

## **Efecto del cipionato de estradiol y la GnRH sobre la sincronización de ovulaciones y la tasa de preñez a la IATF en vacas de cría sin ternero al pie\***

### **Effect of estradiol cypionate and GnRH on synchronization of ovulation and pregnancy rate at FTAI in non-suckled cows.**

USLENGHI, G.<sup>1</sup>; CABODEVILA, J.<sup>1</sup> & CALLEJAS, S.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CONICET - CIVETAN Becario de postgrado.

<sup>2</sup> Área de Reproducción, FISFARVET. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET-CICPBA).

### **RESUMEN**

Se evaluó el efecto del cipionato de estradiol (CPE), de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH) y la combinación de ambos sobre la sincronización de ovulaciones y la tasa de preñez post inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vacas de cría sin ternero al pie. En el Experimento 1, se utilizaron 40 vacas secas, las cuales se dividieron aleatoriamente para recibir cuatro inductores de la ovulación (n=10/grupo): 1 mg de CPE; 1 mg de benzoato de estradiol (BE), 10,5 µg de GnRH, o la combinación de CPE+GnRH. Se realizaron ecografías cada 12 horas para determinar el momento de ovulación. En el Experimento 2, las vacas recibieron los mismos tratamientos: Grupo CPE: n=71; Grupo BE: n=70; Grupo GnRH: n=67; Grupo CPE+GnRH: n=70. El Día 10 las vacas fueron IATF, el diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía a los 35 días posteriores. Los datos se analizaron mediante el programa SAS. No hubo efecto del tratamiento sobre la dinámica folicular ni sobre la hora promedio de ovulación (P>0,05); sin embargo, las vacas tratadas con GnRH tuvieron mayor dispersión de ovulaciones (P<0,05). La tasa de preñez no difirió entre tratamientos (P>0,05; CPE: 46,3%, BE: 54,3%, GnRH: 47,9% y CPE+GnRH: 60,0%). En conclusión, la administración de GnRH en vacas que recibieron CPE tiende a mejorar la distribución de ovulaciones, pero no incrementa la tasa de preñez a la IATF.

**Palabras clave:** (estrógeno), (buserelina), (inseminación artificial), (ovulación), (preñez).

Correspondencia e-mail: [uslenghi@vet.unicen.edu.ar](mailto:uslenghi@vet.unicen.edu.ar)

Recibido: 07-01-2016

Aceptado: 13-07-2017

## ABSTRACT

Two experiments were conducted to evaluate the effect of estradiol cypionate (ECP), Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and the combination of both on synchronization of ovulations and pregnancy rate at fixed-timed artificial insemination (FTAI). In Experiment 1, forty cows were randomly assigned to received different ovulation inducers (n=10/group): 1 mg of ECP; 1 mg of estradiol benzoate (EB); 10.5 µg of buserelin acetate (GnRH); 1 mg of ECP plus 10.5 µg of GnRH. Ovarian ultrasonography examinations were performed every 12 h from intravaginal device removal to ovulation, to detect the dominant follicle and ovulation. In Experiment 2, cows received the same treatments: Group ECP: n=71; Group EB: n=70; Group GnRH: n=67; Group ECP-GnRH: n=70, and FTAI 48-50 h after intravaginal device removal. Pregnancy rate was determined on day 35 by ultrasonography. Variables were analyzed by SAS. There was no effect of treatments on follicular dynamics, and on the mean interval to ovulation ( $P>0.05$ ); however, GnRH treated cows had scattered distribution of ovulations ( $P<0.05$ ). Pregnancy rate did not differ ( $P>0.05$ ) between treatments ( $P>0.05$ ; ECP: 46.3%, EB: 54.3%, GnRH: 47.9% y ECP+GnRH: 60.0%). In conclusion, GnRH administration in cows that receive ECP at PID removal tended to improve the distribution of ovulations, but did not enhance pregnancy rate at FTAI.

**Key words:** (estradiol), (buserelin acetate), (artificial insemination), (ovulation), (pregnancy rate).

## INTRODUCCIÓN

En un protocolo para inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) a base de dispositivos intravaginales (DIV) con progesterona (P<sub>4</sub>) más estradiol, la administración de cipionato de estradiol (CPE) al momento de retirar los DIV es extensamente utilizada en la actualidad para reemplazar el benzoato de estradiol (BE) como inductor de la ovulación con el objetivo de reducir el número de encierres de los animales<sup>7</sup>. Sin embargo, el tratamiento con CPE es menos efectivo para sincronizar el pico de LH<sup>12</sup> y la ovulación<sup>14</sup> respecto del uso de BE. Por otra parte, la GnRH administrada en el momento de la IATF ha sido utilizada para sincronizar las ovulaciones en lugar del BE que se administra 24 h post DIV, y Sá Filho et al. (2010) reportaron que el tratamiento con GnRH, previene la aparición de ovulaciones tardías en ganado *Bos indicus*. En consecuencia, la combinación del CPE con GnRH podría concentrar las ovulaciones que se producen luego de aplicar CPE en el momento de retirar el DIV. Por lo tanto se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto de combinar el cipionato de estradiol y la GnRH sobre la sincronización de las ovulaciones y la tasa de preñez a la IATF, basados en la hipótesis que esta combinación concentra

las ovulaciones y mejorar los porcentajes de preñez que se pueden obtener luego de realizar una IATF.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar

Los experimentos se realizaron en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (37°S, 60°O). El diseño experimental y el manejo de los animales se realizaron de acuerdo a las regulaciones del Comité de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A., Tandil, Bs. As., Argentina.

### Experimento 1

*Animales y tratamientos.* Se utilizaron 40 vacas *Bos taurus* secas de raza Angus, multíparas que se encontraron pastoreando ryegrass (*Lolium perenne*), con una condición corporal (CC) de  $3,2 \pm 0,3$  (escala 1 a 5, 1: emanciada y 5: obesa) y más de 60 días postparto. El día 0, se colocaron los DIV (Cronipres® Tres usos, Biogénesis-Bagó, Garín, Argentina) más 2 mg de BE (Bioestrogen, Biogénesis-Bagó, Garín, Argentina). Al retirar los DIV (día 8), las vacas recibieron 0,15 mg de D-Cloprostenol (Enzaprost D-C, Biogénesis-Bagó, Garín, Argentina) y se dividieron

aleatoriamente, teniendo en cuenta el estatus ovárico (EO), para recibir (n=10/grupo): 1 mg de CPE (ECP estradiol, König, Buenos Aires, Argentina) el día 8; 1 mg de BE el día 9; 10,5 µg de GnRH (Gonaxal, Biogenesis Bagó, Garín, Argentina) el día 10; 1 mg de CPE (día 8) + 10,5 µg de GnRH (día 10).

**Muestreo sanguíneo y radioinmunoensayo.** Para analizar las concentraciones plasmáticas de P4, se realizaron extracciones de sangre por venipunción de la vena yugular desde el día 8 al 12, cada 24 h. Para evaluar la funcionalidad del cuerpo lúteo<sup>1</sup> (CL) también se obtuvo una muestra el día 22. Las muestras fueron colectadas en tubos heparinizados, centrifugadas (2000 g durante 15 min) y el plasma fue almacenado a -20 °C hasta el análisis. La determinación de P4 se realizó por RIA utilizando un kit comercial (COAT A COUNT, Siemens Healthcare Diagnostic Inc., CA, USA). El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor a 7% para muestras comprendidas entre 0,1 y 40,0 ng/ml, el coeficiente de variación inter-ensayo fue menor a 3,5% y la sensibilidad fue 0,01 ng/ml.

**Ultrasonografía.** En el día 0 se determinó el EO, utilizando un ecógrafo con un transductor de 5 MHz (Chison D600VET, 2007, China). El EO fue clasificado de acuerdo a la presencia de: un CL, Folículos (F) ≥ 10 mm o F < 10 mm de diámetro. Luego de retirar los DIV, se realizaron ecografías cada 12 h hasta la ovulación. El momento de la ovulación fue definido como el tiempo medio entre la última observación del folículo dominante (FD) y su desaparición (ovulación), y determina el diámetro del F ovulatorio<sup>5</sup>. La tasa de crecimiento folicular (mm/día) se calculó como el máximo diámetro alcanzado por el FD, menos el diámetro al retiro del DIV, dividido el intervalo de días<sup>14</sup>. La ecografía del día 22 fue realizada para confirmar la ovulación<sup>2</sup>.

## Experimento 2

**Animales y tratamientos.** Se utilizaron 278 vacas *B. taurus* secas de iguales características al Experimento 1. Los animales recibieron los

tratamientos mencionados en el Experimento 1: Grupo CPE: n=71; Grupo BE: n=70; Grupo GnRH: n=67; Grupo CPE+GnRH: n=70. La IATF se realizó a las 48-50 h de retirados los DIV, utilizando 1 solo toro de probada fertilidad.

**Ultrasonografía.** Se determinó el EO en el día 0 y la tasa e preñez a los 30 días post IATF. En el día 0, 40% de los animales presentaron un cuerpo lúteo; el 46,4% folículos mayores o iguales a 10 mm y el resto folículos menores.

## Análisis estadístico

Se analizó el diámetro del FD al día 8 y 9, el diámetro del F ovulatorio, la tasa de crecimiento folicular, el intervalo retiro DIV-ovulación, la tasa de ovulación, la concentración plasmática de P4 y área del CL al día 22, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, análisis de varianza (ANOVA) PROC GLM del SAS 9.2<sup>9</sup> y test de Bartlett's. En el modelo de análisis estadístico se tuvo en cuenta el inductor de ovulaciones, el EO y sus interacciones. En el caso de la concentración de progesterona y el área del CL, el modelo se tuvo en cuenta el inductor de la ovulación, el día y su interacción. En el día 22, solo se tuvo en cuenta el inductor de la ovulación. Para estudiar la hora de ovulación se utilizó el test de Tukey. La distribución de ovulaciones fue analizada mediante el PROC FREQ del SAS<sup>9</sup>. Las concentraciones plasmáticas de P4 del día 8 a 12 se analizaron mediante el PROC MIXED del SAS<sup>9</sup>; y en el día 22 por ANOVA del SAS<sup>9</sup>. En el Experimento 2, el porcentaje de preñez a la IATF fue analizado mediante el PROC CATMOD del SAS<sup>9</sup>, para determinar el efecto del tratamiento, EO y sus interacciones. El nivel de significancia estadística fue P = 0,05 y se consideró tendencia a P<0,10.

## RESULTADOS

### Experimento 1

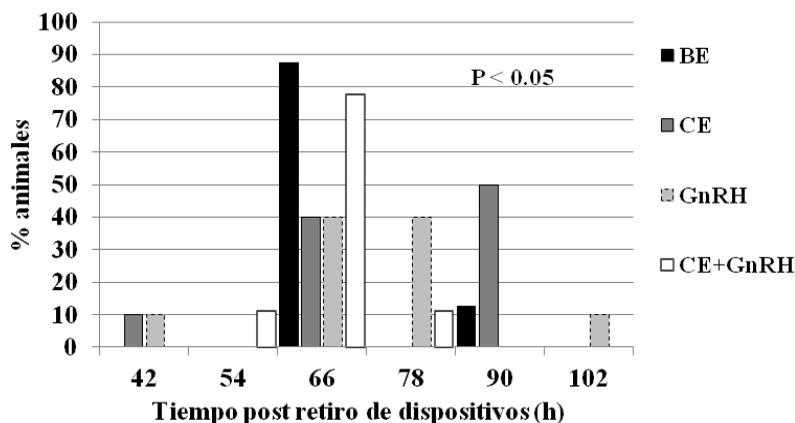
Las concentraciones plasmáticas de P4 no fueron diferentes entre tratamientos, pero fueron afectadas por el efecto de tiempo (P<0,05). En el día 8 las concentraciones fueron mayores respecto de los días siguientes (Día

8:  $5,04 \pm 0,60$  ng/ml; Día 9:  $0,86 \pm 0,13$  ng/ml; Día 10:  $0,46 \pm 0,05$  ng/ml; Día 11:  $0,32 \pm 0,04$  ng/ml). El diámetro del FD, F ovulatorio y la tasa de crecimiento folicular no difirieron entre tratamientos ( $P > 0,05$ ; Tabla 1). El 92,5% (37/40) de las vacas ovularon en respuesta al tratamiento hormonal sin diferencias entre los tratamientos en la tasa de ovulación ( $P > 0,05$ ). El tiempo medio de ovulación no difirió entre tratamientos ( $P > 0,05$ ; CPE:  $75,6 \pm 16,8$ ; BE:  $69 \pm 8,5$ ; GnRH:  $70,8 \pm 12,9$ ; CPE+GnRH:  $66,0 \pm 6,0$ ), pero hubo un efecto sobre la

distribución de las mismas ( $P < 0,05$ ), así difirió en las vacas tratadas con GnRH respecto de los otros tratamientos ( $P < 0,05$ ) y hubo una tendencia ( $P = 0,06$ ) a mayor concentración de ovulaciones en las vacas tratadas con CE+GnRH respecto de las que sólo recibieron CPE (Fig. 1). En los tratamientos CPE y GnRH se observó un 10% de ovulaciones tempranas. No hubo efecto del tratamiento sobre el área del CL ( $3,41 \pm 0,56$  cm<sup>2</sup>; rango: 1,80-5,35 cm<sup>2</sup>) y la concentración plasmática de P<sub>4</sub> ( $4,97 \pm 0,42$  ng/ml; rango: 2,53-8,30 ng/ml) en el día 22 ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 1.** Diámetro del folículo dominante al retiro del dispositivo, ovulatorio, tasa de crecimiento del mismo y porcentaje de ovulación en vacas tratadas con diferentes inductores de la ovulación (CPE: Cipionato de estradiol; BE: Benzoato de estradiol; GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas y CPE + GnRH: Combinación de CPE con GnRH).

| Tratamientos | Diámetro Folículo Dominante al retiro del DIV | Diámetro Folículo ovulatorio | Tasa de crecimiento folicular | Porcentaje de ovulación |
|--------------|---|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| CPE          | $9,2 \pm 2,0$                                 | $11,7 \pm 1,6$               | $0,8 \pm 0,3$                 | 100                     |
| BE           | $8,9 \pm 1,9$                                 | $11,6 \pm 1,5$               | $1 \pm 0,3$                   | 100                     |
| GnRH         | $10,6 \pm 2,4$                                | $13,4 \pm 2,1$               | $0,9 \pm 0,8$                 | 90                      |
| CPE+GnRH     | $10,6 \pm 1,3$                                | $12,7 \pm 1,4$               | $0,8 \pm 0,7$                 | 90                      |



**Fig. 1.** Distribución de ovulaciones en vacas secas tratadas con protocolos hormonales para IATF y distintos inductores de ovulación

## Experimento 2

La tasa de preñez general fue de 52,2% (145/278). No hubo efecto del tratamiento ( $P < 0,05$ ; CPE: 47,9%, BE: 54,3%, GnRH: 46,3%, CPE+GnRH: 60,0%) sobre la tasa de preñez a la IATF, pero hubo un efecto del

EO al inicio del tratamiento; así, las vacas que tenían un  $F < 10$  mm se preñaron en menor proporción (34,2%, 13/38;  $P < 0,05$ ) respecto de las vacas que tenían un CL (56,8%, 63/111) o un  $F > 10$  mm (53,5%, 69/129). La interacción tratamiento x EO no fue significativa ( $P > 0,05$ )

## DISCUSIÓN

En el presente estudio no hubo efecto del tratamiento sobre las variables foliculares evaluadas. Resultados similares fueron observados por Meneghetti et al. (2009) en vacas Nelore, quienes informaron que la administración de BE, CPE o GnRH, no afectan las características evaluadas. Esto coincide con lo encontrado en la literatura<sup>6</sup> e indica que estos inductores de la ovulación no afectan la dinámica folicular.

Las concentraciones plasmáticas de P4 fueron similares entre los tratamientos pero difirieron entre días. Así, fueron mayores en el día 8 respecto de los días siguientes, indicando que el retiro de los DIV y la administración de PGF efectivamente inducen el descenso de los niveles de P4. Adicionalmente, la concentración de P4 no fue diferente entre tratamientos, indicando que todas las vacas que ovularon, independiente del tratamiento, desarrollaron un CL funcional, alcanzando niveles de P4 por encima de 1 ng/ml<sup>1</sup>.

Los inductores de la ovulación utilizados no afectaron el tiempo medio de ovulación, lo cual coincide con reportes previos<sup>12, 13</sup>. Sin embargo, la distribución de las ovulaciones difirió, lo cual es el principal hallazgo del presente estudio. Las vacas tratadas con GnRH ovularon de forma más dispersa. Esto pudo deberse a la falta de estradiol exógeno que provee un soporte hormonal adecuado durante el proestro a fin de obtener un adecuado pico de LH y ovulación<sup>11</sup>.

El efecto de diferentes inductores de la ovulación sobre la ovulación ha sido reportado previamente en vacas *B. indicus* con cría<sup>12</sup>. Según este estudio la distribución de ovulaciones es similar entre sales de estradiol. Sin embargo, en un estudio reciente se indicó que el CE produce una mayor dispersión de las ovulaciones con una menor tasa de preñez en vacas secas respecto del BE<sup>14</sup>.

En el presente estudio, la combinación de tratamientos CPE+GnRH, mostró una tendencia a producir una mejor distribución de ovulaciones respecto de las vacas que solo recibieron CPE. Luego de administrar BE a las 24 h de retirado el dispositivo con progesterona

o CPE en dicho momento se produce un pico de LH entre las 44 y 50 h, respectivamente<sup>12</sup>; no obstante, al recibir la GnRH pudo haber ocurrido un fortalecimiento de dicho pico que mejoró la distribución de las ovulaciones que ocurrieron en el grupo CPE, por adelantamiento de la mayoría de aquellas que se producirían a la hora 90. No obstante, este efecto no siempre ocurriría ya que hubo un 10% de las ovulaciones que se produjeron a la hora 120.

Con respecto al porcentaje de preñez, Sá Filho et al. (2011) no encontraron diferencias utilizando CPE (48,3%), BE (40,6%) o GnRH (48,7%) en vaquillonas Nelore, o empleando CPE (51,8%), GnRH (50,9%) y CPE+GnRH (54,9%) en vacas Nelore con cría; en concordancia con los resultados observados en el presente trabajo.

Si bien se observaron ovulaciones tempranas (un 10% a la hora 42) en los grupos CPE y GnRH, estas no repercutieron negativamente en el porcentaje de preñez, a pesar que Roelofs et al. (2006), indicaron que la tasa de fertilización decrece drásticamente cuando la IA se realiza después de ocurrida la ovulación. Cabe señalar que este adelantamiento de las ovulaciones ya ha sido observado en trabajos previos<sup>3</sup>. Por otro lado, se ha estimado que la máxima viabilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra es de 24-30 h<sup>4</sup>. Por lo tanto es de esperar que una asincronía entre las vacas que ovulan a las 90 o 102 h, y la llegada de espermatozoides viables capaces de fecundar resulten en un descenso de la tasa de preñez en las vacas tratadas con CPE y GnRH en el Experimento 2. Sin embargo, esto no ocurrió. Posiblemente, puede haber ocurrido que el semen utilizado en el presente estudio fue de una calidad suficiente como para compensar las diferencias en la distribución de ovulaciones, permaneciendo viable durante la ventana de ovulación.

## CONCLUSIÓN

La administración de GnRH en vacas que reciben CPE al retiro de los DIV tiende a concentrar las ovulaciones, pero no tiene

influencia sobre la dinámica folicular, función luteal y la tasa de preñez a la IATF.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bicalho, RC.; Galvao, KN.; Guard, CL.; Santos, JEP. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 2008; 70: 199-207.
2. Carvalho, JBP.; Carvalho, NAT.; Reis, EL.; Nichi, M.; Souza, AH.; Baruselli, PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 2008; 69: 167-175.
3. Colazo, MG.; Kastelic, JP.; Mapletoft, RJ. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 2003; 60: 855-865.
4. Hiers, EA.; Barthle, CR.; Dahms, MKV.; *et al.* Synchronization of *Bos indicus* x *Bos taurus* cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F<sub>2</sub> in combination with melengestrol acetate. *J. Anim. Sci.* 2003; 81: 830-835
5. Manes, J.; Aller, JF.; Callejas, SS.; Hozbor, F.; Alberio, RH. Influence of the length of progestagen treatment and the time of oestradiol benzoate application on the ovulatory follicle size and ovulation time in anoestrous and cyclic beef cows. *Reprod. Dom. Anim.* 2012; 47: 412-418.
6. Martinez, MF.; Kastelic, JP.; Bó, GA.; Caccia, M.; Mapletoft, RJ. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin releasing and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 86: 37-52.
7. Meneghetti, M.; Sá Filho, OG.; Peres, RFG.; Lamb, GC.; Vasconcelos, JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology* 2009; 72: 179-189.
8. Roelofs, JB.; Graat, EAM.; Mullaart, E.; Soede, NM.; Voskamp-Harkema, V.; Kemp, B. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology* 2006; 66: 2173-2181.
9. SAS. Institute Inc., SAS/STAT® User's Guide, Version 6, vol. 2., 4th ed. SAS Institute Inc, Cary, NC, 1998; 846 pp.
10. Sá Filho, MF.; Ayres, H.; Ferreira, RM.; *et al.* Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 2010; 73: 651-658.
11. Sá Filho, MF.; Santos, JEP.; Ferreira, RM.; Sales, JNS.; Baruselli, PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 2011; 76: 455-463.
12. Sales, JNS.; Carvalho, JBP.; Crepaldi, GA.; *et al.* Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012; 78: 510-516.
13. Souza, AH.; Viechnieski, S.; Lima, FA.; *et al.* Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 2009; 72: 10-21.
14. Uslenghi, G.; González Chaves, S.; Cabodevila, J.; Callejas, S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 2014; 145: 1-7.