

La adición de 400 UI de gonadotropina coriónica equina al protocolo de sincronización de estro ‘J-synch’ provoca codominancia folicular en vaquillas Holstein Friesian

Evelin, Lojano¹, Ángel Sibri¹; Esteban Muñoz-Léon²; Diego A. Galarza^{1,2,*}

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

² Centro latinoamericano de formación en especies mayores y menores – CLAFEM, Cuenca, Ecuador

MVZ, Evelin Lojano, evelin.lojano@ucuenca.edu.ec MVZ., Ángel Sibri, angel.sibrim89@ucuenca.edu.ec MVZ. Mgs. Esteban Muñoz-León, emunozleon2@gmail.com Dr. MVZ. Ph.D. Diego A. Galarza, andres.galarza@ucuenca.edu.ec *

*Autor de correspondencia: Diego A. Galarza (andres.galarza@ucuenca.edu.ec)

RESUMEN

Esta investigación evaluó la influencia de la gonadotropina coriónica equina (eCG) aplicada al día 6 del protocolo J-synch, sobre la respuesta folicular y la concentración de la hormona luteinizante (LH) en vaquillas lecheras Holstein Friesian del trópico alto ecuatoriano. Cuatro vaquillas de 16 a 24 meses de edad, clínicamente sanas y cíclicas fueron sometidas a un protocolo de sincronización de celo “J-synch”: día 0, aplicación de benzoato de estradiol (BE, 2 mg) + dispositivo intravaginal de progesterona (DIV-P4; 0,5 g); día 6, remoción del DIV-P4 + prostaglandina F2 alfa (PGF2 α ; 500 μ g); y día 9 gonadorelina (GnRH, 100 μ g). Después de 30 días de finalizar el protocolo, las vaquillas fueron sometidas al mismo protocolo J-synch + eCG (400 UI) en el día 6 del protocolo, (en la luteólisis). En ambas etapas se evaluaron ecográficamente los folículos dominantes (mm), la ovulación (%) y cuerpos hemorrágicos (mm) a partir del día 6 hasta el día 10. Además, a las 50, 55, 60 y 65 h a partir de la remoción del DIV-P4 se evaluó la concentración sérica de LH. Los resultados mostraron que solo en una vaquilla (2), en ambos protocolos (J-synch y J-synch + eCG), se registró un pico de LH entre 50 h (3,74 mUI/ml) y 55 h (3,88 mUI/ml) y ovuló alrededor de las 72 h después de la remoción del DIV-P4, (día 9). Sin embargo, en las otras vaquillas (No. 1, 3 y 4), el protocolo J-synch + 400

UI de eCG provocó codominancia folicular y ovulaciones dobles sin registrar picos de LH entre 50 y 65 horas después de la luteólisis inducida. Por lo tanto, esta investigación concluye que la adición de 400 UI de eCG al día 6 del protocolo J-synch provocó codominancia folicular y ovulaciones dobles en vaquillas Holstein Friesian.

Palabras clave: eCG, vaquillas, LH, J-synch, ovulación

INTRODUCCIÓN

Los actuales protocolos de cruzamiento y mejora genética del ganado bovino de leche se centran en incrementar la fertilidad (Colazo y Mapletoft, 2014). Para lograr este objetivo, es indispensable el uso de biotecnologías reproductivas aplicadas en el campo, como la inseminación artificial (IA) convencional o a tiempo fijo (IATF). La IATF ha permitido propagar el material genético de

animales fenotípicamente y genotípicamente valiosos (Bhoraniya et al., 2012). Sin embargo, el uso de la IATF sigue siendo un desafío biotecnológico debido a las bajas tasas de preñez, baja respuesta ovulatoria de la vaca, diferente respuesta de las hormonas utilizadas para inducir la ovulación (Meléndez et al., 2006).

Para aumentar la tasa de ovulación y la tasa de preñez, los protocolos actuales de IATF tienden a prolongar el tiempo de proestro (desde la aplicación de la prostaglandina F2 alfa [PGF2 α] y remoción del dispositivo intravaginal de progesterona [DIV-P4]) hasta la IA. Se ha usado la gonadotropina coriónica equina (eCG), una hormona de origen equino, entre 400 a 500 UI de eCG, vacas lecheras y ha logrado obtener menor cantidad de folículos atrésicos y un mejor desarrollo del folículo dominante. Al mejorar el folículo dominante, la eCG mejora también la calidad y funcionalidad del CL (mayor tamaño y producción de P4).

Nuevos y novedosos protocolos de IATF han sido diseñado con la inclusión de la eCG. El protocolo "J-synch" es un protocolo de IATF innovador que utiliza eCG al momento de la luteólisis inducida y ha demostrado resultados promisorios en cuanto a fertilidad en vaquillas de carne, como Pardo Suizo x Bos indicus, Braford y Angus. El protocolo J-synch comienza con la sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de BE y DIV-P4 durante 6 días, seguido de PGF2 α (500 μ g) + eCG (400 UI). A las 60 a 72 horas después de la inducción de la luteólisis, se realiza la IATF con una dosis reducida de GnRH (100 μ g de gonadorelina) (Bó et al., 2019; Mion et al., 2019; Yáñez-Ávalos et al., 2018). Hasta donde nosotros sabemos, el protocolo J-synch + eCG no ha sido validado en vaquillas Holstein Friesian en condiciones de pastoreo en el trópico del altiplano ecuatoriano.

Basándonos en toda la información mencionada anteriormente esta investigación evaluó el efecto de la eCG aplicada al momento de la luteólisis y remoción del DIV-P4 sobre la respuesta folicular y concentración de LH en vaquillas lecheras Holstein Friesian de la sierra sur oriental ecuatoriana, sincronizadas con el protocolo 'J-synch'

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en la granja "San Ángel" ubicada en la comunidad de Paguan-cay (Sevilla de Oro, Azuay, Ecuador; -2.63289853; -78.6025174) a 2.550 msnm con una temperatura entre 9,4 y 17,0 °C y una precipitación anual promedio de 452,7 mm.

Cuatro vaquillas Holstein Friesian clínicamente sanas de 12 a 18 meses de edad, con un peso vivo entre 320 y 350 Kg, y una condición corporal entre 2,5 y 2,75 fueron seleccionadas para esta investigación. La dieta basal de las vaquillas incluyó consumo de pasto (Ryegrass, kikuyo, trébol, llantén forrajero), 2 kg/vaca/día de concentrado NUTRAVAN® 12-24, y 150 g/vaca/día sales minerales PECUTRIN®. El pastoreo de las vacas fue rotacional cada 2 días mantenidas en potreros con cerca eléctrico. Las cuatro vaquillas fueron inicialmente evaluadas ecográficamente para determinar salud uterina y ovárica.

En una primera etapa, las vaquillas fueron sometidas a un protocolo de IATF J-synch que consistió en el día 0 la aplicación de 2 mg de BE y la inserción de un DIV-P4 (0,5 g); día 6 el retiro del DIV-P4 y aplicación de PGF2 α (500 μ g); a partir de entonces se hicieron evaluaciones ecográficas diarias (07h00) hasta el día 10 para monitorear cambios foliculares y las 50, 55, 60 y 65 horas se tomó

muestras sanguíneas para el análisis de LH; al día 9 del protocolo se aplicó gonadorelina (100 μ g); y finalmente, al día 10 se verificó la ovulación.

En una segunda etapa, posterior a 30 días de haber finalizado el primer protocolo, las vacas fueron sometidas al mismo protocolo J-synch, con la adición de 400 UI de eCG al día 6 al momento de retirar el DIV-P4 y de aplicar PGF2 α . Las ecografías y toma de muestras sanguíneas fueron realizadas en las mismas condiciones de tiempo detalladas en el protocolo de la primera etapa (Figura 1).

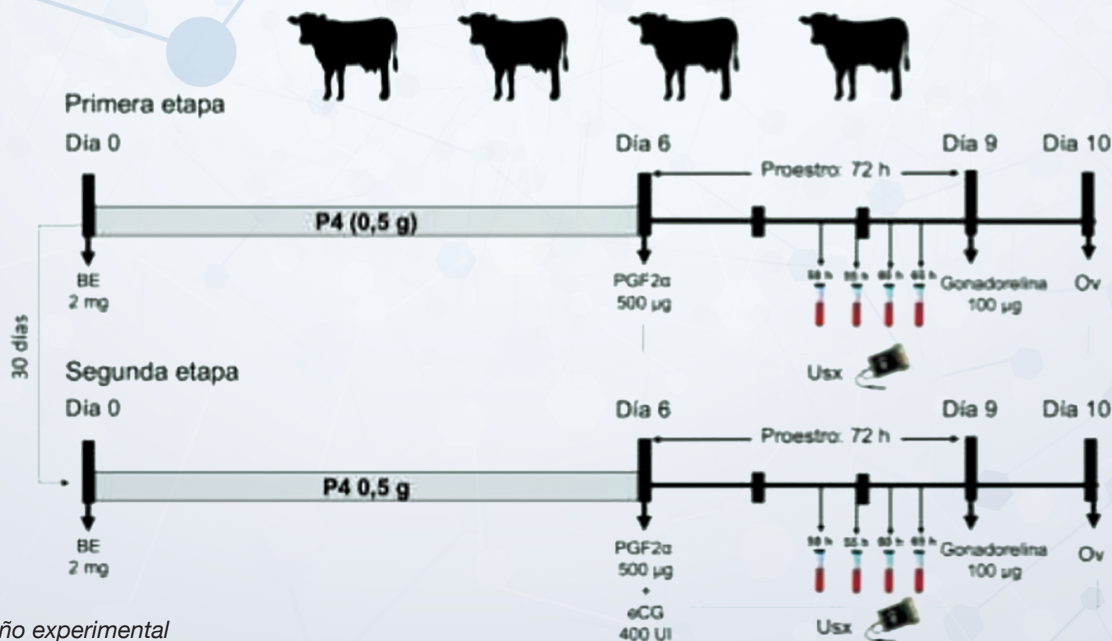


Figura 1. Diseño experimental

El registro ecográfico se realizó cada mañana (07h00) de los días 6 al 10 en ambos protocolos de sincronización. Durante los días 9 y 10 se determinó la presencia de estro usando un parche detector de estro. La ovulación se determinó verificando la morfometría y ecogenicidad del folículo ovulatorio en transición a un cuerpo hemorrágico (CH). El cambio de forma redonda (folículo ovulatorio) a forma irregular (ovalada y/o bordes ligeramente rugosos), y el cambio de ecogenicidad sirvió de base para determinar la ovulación y indicando la formación de un CH.

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos y el suero sanguíneo fue colocado en un tubo Khan estéril y almacenado a -20 °C hasta su análisis. El análisis de titulación de LH se realizó mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia (ensayo inmunoluminométrico tipo sándwich) usando el KIT MAGLUMI® LH (CLIA). Este ensayo consistió en usar un anticuerpo monoclonal anti-LH para marcar 'N-etisoluminol (ABEI)' y otro anticuerpo monoclonal para cubrir las microesferas magnéticas. Cada muestra sérica de cada vaca fue marcada con ABEI y mezcladas con las microesferas magnéticas e incubadas a 37°C. A esta mezcla se agregaron los reactivos del KIT y se produjo una reacción quimioluminiscente instantánea. La señal luminosa se midió mediante un fotomultiplicador como RLU en 3 segundos y que fue proporcional a la concentración de LH presente en las muestras sérica.

Los datos recogidos en campo (tamaño folículos ovulatorios, ovulación y cuerpos lúteos) y del laboratorio (concentración de LH) fueron tabulados en Excel, y analizados estadísticamente en el software STATISTICA (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA), versión 12.0. Los datos fueron expresados en promedio \pm EEM (error estándar de la media) por cada vaquilla y su promedio. El efecto de la eCG administrada al inicio del proestro inducido sobre la concentración de LH y respuesta folicular fue contrastada con su contraparte control usando la prueba t-student. Para evaluar la tasa de ovulación ocurrida entre los días 8 y 10 de los protocolos de sincronización en estudio se usó una prueba de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Vaquilla 1. Con el protocolo J-synch + eCG, la vaquilla 1 presentó codominancia folicular en ambos ovarios (izquierdo y derecho) con folículos de 10,5 y 11,5 mm, respectivamente al día 9. En el día 10 se verificó la ovulación observando CH derecho e izquierdo de 19,5 y 15,0 mm, respectivamente. Además, se evidenció un ligero incremento en la concentración de LH a las 65 h. Con el protocolo J-synch (control) no tuvo respuesta ovulatoria.

Vaquilla 2. Con el protocolo J-synch se registró al día 8 un FD en el ovario derecho de 10,9 mm, al día 9 un FO de 12,9 mm, y al día 10 un CH de 16,0 mm; mientras que con el protocolo J-Synch + eCG se observó un FD de 11,0 mm en el ovario izquierdo al día 8, un FO de 11,2 mm al día 9 y un CH más grande de 18,0 mm en la mañana de día 10. La ovulaciones ocurrieron en algún momento de la tarde del día 9 y la mañana del día 10. La concentración de LH registró un pico máximo a las 55 h (3,88 mUI/ml) y las 50 h (3,70 mUI/ml) en los protocolos J-synch y J-synch + eCG, respectivamente, después de la inducción de la luteólisis. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los incrementos de LH sérica en ambos protocolos fueron determinantes para que la ovulación ocurriera en algún momento del día 9.

Vaquilla 3. Con el protocolo J-synch se registró al día 8 un FO de 11,7 mm, y un CH de 15,3 al día 9; mientras que con el protocolo J-synch + eCG se detectó una codominancia folicular presentando FOs de 11,7 y 11,4 mm al día 8, y CHs de 21,0 y



16,7 mm al día 10, en los ovarios izquierdo y derecho, respectivamente.

Vaquilla 4. EL protocolo J-Synch se produjo un FO de 14 mm, y un CH de 17,5 mm al día 10 en el ovario derecho. Sin embargo, el protocolo J-synch + eCG produjo codominancia de dos FOs de 14,9 y 10 mm al día 9, y CHs de 17,8 y 16,1 mm al día 10 en el ovario derecho e izquierdo, respectivamente.

VALORES PROMEDIOS

Los valores promedios de la respuesta folicular, ovulación y cuerpo hemorrágico de las cuatro vaquillas sometidas a los protocolos de sincronización de estro J-synch y J-synch + eCG se detallan en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

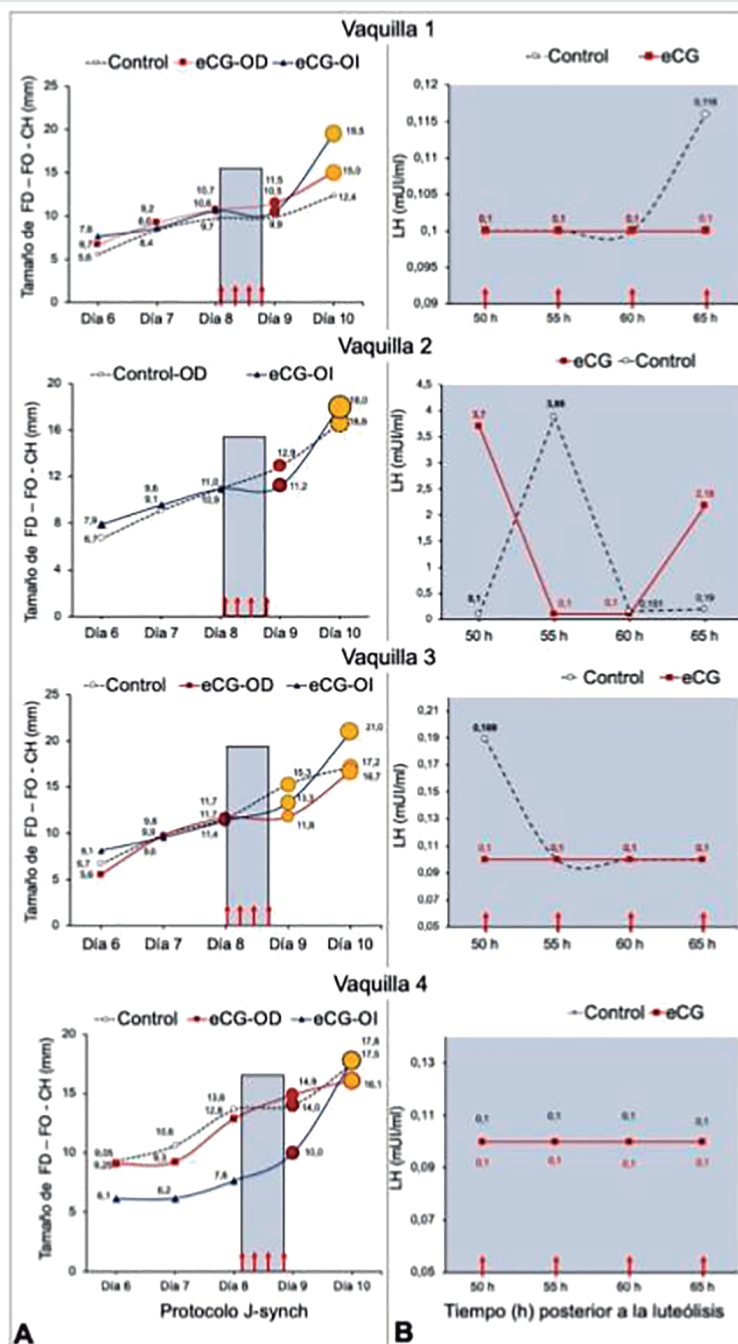


Figura 2. Evaluación de la respuesta folicular y concentración de LH en vaquillas sometidas a un protocolo de sincronización de celo -synch (control) y J-synch + eCG (400 UI). A. evaluación ecográfica del foliculo dominante (FD), foliculo ovulatorio (FO, ●), cuerpo hemorrágico (CH, ●). B, concentración de LH postror a la luteólisis.

Tabla 1. Tamaño de folículos, tasa de ovulación y tamaño del CH en cuatro vaquillas sometidas al protocolo de sincronización de estro J-Synch con y sin eCG

Día del tratamiento	Tratamientos*	
	J-synch (control) (n = 4)	J-synch + eCG (n = 4)
Diámetro del Folículo Dominante / Ovulatorio (mm)		
Día 6	7,2 ± 1,39	7,3 ± 1,23
Día 7	9,3 ± 0,91	8,9 ± 1,25
Día 8	11,3 ± 1,49	10,8 ± 1,61
Día 9**	12,3 ± 0,50	11,5 ± 0,93
Tasa de Ovulación (%)		
Día 8 (48 h)	25% (1/4)	25% (1/4)
Día 9 (72 h)	50 % (2/4)	75% (3/4)
Sin ovulación	25 (1/4)	---
Diámetro del Cuerpo hemorrágico (mm)		
Día 9	13,0 ± 2,01	11,9 ± 1,68
Día 10	15,9 ± 2,07	17,7 ± 2,03

*Sin diferencias estadísticas, según la prueba t-student ($P > 0,05$). ** Valores promedios de las vaquillas 1, 2 y 4 que presentaron un FO al día 9.

Los resultados de la presente investigación demostraron que, solo en la vaquilla 2, la aplicación del protocolo J-synch produjo un aumento máximo de LH entre las 50 y 55 horas posteriores a la luteólisis, independientemente de la adición de eCG. Además, en esta misma vaquilla 2, se observó la ovulación en algún momento del día 9 (72 horas) en ambos protocolos J-synch, resultando en un cuerpo hemorrágico más grande en comparación con el grupo control en la mañana del día 10. En las vaquillas 1, 3 y 4, sin embargo, la adición de 400 UI de eCG en el día 6 del protocolo J-synch fue suficiente para provocar la codominancia de folículos y, en efecto, se produjo la ovulación doble.

La presencia de codominancia folicular y la consecuente ovulación doble puede resultar en la gestación de mellizos dicigóticos, lo cual puede ocasionar complicaciones reproductivas, sanitarias y económicas durante la gestación, el parto y el puerperio de las vacas o vaquillas (López et al., 2005). Estos problemas pueden incluir distocia, retención de las membranas fetales, hipocalcemia, cetosis placentaria (Joosten y Hensen, 1992), metritis puerperal, endometritis y mastitis, lo que incluso podría llevar al descarte del animal (Kinsel et al., 1998). Además, en casos de gestaciones heterosexuales, existe el riesgo de que se produzcan hembras con Freemartinismo, lo que las hace

infértiles (Gregory et al., 1996). Por todas estas razones, la codominancia folicular y la ovulación doble son prácticas indeseables en la ganadería lechera.

Estos resultados sugieren que el protocolo J-synch aplicado en vaquillas Holstein Friesian criadas en el trópico alto ecuatoriano no es el más adecuado debido a la heterogeneidad de las respuestas foliculares de los animales. En un estudio realizado en vacas Pardo Suizo x Bos indicus criadas en condiciones tropicales de la Amazonía Ecuatoriana, se determinó que el desarrollo folicular y la fertilidad fueron similares entre los protocolos J-synch + 500 UI de eCG inseminadas a las 60 o 72 horas (proestro prolongado) (Yáñez-Avalos et al., 2018). Posteriormente, en una segunda investigación, los mismos autores demostraron que el protocolo J-Synch + 400 UI de eCG aplicado en el día 6 del protocolo (luteólisis) mostró un comportamiento diferente en el desarrollo folicular y en el tamaño del cuerpo lúteo a las 60 y 72 horas en vaquillas Brown Swiss y sus cruces Bos indicus criadas en la Amazonía Ecuatoriana (Yáñez-Ávalos et al., 2021). Los autores demostraron que la ovulación fue mayor con el protocolo J-Synch + eCG (n=24 vaquillas: 94,5 ± 0,9 %) en comparación con el grupo J-Synch sin eCG (n=18 vaquillas: 88,0 ± 1,1 %).

Nosotros creemos que la dosis de 400 UI de eCG en las tres vaquillas Holstein Friesian fue determinante para provocar ovulación doble. De hecho, Souza et al. (2009) determinaron que la aplicación de 400 UI de eCG después de remover el DIV-P4 en un protocolo de IATF, provocó una doble ovulación (12 – 21 %) en vacas Holstein Friesian lactantes. Por lo tanto, el uso de dosis menores (Ej. 200 UI de eCG) podría inducir un adecuado crecimiento folicular sin estimular la ovulación de más de un folículo (o la ovulación doble) como ha sido previamente demostrado por Portillo-Martínez et al. (2015) y Bravo-Ferrín (2021). La ovulación tiene una relación con el pico de LH y ocurre aproximadamente entre las 28 y 30 horas después de su incremento máximo (Olivares y Videa, 2021). Existe una alta variabilidad en el momento del pico de LH y la ovulación en las vaquillas; no obstante, los porcentajes de fertilidad no han mostrado diferencias significativas.

CONCLUSIÓN

La adición de 400 UI de eCG en el día 6 del protocolo J-synch provocó codominancia folicular y ovulaciones dobles en 3 de las 4 vaquillas Holstein Friesian criadas en el trópico alto ecuatoriano. Además, solamente una vaquilla presentó la máxima concentración de LH a las 50 o 55 horas después de la inducción de la luteólisis, independientemente de si se agregó o no eCG. Se recomienda hacer más estudios en vaquillas Holstein adicionado una dosis menor de eCG (por ejemplo, 200 UI) con la finalidad de evitar la codominancia folicular y las ovulaciones dobles.

REFERENCIAS

- Bo, G. A., Huguenine, E. E., de la Mata, J. J., de Carneiro, R. L. R., & Menchaca, A. (2019). Pregnancy rates in suckled beef cows synchronized with a shortened progesterone/oestradiol-based protocol (J-synch) and inseminated with conventional or sexed-sorted semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 31, 129-139. doi:10.1071/RDv32n2Ab173
- Bravo Giler, L. A., & Ferrín Giler, C. J. (2021). Dosis y efectos de gonadotropina coriónica equina en vacas y vaconas brahman sometidas a protocolos de sincronización. Thesis, ESPAM, Ecuador. Disponible en: <https://repositorio.esпам.edu.ec/handle/42000/1624>
- Colazo y Mapletoft. (2014). A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, 772. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095965/>
- Gregory, K. E., Echternkamp, S. E., & Cundiff, L. V. (1996). Effects of twinning on dystocia, calf survival, calf growth, carcass traits, and cow productivity. *Journal of animal science*, 74(6), 1223-1233. <https://doi.org/10.2527/1996.7461223x>
- Joosten I, Hensen EJ, 1992. Retained placenta: an immunological approach. *Anim Reprod Sci* 28:451-461. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90132-W](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90132-W)
- Kinsel, M. L., Marsh, W. E., Ruegg, P. L., & Etherington, W. G. (1998). Risk factors for twinning in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 989-993. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75659-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75659-0)
- Bhoraniya, H., Dhami, A., Naikoo, M., Parmar, B., & Sarvaiya, N. (2012). Effect of estrus synchronization protocols on plasma progesterone profile and fertility in postpartum anestrous Kankrej cows. *Tropical Animal Health and Production*, 44(6), 1191-1197. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0057-1>
- López, H., Sartori, R., & Wiltbank, M. (2005). Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle1. *Biology of Reproduction*, 72(4), 788-795. <https://doi.org/10.1095/bioreprod.104.035493>
- Meléndez, P., Gonzalez, G., Aguilar, E., Loera, O., Risco, C. & Archbald, L. (2006). Comparison of Two Estrus-Synchronization Protocols and Timed Artificial Insemination in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4567-4572. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72506-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72506-1)
- Mion, B., Bonotto, R., Oliveira, C., Souza, F., Bonotto, A. L. M., Pradiee, J., Tomazele, M., Cantarelli, L., Martins, A., Machado, L. & Schneider, A. (2019). J-Synch protocol associated with estrus detection in beef heifers and non-lactating cows. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 13(2), 269. <https://doi.org/10.26605/medvet-v13n2-3089>
- Olivares, M. & Videa, T. (2021). Protocolos de sincronización de celo (Ovsynch modificado vs DIV-B®) en vaquillas de la finca la Esperanza, Matiguas-Matagalpa en el periodo enero-mayo, 2020 [Tesis]. Universidad Nacional Agraria <https://repositorio.una.edu.ni/4360/1/tnl53o48.pdf>
- Portillo-Martínez, G., Gutiérrez, J., & Ondiz, A. (2015). Efecto de la Dosis de eCG sobre las Características Foliculares y Luteales, momento y Tasa de Ovulación de Novillas Mestizas Cebú Sincronizadas con Progestágeno Intravaginal. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 56(1), 35-41.
- Souza, A., Viechnieski, S., Lima, F., Silva, F., Araújo, R., Bó, G., Wiltbank, M. & Baruselli, P. (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 72(1), 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.025>
- Yáñez-Avalos, D., López, J., Moyano, J., Quinteros, R. & Marini, P. (2018). Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas con proestro prolongado de 60 y 72 horas. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 363. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29503>
- Yáñez-Avalos, D., Barbona, I., López, J., & Marini, P. (2021). Protocolo J-synch con y sin eCG en vacas Brown Swiss y sus cruza con Bos Indicus en la amazonía ecuatoriana. *La Granja*, 33(1), 8-20. <https://doi.org/10.17163/lgr.n33.2021.01>