InVet. 2011, 13(1): 71-78
ISSN 1514-6634 (impreso)
ISSN 1668-3498 (en línea)

Efecto de un dispositivo intravaginal con progesterona sobre la actividad ovárica en yeguas cíclicas

Effect of an intravaginal device containing progesterone on the ovarian activity in cyclic mares

Bianchi, C.P.[1,2]; Guerrero, R.[3]; Videla Dorna, I.[3]; Cavilla, M.V.[1,2]; Aba, M.A.[1]

[1]Área de Endocrinología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Paraje Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Argentina. [2]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. [3]Syntex SA

RESUMEN

Se evaluó el efecto de un dispositivo intravaginal conteniendo progesterona más una inyección de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) al retiro del dispositivo y la aplicación de Gonadotrofina Coriónica humana (hCG) al día 5 post retiro sobre la actividad ovárica en yeguas cíclicas. Adicionalmente, se evaluaron los porcentajes de preñez. Los animales se dividieron en: grupo T: animales tratados a partir del día 0 con dispositivo intravaginal conteniendo 1,38 g de progesterona durante 8 días más aplicación de $PGF_{2\alpha}$ al retiro y al 5to día hCG a aquellos animales con un folículo ≥ 30 mm y grupo C: animales controles; sin tratamiento. Al 4to día post retiro los animales fueron puestos en servicio por monta natural en manada. El dispositivo indujo concentraciones plasmáticas de progesterona superiores a 2,1 ng ml-$_1$ durante su exposición. En el 83,4% de los animales del grupo T (25/30) se observó la presencia de un folículo ovulatorio entre el retiro del dispositivo y el día de inyección de hCG: el 68% (17/25) ovuló como respuesta a la hCG, mientras que el 32% (8/25) lo hizo espontáneamente en los primeros 4 días post retiro. En los animales controles se registraron ovulaciones aleatoriamente. Al día 45 del retiro, la ecografía demostró un mayor porcentaje de yeguas preñadas en los primeros días post tratamiento en el grupo T, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se concluye que la utilización de un dispositivo intravaginal en el protocolo descripto, resulta en una importante sincronización de la aparición de folículos ovulatorios alrededor del 5to día post retiro.

Palabras clave: (sincronización), (progesterona), (yeguas cíclicas).

Correspondencia *e-mail*: Carolina Bianchi, cbianchi@vet.unicen.edu.ar
Recibido: 01-06-2010
Aceptado: 15-08-2011

SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the effect of a progesterone releasing intravaginal device plus the injection of $PGF_{2\alpha}$ at removal and the application of hCG on day 5 after withdrawal on the ovarian activity in cyclic mares. Additionally, pregnancy rates were evaluated at the end of the study. Animals were divided into two groups: Treated with an intravaginal device containing 1.38 g progesterone during 8 days plus $PGF_{2\alpha}$ at the removal time and an hCG injection to animals with a follicle with a diameter ≥ 30 mm on day 5 and controls (no treatment). Four days after removal, animals were mated. Plasma progesterone concentrations remained 2.1 ng ml^{-1} during the period that the devices were kept into the vagina. An ovulatory follicle between the device removal and hCG application was observed in 83.4% (25/30) of the treated animals: 68% (17/25) ovulated in response to hCG while 32% (8/25) ovulated spontaneously during the first 4 days post device removal. In the control group, ovulations occurred randomly. On day 45, animals were ultrasonographed for pregnancy diagnosis. It was recorded a higher percentage of pregnant mares during the first days post treatment in the T group although differences were not statistically significant.

In summary, the use of an intravaginal device containing progesterone in a protocol as presented in this study permit an important synchronization of the appearance of ovulatory follicles around day 5 after removal.

Key words: (synchronization), (progesterone), (cyclic mares).

INTRODUCCIÓN

El control del ciclo estral es una de las más valiosas herramientas implementadas para mejorar la eficiencia reproductiva en la mayoría de las especies domésticas. La incorporación de nuevas tecnologías tales como la inseminación artificial y la transferencia de embriones exige el desarrollo de protocolos de sincronización de celos y ovulaciones.

Con el objetivo de controlar la actividad ovárica en yeguas se han propuestos diferentes protocolos, aunque los resultados obtenidos hasta el momento han sido muy variables. Una de las principales razones propuestas para explicar dicha variabilidad es la implementación de protocolos eficaces en otras especies, principalmente en los bovinos, sin tener en cuenta las diferencias fisiológicas existentes entre ellas[12].

La administración de progesterona (P_4) o sus análogos sintéticos (progestágenos) han demostrado ser efectivos en controlar el desarrollo folicular y sincronizar la actividad ovárica en diferentes especies[5, 2]. Los protocolos basados en la administración de P_4 o progestágenos tienen como objetivo principal suprimir la secreción de LH y evitar la ovulación en animales con actividad cíclica normal[17, 7]. En yeguas, se han implementado diferentes protocolos para controlar el ciclo estral basados en la utilización de P_4 administrada por diferentes vías[16]. Los primeros estudios consistieron en la administración vía oral del progestágeno altrenogest, el cual resultó eficaz para bloquear el estro y la ovulación en yeguas[18]. Estudios recientes han evaluado la eficacia de diferentes dispositivos intravaginales impregnados con P_4 solos o en combinación con estrógenos para sincronizar los celos y las ovulaciones en yeguas cíclicas[13, 19, 11]. Algunos trabajos han incorporado al protocolo de P_4, la administración de un agente luteolítico al final del tratamiento, con el fin de asegurar la regresión del cuerpo lúteo funcional y disminuir la variabilidad en el momento de ovulación[13]. Debido a la existencia de reportes contradictorios, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un dispositivo intravaginal comercial impregnado con 1,38 gramos de P_4 más una inyección de $PGF_{2\alpha}$ al retiro y Gonadotrofina Coriónica humana

(hCG) al día 5 post retiro, sobre la dinámica folicular y las tasas de ovulación durante la estación reproductiva. Adicionalmente, se realizó la evaluación de las tasas de preñez a los 55 días post tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en los meses de diciembre y enero en las instalaciones de la empresa Syntex S.A. en el partido de Ayacucho, provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron 49 yeguas mestizas, ovulatorias, de 4 a 8 años de edad y con un score corporal igual a 4 (rango de 1 – 5) las cuales se mantuvieron en una pastura natural con agua *ad libitum*. La actividad ovárica de todos los animales fue examinada por ultrasonografía (Pie Medical 100 vet con traductor variable 5.0/7.5 MHz), determinándose que todas las yeguas ciclaban normalmente al inicio del estudio (día 0). En ese momento, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo T (Tratado, n = 30), los cuales recibieron un dispositivo intravaginal conteniendo 1,38 g de P_4 (DIB®, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) más una inyección de d-Cloprostenol, análogo sintético de la $PGF_{2\alpha}$ (75 µg, Ciclase®, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) al momento del retiro (día 8). A fin de confirmar la presencia de folículos ovulatorios al día 13, se realizaron ecografías a todos los animales y se inyectó una dosis de hCG (2500 UI, Ovusyn®, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) por vía intramuscular a aquellos que presentaban un folículo ≥ 30 mm, considerado ovulatorio en la especie[6] y un grupo C (Control, n = 19) a los que se colocó un dispositivo libre de P_4 y no recibieron ningún tratamiento adicional. Diez animales, seleccionados al azar, de cada uno de los grupos fueron ecografiados al día 0, 2, 4, 6, 8 y 11, tomándose muestras de sangre en cada ocasión. Al 4to día post retiro (día 12) y durante 40 días todas las hembras recibieron servicio natural con cinco padrillos de 9 a 10 años de edad con buenos antecedentes reproductivos; respetando el manejo reproductivo de rutina realizado por el establecimiento. Dos días después (día 15) se comprobó la ovulación por ultrasonografía y retrospectivamente a través de las concentraciones plasmáticas de P_4. Al día 45 del retiro del dispositivo, todos los animales volvieron a ser ecografiados para determinar preñez y la edad de la misma en base al diámetro del saco gestacional.

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular e inmediatamente centrifugadas y el plasma almacenado a –20ºC hasta su análisis. Las concentraciones plasmáticas de P_4 fueron analizadas a través de un kit RIA (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, USA)[8]. La sensibilidad del ensayo de P_4 fue de 0,1 ng ml^{-1} y el coeficiente de variación intra-ensayo menor al 13 % para concentraciones entre 0,1 y 40 ng ml^{-1}.

Se utilizó un test *T student* para establecer diferencias significativas en el diámetro folicular promedio entre el grupo T y el grupo C al inicio y al final del tratamiento. Para evaluar las diferencias entres los grupos T y C con respecto al porcentaje de preñez al finalizar el tratamiento se utilizó el *Test Exacto de Fisher* utilizando el procedimiento PROC FREQ. Asimismo, para evaluar la distribución de la edad gestacional de las yeguas preñadas se utilizó el *Test de Kolmogorov-Smirnov*, con el procedimiento PROC NPAR1WAY del SAS V9.2 (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA). Los resultados son expresados como promedio ± error estándar (E.E.).

RESULTADOS

Efecto del uso del dispositivo impregnado con progesterona

La pérdida de dispositivos registrada a lo largo del estudio fue del 4% (2/49), perteneciendo ambos animales al grupo control. En algunos animales tratados se observó una secreción mucosa en vagina al momento del retiro del dispositivo que desapareció 72 h más tarde.

El análisis de las concentraciones plasmáticas de P_4 en los 10 animales evaluados del lote T, mostró que la aplicación del dispositivo logró mantener concentraciones plasmáticas de P_4 por

encima de 2,1 ng ml^{-1} durante todo el período de exposición. En los animales controles las concentraciones oscilaron entre 0,30 y 14 ng ml^{-1}, dependiendo de la presencia o no de un cuerpo lúteo funcional. A las 72 h del retiro del dispositivo, en 8 de los 10 animales tratados se registraron concentraciones plasmáticas de P_4 por debajo de 1 ng ml^{-1}, mientras que en los 2 animales restantes se observaron valores ligeramente superiores (Figura 1).

Actividad ovárica registrada durante el tratamiento

Al inicio del ensayo (día 0), el diámetro folicular promedio fue 2,48 ± 0,33 y 2,60 ± 0,31 cm (P = 0,80) mientras que al día del retiro (día 8) fue 2,56 ± 0,45 y 2,81 ± 0,37 cm (P = 0,70) en los animales del grupo T y C, respectivamente. Los animales con un folículo mayor a 3,5 cm al momento de inserción del dispositivo, ovularon en los primeros tres días de exposición. En el resto de los animales del grupo T, el diámetro folicular promedio, se mantuvo por debajo del diámetro ovulatorio entre los días 0 y 8. Se observó cierto grado de crecimiento folicular en algunos animales hacia el final del tratamiento. Contrariamente, durante el mismo período, en los animales del grupo C se registraron crecimiento folicular y ovulaciones en forma aleatoria (Figura 2). En el diámetro folicular promedio se incluyen los valores del folículo dominante hasta el momento de la ovulación.

Efecto del uso del dispositivo sobre el porcentaje de ovulaciones

La inyección de una dosis de hCG al día 5 post retiro del dispositivo, permitió demostrar la capacidad ovulatoria de los folículos desarrollados en respuesta al tratamiento. En el 83,4% de los animales del grupo T (25/30) se observó por ecografía, la presencia de un folículo ovulatorio entre el retiro del dispositivo y el día de inyección de hCG. De estos animales, un 68% (17/25) ovuló como respuesta a la inyección de hCG, representando el 56,7% del total del lote (17/30). Mientras tanto un 26,7% (8/30) lo hizo espontáneamente en los primeros 4 días. Solamente 6,7% (2/30) de los animales tratados no ovularon durante el estudio (Figura 3). En los animales del grupo control la aparición de folículos ovulatorios y ocurrencia de ovulaciones siguió una distribución aleatoria (resultados no mostrados).

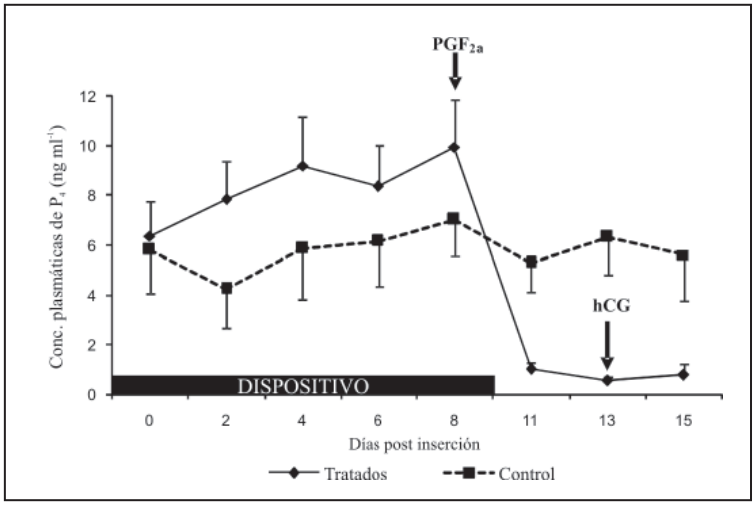

Figura 1. Concentraciones plasmáticas promedio (± EE) de P_4 (ng ml^{-1}) en los animales tratados (n = 10) y controles (n = 10) durante los 15 días posteriores a la inserción del dispositivo. Día 0: inserción del dispositivo, día 8: momento del retiro del dispositivo e inyección de $PGF_{2\alpha}$ al grupo T, día 13: aplicación de hCG a animales del grupo T.

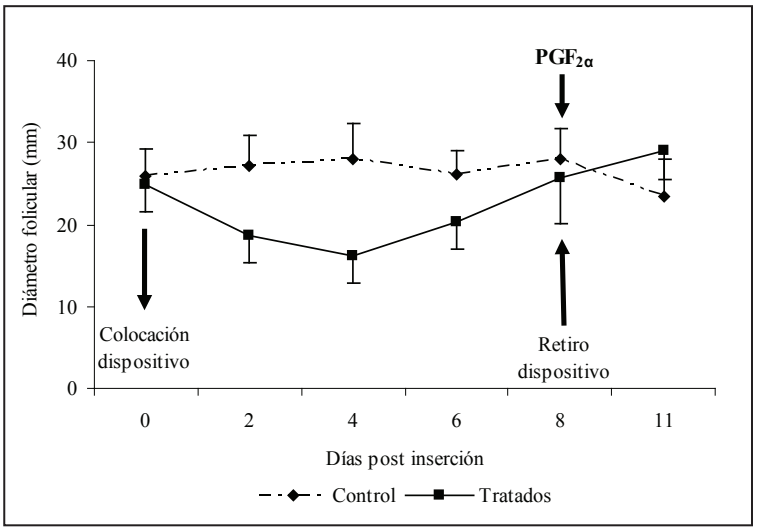

Figura 2. Diámetro folicular promedio (mm) de los animales controles y tratados durante el período de exposición y 72 horas después.

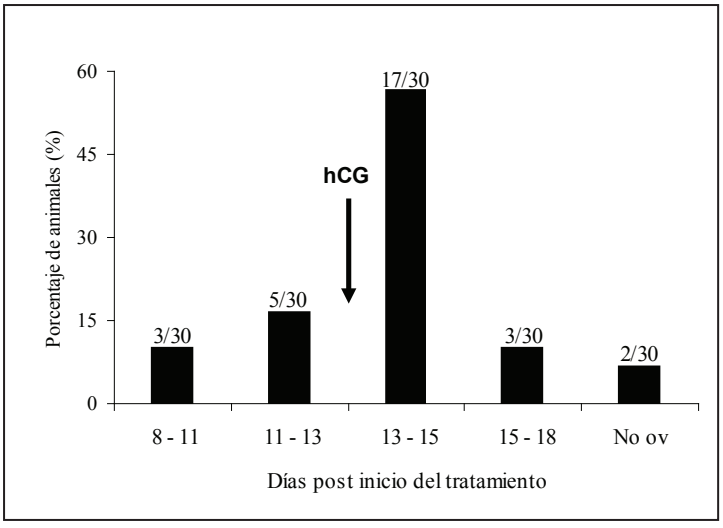

Figura 3. Distribución de las ovulaciones (expresado en porcentaje) de los animales del grupo T en los primeros 10 días post retiro del dispositivo.

Efecto del uso del dispositivo sobre el porcentaje de preñez

No se observaron diferencias estadísticamente significativas (P = 0,13) en las tasas de preñez de los animales del grupo T y C, habiéndose registrado un 77 y 95% de preñez, respectivamente en la ecografía realizada 45 días post servicio. Analizando los animales que resultaron preñados, se observó un mayor porcentaje de yeguas preñadas durante los primeros días post tratamiento en el grupo T en relación al grupo C. Sin embargo, no se reportaron diferencias estadísticamente significativas al día 10 post tratamiento (P = 0,58), momento en que se presentó la mayor diferencia entre ambos grupos (52,2 y 27,8% del total de animales preñados para el grupo T y C, respectivamente) (Figura 4).

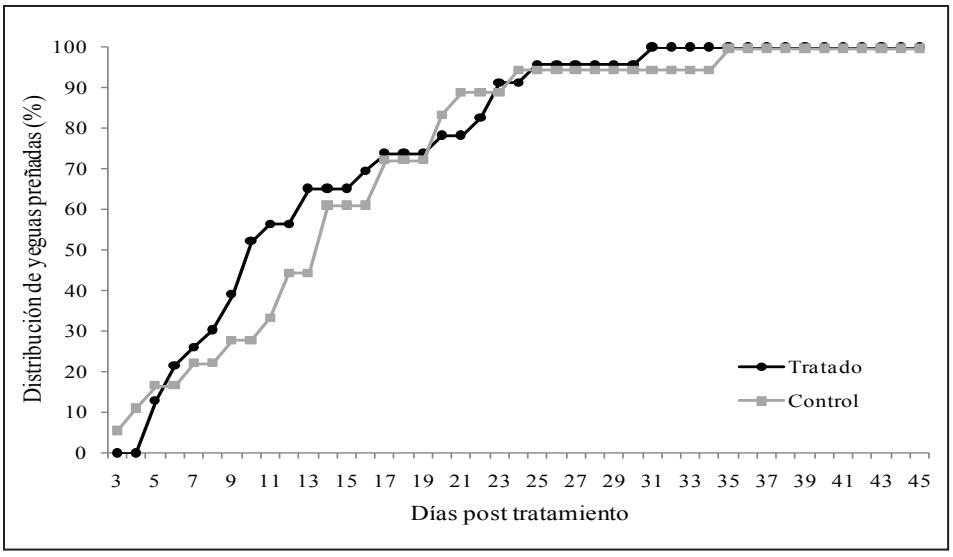

Figura 4. Distribución del porcentaje de yeguas preñadas en relación a la determinación de la edad gestacional por ecografía al día 45 post tratamiento en animales tratados y controles (100 % = total de animales preñados para cada uno de los grupos).

DISCUSIÓN

Un protocolo de control de la actividad ovárica como el planteado en el presente estudio, que incluye un dispositivo liberador de P_4 más una inyección de $PGF_{2\alpha}$ al retiro y hCG al día 5 post retiro induce una eficaz sincronización de folículos ovulatorios y ovulaciones alrededor de un determinado día en yeguas cíclicas.

Las concentraciones plasmáticas de P_4 observadas durante el tratamiento son similares a las reportadas durante la fase luteal normal de las yeguas[9] y a las registradas en estudios previos utilizando dispositivos intravaginales[10, 11], sugiriéndose que el dispositivo intravaginal utilizado en el presente estudio resulta eficaz para mantener concentraciones luteales de P_4 en yeguas cíclicas.

Durante el período de exposición a la P_4, la actividad ovárica se mantuvo relativamente inhibida, no presentándose ovulaciones más allá del día 3 post inserción del dispositivo. Daels *et al.*, 1996 reportaron resultados similares en yeguas tratadas con un progestágeno oral a partir del día 10 post-ovulación. Se postula que la presencia de un folículo dominante previo a la administración del progestágeno sumado a la capacidad de las yeguas de ovular durante el diestro podrían explicar, al menos en parte, la presencia de ovulaciones en animales tratados con P_4 durante los primeros días[4]. En el presente trabajo, hacia el final del tratamiento (día 6 post inserción del dispositivo) se observó cierto grado de desarrollo folicular en algunos animales. Esta observación podría correlacionarse con el hallazgo de dos animales en los que se registraron concentraciones plasmáticas de P_4 ligeramente por encima de 1 ng ml^{-1} a las 72 h de retirado el dispositivo, sugiriendo la ocurrencia de ovulaciones inmediatamente post retiro del mismo. Estudios previos han demostrado que la administración de una dosis de 100 mg diaria de P_4, considerada una dosis intermedia en yeguas, no logra evitar la desviación del folículo dominante[7]. Resultados similares han sido reportados en bovinos tratados con un dispositivo liberador de P_4, observándose también cierto grado de desarrollo folicular hacia el final del tratamiento[1]. Estudios realizados en equinos han reportado que se requieren dosis mayores de P_4 para lograr una inhibición completa de la ovulación, mientras que dosis menores resultan eficaces en la supresión de la conducta de celo[16].

En yeguas, a diferencia de los rumiantes, debido a la fase folicular prolongada que poseen,

resulta más eficiente lograr la sincronización de las ovulaciones y no de sus celos. Con el protocolo planteado se logró un agrupamiento de las ovulaciones alrededor del día 7 post retiro del dispositivo. De manera similar, en un estudio previo durante el cual los animales recibieron inyecciones diarias de P_4 y estradiol se logró un agrupamiento de celos y ovulaciones alrededor de los días 6 y 12 post tratamiento, respectivamente[14]. Resultados similares fueron observados por Handler *et al.*, 2007, quienes lograron sincronizar el 54,5% de las yeguas tratadas en diestro con un dispositivo intravaginal impregnado con 1,55 g de P_4 y por Newcombe *et al.*, 2002 quienes lograron agrupar un 80,7% de las ovulaciones al día 5 post retiro en yeguas tratadas con un dispositivo liberador de P_4 más aplicación de hCG durante el período de transición[15]. En el presente estudio, la administración de hCG en los animales del grupo T permitió asegurar la ovulación del folículo dominante. Varios estudios realizados en yeguas han demostrado que la administración de hCG en presencia de folículos maduros, con un diámetro ≥ 35 mm, induce la ovulación entre las 36 – 48 h post inyección, permitiendo un eficaz control de la ovulación en la especie[16, 3].

Aunque no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de animales preñados, se registró una tendencia a un mayor porcentaje de animales vacíos en el grupo de yeguas tratadas con P_4 que en el grupo C. La observación de que un 23,3% de los animales estaban vacíos al momento de la ecografía, puede ser explicada, en parte, por la pérdida del 1er servicio debido a la interrupción del celo producto de la ovulación inducida por la inyección de hCG y la consecuente ausencia de monta.

Se concluye que la utilización de un dispositivo DIB® conteniendo 1,38 g de P_4 en un protocolo como el planteado que incluye una inyección de $PGF_{2\alpha}$ al retiro y hCG al día 5 post retiro resulta en una importante sincronización de ovulaciones alrededor del 7mo día post retiro del dispositivo. Si bien el objetivo del trabajo no fue determinar el efecto del uso del dispositivo sobre los porcentajes de preñez, se registró un elevado número de animales preñados en los primeros días del servicio. Considerando que algunos estudios en yeguas sugieren la combinación de P_4 y estradiol para obtener mejores resultados[14, 12], futuros trabajos podrían evaluar la inclusión de otras hormonas al protocolo planteado para sincronizar la actividad ovárica en yeguas cíclicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cavalieri J, Hepworth G, Macmillan KL. Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronisation of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5-9 days and duration of the oestrous cycle and concentrations of progesterone following ovulation. *Anim Reprod Sci* 2004; 81: 177-193.

2. Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shephard RW, Macmillan KL. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 2006; 65: 45–64.

3. Cuervo Arengo J, Clark A. The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). *Anim. Reprod. Sci.* 118: 265-269.

4. Daels PF, McCue PM, DeMoraes MJ, Hughes JP. Persistence of the luteal phase following ovulation during altrenogest treatment in mares. *Theriogenology* 1996; 46: 799-811.

5. Flynn JD, Duffy P, Boland MP, Evans ACO. Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 285-296.

6. Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Ginther OJ. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 1320–1327.

7. Gastal EL, Bergfelt GP, Nogueira MO, Ginther OJ. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *Biol. Reprod.* 1999; 61: 1492-1498.

8. Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic concentrations of hormones during development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction* 2005; 130: 379-388.

9. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Utt MD, Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99: 213-220.

10. Handler J, Schönlieb S, Hoppen H, Aurich C. Seasonal effects on attemps to synchronized estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDTM) in mares. *Theriogenology*. 2006; 65: 1145-1158.

11. Handler J, Schönlieb S, Hoppen H, Aurich C. Influence of reproductive stage at PRID TM insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 97: 382-393.

12. Jasko DJ, Farlin ME, Hutchinson H, Moran DM, Squires EL, Burns PJ. Progesterone and estradiol in biodegradable microspheres for control of estrus and ovulation in mares. *Theriogenology*. 1993; 40: 465–478.

13. Klug E, Jöchle W. Advances in synchronizing estrus and ovulations in the mare: A mini review. *J. Equine Vet Sci.* 2001; 21(10): 474 – 479.

14. Loy RG, Pemstein R, O'Canna D, Douglas RH. Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin. *Theriogenology* 1981; 15(2): 191-200.

15. Newcombe JR, Handler J, Klug E, Meyers PJ, Jöchle W. Treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or HCG to assist ovulations. *J. Equine Vet. Sci.* 2002; 22(2): 57-64.

16. Palmer E. Control of the oestrous cycle of the mare. *J. Reprod. Fertil.* 1978; 54: 495-505.

17. Squires EL. Progesterone. En: Mc Kinnon AO, Voss JL. (Ed). *Equine Reproduction*. 1st Edition. Wiley – Blackwell. USA. 1993: 57-64

18. Webel SK, Squires EL. Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1982; 32: 193-198.

19. Wilde OR, De la Vega AC, Cruz ML. Uso de un dispositivo intravaginal para el control del estro en yeguas. *Zootecnia Trop.* 2002; 20 (4): 483-492.