* 1994; 42:963-975.
- [20] López-Gatius F, Llobera-Balcells M, Palacín-Chauri RJ, García-Ispuerto I, Hunter RHF. Follicular size threshold for ovulation reassessed. Insights from multiple ovulating dairy cows. *Anim.* 2022; 12(9):1-9.
- [21] Mogollón-Waltero EM, Burla-Dias JA. Superovulación de hembras bovinas: Alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus.* 2013; 9(18):37-47.
- [22] Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2013; 26(4):488-500.
- [23] Bó G, Mapletoft RJ. Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenol.* 2020; 150:353-359.
- [24] Bernards CM. Understanding the physiology and pharmacology of epidural and intrathecal opioids. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2002; 16(4):489-505.