

ESTIMULACIÓN CON GONADOTROPINA CORIÓICA EQUINA (ECG) DURANTE LAS FASES LUTEAL Y NO LUTEAL SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA Y CALIDAD EMBRIONARIA EN LLAMAS

EQUINE CHORIONIC GONADOTROPHIN (ECG) STIMULATION DURING THE LUTEAL AND NON-LUTEAL PHASES ON OVARIAN RESPONSE AND EMBRYO QUALITY IN LLAMAS

Shirley Evangelista V.¹, Aída Cordero R.², Alexei Santiani A.³, Martha Vásquez E.¹, Oscar Cárdenas M.⁴ y Wilfredo Huanca L.^{1,5}

RESUMEN

Se evaluó el efecto del tratamiento superovulatorio en las dos fases del ciclo ovárico sobre la respuesta folicular y la calidad embrionaria en 45 llamas hembras adultas. Se incluyeron en el estudio aquellos animales que a la ecografía presentaron un folículo preovulatorio ≥ 7 mm. Los animales se distribuyeron en tres grupos: T0 (no estimulado), T1 (tratamiento superovulatorio en fase no luteal) y T2 (tratamiento superovulatorio en fase luteal). Los animales de T1 y T2 recibieron 1 ml de LH (día 0) para sincronizar la onda folicular y 1000 UI de eCG (día 3) como tratamiento superovulatorio. Se utilizaron esponjas vaginales impregnadas con progesterona entre el día 3 y 7 para simular la fase luteal en el T2. La inducción de la ovulación se hizo mediante monta natural y aplicación de 1 ml de GnRH (día 8). La colección y evaluación de embriones se realizó 7 días post cópula (día 15) en T1 y T2. En el grupo T0 se realizó monta natural y aplicación de GnRH y 7 días después se realizó la colección de embriones. El número de folículos preovulatorios fue mayor en T1 (11.07 ± 7.53) y T2 (6.13 ± 7.11) con respecto a T0 (1.07 ± 0.26) ($p < 0.05$). El número de cuerpos lúteos fue mayor en T1 (9.27 ± 3.37) con respecto a T0 (1.07 ± 0.26) y T2 (6.47 ± 4.29) ($p < 0.05$). Asimismo, el número de embriones recuperados fue mayor en T1 (3.47 ± 4.26) con respecto a T0 (0.33 ± 0.48) y T2 (1.33 ± 2.53). Los resultados permiten concluir que la aplicación del tratamiento superovulatorio durante una fase no luteal permiten obtener una mejor respuesta ovárica y embrionaria en comparación con tratamientos superovulatorios aplicados en fase luteal.

Palabras clave: fase luteal, fase no luteal, tratamiento superovulatorio, embrión, llama

ABSTRACT

The effect of superovulatory treatment during the two phases of the ovarian cycle on follicular growth and embryo quality was evaluated in 45 sexually adult llamas. Animals

¹Laboratorio de Reproducción Animal, ³Laboratorio de Zootecnia y Producción Agropecuaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

²Laboratorio de Microbiología, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima

⁴Programa Nacional de Camélidos Sudamericanos, Estación Experimental ILLPA –INIA, Puno

⁵E-mail: whuanca2002@yahoo.com

bearing a ≥ 7 mm follicle, observed by ultrasonography, were selected and allocated into 3 groups: T0 (non-stimulated), T1 (superovulatory treatment during the non luteal phase), and T2 (superovulatory treatment during the luteal phase). Animals in groups T1 and T2 received 1 ml of LH (day 0) for synchronization of the follicular wave and 1000 IU of eCG (day 3) as superovulatory treatment. Vaginal sponges impregnated with progesterone were used on days 3 to 7 in T2 to simulate the luteal phase. The induction of the ovulation (day 8) was done through natural mating and the application of GnRH (1 ml). Embryo recovery was done 7 days after natural mating (day 15) on T1 and T2. Similarly, embryo recovery was done 7 days after natural mating and application of GnRH in T0. The number of preovulatory follicles was larger in T1 (11.07 ± 7.53) and T2 (6.13 ± 7.11) than in T0 (1.07 ± 0.26) ($p < 0.05$). The number of corpora lutea was larger in T1 (9.27 ± 3.37) than in T0 (1.07 ± 0.26) and T2 (6.47 ± 4.29) ($p < 0.05$). The number of recovered embryos was larger in T1 (3.47 ± 4.26) than in T0 (0.33 ± 0.48) and T2 (1.33 ± 2.53). The results showed that superovulatory treatment during the non luteal phase had a better response than superovulatory treatment during the luteal phase.

Key words: luteal phase, non luteal phase, superovulatory treatment, embryo, llama

INTRODUCCIÓN

Una de las limitaciones más importantes para el establecimiento de la técnica de transferencia de embriones en llamas y alpacas es la falta de un adecuado protocolo de superovulación ovárica. Esta limitación se encuentra asociada con una baja tasa de respuesta ovárica y recuperación de embriones de mala calidad. Los estudios sobre superovulación en camélidos sudamericanos han sido desarrollados en diferentes fases de desarrollo folicular. Algunos autores han tratado de simular una fase luteal mediante la administración de progesterona exógena (Bourke *et al.*, 1992a; Correa *et al.*, 1994; Bourke *et al.*, 1995; Velásquez y Novoa, 1999), o a través de la inducción de la ovulación (Bourke *et al.*, 1992a, 1995; Huanca *et al.*, 1999), mientras que otros realizaron el tratamiento superovulatorio durante la fase folicular (Bravo *et al.*, 1995; Correa *et al.*, 1997; Novoa *et al.*, 1999; Velásquez y Novoa, 1999).

En estudios previos en camélidos sudamericanos se utilizó hormonas como la eCG y FSH para inducir el crecimiento folicular

múltiple. Entre los protocolos hormonales desarrollados se señala la utilización de 1000 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Bourke *et al.*, 1992b, 1995; Correa *et al.*, 1994, 1997; Bravo *et al.*, 1995; Ratto *et al.*, 1997; Velásquez y Novoa, 1999). No obstante, el número de cuerpos lúteos obtenido ha sido muy variable (de dos a once por animal) y la tasa de colección embrionaria varió desde cero (Correa *et al.*, 1994) hasta 50% en el mejor de los casos (Del Campo *et al.*, 1995).

En alpacas, la respuesta ovárica al tratamiento superovulatorio con eCG en fase luteal inducida es mayor que la registrada en fase folicular, tanto en número como en tamaño de los cuerpos lúteos formados (Velásquez y Novoa, 1999). No obstante, en llamas, Bourke *et al.* (1995) señalan que la tasa de recuperación embrionaria es inversamente proporcional al número de cuerpos lúteos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la superovulación con eCG en fase luteal (progesterona) y en fase no luteal (sin progesterona) sobre la respuesta ovárica y la calidad embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y Animales

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA, INIEA, Puno, ubicada a 4200 msnm, en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa, Puno, durante los meses de enero a marzo.

Se utilizaron llamas hembras, de 4 a 6 años de edad y con historial de no haber presentado problemas reproductivos. Se evaluaron con un ecógrafo ALOKA SSD 500 y un transductor lineal Modo B de 7.5 MHz para determinar el estado de desarrollo folicular ovárico. Se seleccionaron 45 animales con presencia de folículos ≥ 7 mm. Los animales recibieron el mismo manejo y fueron alimentados con pastura natural, formada en su mayoría por *Stipa ichu*, *Festuca* sp. y *Calamagrostis* sp.

Procedimiento Metodológico

Diseño experimental

Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales (n = 15).

- T0: Sin tratamiento superovulatorio
- T1: Aplicación de 1000 UI eCG durante fase no luteal
- T2: Aplicación de 1000 UI eCG durante fase luteal

Tratamientos

El día de la evaluación ecográfica se consideró como el día 0. Ese día se aplicó 1 ml de Conceptal® (Intervet) en forma i.m. (GnRH equivalente a 0.0042 mg de acetato de busserelina) a los animales T0 para asegurar la ovulación, y luego se hizo una monta dirigida. La respuesta ovárica se comprobó los días 2 y 8 del estudio.

El protocolo seguido con los animales de los grupos T1 y T2 fue:

- Día 0: 1 ml de Lutropin-V® (Bioniche Animal Health Canada Inc.) en forma i.m. (equivalente a 5 mg de LH) para inducir la ovulación y sincronizar la onda folicular.
- Día 2: Evaluación de la respuesta ovulatoria mediante ecografía.
- Día 3: Aplicación de 1000 UI de eCG (Folligon®, Intervet) i.m. como tratamiento superovulatorio.
- Día 7: Aplicación de 1 ml de Iliren®, Intervet i.m. (PGF2 equivalente a 0.150 mg de triaprost) para inducir luteólisis.
- Día 8: Observación del número de folículos preovulatorios. Monta dirigida de los animales y aplicación de 1 ml de Conceptal®, Intervet i.m. (GnRH equivalente a 0.0042 mg de acetato de busserelina).
- Día 15: Evaluación de la respuesta ovulatoria.

Además, a los animales T2 se les insertó, entre el día 3 y el día 7, una esponja vaginal impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona para simular fase luteal.

Colección y evaluación de embriones

El cronograma de trabajo permitió trabajar con tres animales por día (un animal de cada grupo). El lavado uterino transcervical y colección de los embriones se realizó el día 7 post-cópula (T0: día 7; T1 y T2: día 15), según descrito por Huanca W y Huanca T (2004).

La evaluación de los embriones se realizó a un aumento de 50x. Los embriones se clasificaron de excelente (1) a intrasferible (5) siguiendo la escala de clasificación embrionaria de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) (Stringfellow y Seidel, 1990).

Cuadro 1. Respuesta ovárica en llamas a la estimulación con gonadotropina coriónica equina (eCG) durante la fase luteal (n=15) y no luteal (n=15), y sin estimulación (n=13)

	Sin estimulación (T0)	Estimulación en fase no luteal (T1)	Estimulación en fase luteal (T2)
Folículos preovulatorios			
Total (n)	16	166	98
Promedio (n ± d.e.)	1.07 ± 0.26 ^a	11.07 ± 7.53 ^b	6.13 ± 7.11 ^b
Porcentaje de ovulación			
Animales que ovularon (%)	100.0	100.0	92.3
Folículos que ovularon (%)	100.0	83.1	92.9
Formación de cuerpos lúteos			
Total (n)	16	138	91
Promedio (n ± d.e.)	1.07 ± 0.26 ^a	9.27 ± 3.37 ^b	6.47 ± 4.29 ^c
Diámetro (mm ± d.e.)	11.19 ± 0.32 ^a	10.78 ± 0.20 ^a	11.46 ± 0.31 ^a

^{a, b, c} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (p<0.05)

Análisis de Datos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism® v. 3.0. La prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y Tukey fueron utilizadas para analizar el efecto de los tratamientos T0, T1 y T2 en las siguientes variables: número de folículos preovulatorios, número de cuerpos lúteos, tamaño de cuerpos lúteos y número de embriones colectados.

Se determinó la tasa de recuperación embrionaria de los tratamientos T0, T1 y T2 al dividir el número de embriones colectados entre el número de cuerpos lúteos observados a la ecografía. El grado de asociación entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones colectados en cada tratamiento se analizó a través de una correlación.

Los datos referentes a calidad embrionaria se presentan en porcentaje, tomando en cuenta el número de embriones colectados por tratamiento (T0, T1 y T2), el número de embriones colectados por calidad y el número total de embriones colectados.

RESULTADOS

El número de folículos preovulatorios observados en el estudio se muestran en el Cuadro 1. Todos los animales T1 respondieron al tratamiento superestimulador, mientras que 2 de los 15 animales T2 no desarrollaron folículos preovulatorios luego de la aplicación del tratamiento. Asimismo, se observó la formación de once quistes foliculares (de aproximadamente 25 mm de diámetro) en el grupo T2 y tres quistes en el grupo T1.

Cuadro 2. Recuperación de embriones de llamas en respuesta a la estimulación con gonadotropina coriónica equina (eCG) durante la fase luteal (n=15) y no luteal (n=15), y sin estimulación (n=12)

	Sin estimulación	Estimulación en fase no luteal	Estimulación en fase luteal
Embriones recuperados (n)	5	52	20
Embriones por llama (n)	0.33 ± 0.32 ^a	3.47 ± 0.20 ^b	1.33 ± 0.31 ^{ab}
Recuperación embrionaria ¹ (%)	31.3%	37.7%	22.0%

¹ (Nº embriones recuperados/Nº cuerpos lúteos) x 100

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (p<0.05)

Cuadro 3. Calidad de embriones de llamas en respuesta a la estimulación con gonadotropina coriónica equina (eCG) durante la fase luteal (n=15) y no luteal (n=15), y sin estimulación (n=12)

Calidad del embrión	Sin estimulación	Estimulación en fase no luteal	Estimulación en fase luteal	Total
1 (Excelente)	3 (60%)	46 (88.5%)	8 (40%)	57 (74.0%)
2 (Buena)	1 (20%)	4 (7.7%)	6 (30%)	11 (14.3%)
3 (Mediana)	0 (0%)	0 (0%)	5 (25%)	5 (6.5%)
4 (Mala)	1 (20%)	2 (3.9%)	1 (5%)	4 (5.2%)
5 (Intransferible)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	5 (100%)	52 (100%)	20 (100%)	77 (100%)

En el grupo T1 existió un mayor número de folículos preovulatorios en comparación con el grupo T2, aunque sin diferencia estadística. Además, el diámetro promedio en T1 y T2 fue significativamente mayor que en los animales T0 que no recibieron la estimulación superovulatoria (p<0.05, Cuadro 1). Durante la monta, todos los animales de los grupos T0 y T1 presentaron receptividad al macho; sin embargo, en el grupo T2 se observó que solo cinco de los trece animales presentaron conducta de receptividad al macho, por lo que se tuvo que hacer un empadre forzado con los ocho restantes.

Todos los animales de los grupos T0 y T1 llegaron a ovular, en tanto una de los trece llamas T2 no llegó a ovular (Cuadro 1). Este animal solo fue considerado en la primera fase del estudio (respuesta ovárica).

El número de cuerpos lúteos por animal fue mayor en el grupo T1 (9.27 ± 3.37) en comparación con el grupo T2 (6.47 ± 4.29) (p<0.05); además, ambos grupos tuvieron una mayor respuesta con respecto al grupo T0 (p<0.05). Por otro lado, no existió diferencia estadística en el diámetro promedio de los cuerpos lúteos entre los tres grupos (Cuadro 1).

Calidad Embrionaria

El mayor número de embriones recuperados se presentó en el grupo T1 (n=52, Cuadro 2); sin embargo, no existió diferencia estadística en el número promedio de embriones entre los grupos T1 y T2. Asimismo, la tasa de recuperación embrionaria más alta se presentó en el grupo T1 (37.7%).

El 74.0% de embriones colectados fueron considerados de grado 1 (excelentes). Asimismo, dentro de cada grupo experimental, el 60.0, 88.5 y 40.0% de los embriones de los grupos T0, T1 y T2 fueron de grado 1, respectivamente. El análisis estadístico demostró una correlación positiva entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones colectados por grupo ($r = 0.4439$ en el grupo T1 y $r = 0.2087$ en el grupo T2).

DISCUSIÓN

La aplicación de los tratamientos de superovulación, tanto en la fase luteal como en la no luteal, fue favorable en el grupo T1 (fase no luteal), observándose el desarrollo de una nueva onda folicular con folículos ≥ 7 mm; en cambio, dos animales no respondieron al tratamiento en el grupo T2 (fase luteal) y tuvieron que ser descartados del estudio. Estos resultados podrían significar que a pesar del efecto estimulador de la FSH y LH que posee la eCG, puede ocurrir una inhibición del crecimiento folicular ocasionada por la progesterona exógena que fue aplicada para simular una fase luteal. Esta acción podría ser en forma sistémica mediante un efecto inhibitorio sobre la secreción de la GnRH y LH y, posiblemente, en forma local, mediante la interferencia de la síntesis de receptores FSH y LH, contribuyendo a inhibir el crecimiento folicular ovárico. Es decir, la aplicación de eCG, conjuntamente con la aplicación de la esponja vaginal conteniendo progesterona, podría ser la causante de la baja respuesta del grupo T2.

Asimismo, en el grupo T2, ocho de los trece animales restantes no se mostraron receptivas al momento del empadre, por lo que se forzó la monta. Este comportamiento de rechazo al macho (falta de receptividad) ha sido previamente reportado por Santiani *et al.* (2002) y plantean que este tipo de comportamiento está influenciado por la aplicación de progesterona exógena. El estrógeno es el responsable del comportamiento de receptividad sexual en alpacas y llamas (Novoa y Leyva, 1996); y si se tiene que la progesterona actúa como inhibidora de la secreción de GnRH y FSH a nivel hipofisis-hipotálamo, impediría la aromatización de los andrógenos y, por lo tanto, inhibiría la formación de estradiol a nivel ovárico.

La ovulación encontrada en el total de animales T1 se puede atribuir a los desencadenantes de la ovulación: la cópula y la aplicación de GnRH. Así mismo, y no obstante la mayor tasa ovulatoria se presentó en el grupo T2, fue en el grupo T1 donde se encontró el mayor número de folículos preovulatorios y el mayor número de embriones recuperados. Estos resultados sugieren que la aplicación del tratamiento superestimulador con eCG, conjuntamente con la aplicación de la esponja vaginal conteniendo progesterona, no produce una buena respuesta ovárica, ya que la progesterona liberada por la esponja vaginal ejerce un efecto inhibitorio en el desarrollo de folículos dominantes (Santiani *et al.*, 2002), tanto por el efecto inhibitorio a nivel del hipotálamo como por la inducción de la atresia del folículo dominante debido a la acción local de la progesterona en el ovario.

La tasa de recuperación embrionaria más alta hallada en el presente trabajo, fue la observada en el grupo T1 (37.7%), la cual se encuentra dentro del rango esperado. Dentro de los estudios reportados en la literatura, la mayor tasa de colección embrionaria en llamas y alpacas fue del 50% (Del Campo *et al.*, 1995). La baja tasa de recuperación embrionaria en el grupo T2 (22.0%) se debe,

posiblemente, al efecto negativo de niveles elevados de progesterona sobre el desarrollo del óvulo fecundado en estadios tempranos. Esto coincide con resultados en conejos donde niveles altos de progesterona causaron toxicidad en el concepto a nivel uterino durante los días 2 a 4 de vida embrionaria (Schacht y Foote, 1978).

El total de los embriones recuperados en el presente estudio (77/77) fueron calificados como fértiles y transferibles, aunque de diversos grados de calidad, lo cual es superior a lo hallado por Correa *et al.* (1997) quien obtuvo un 90.5% (19/21) de embriones clasificados como fértiles. En la actualidad, no se dispone de estudios que especifiquen la calidad de los embriones como producto de la superovulación ovárica con eCG, de allí que el presente estudio significa un gran aporte para la determinación de los grados de calidad embrionaria que se puede conseguir con dichos protocolos, así como para demostrar la factibilidad de dichos protocolos en la obtención de embriones de excelente calidad.

La formación de un grupo no tratado (T0) sirvió para determinar la respuesta ovárica y ovulatoria normal que se observa post-cópula y posterior a la aplicación de GnRH, así como para determinar la calidad de embriones producidos sin influencia de hormonas exógenas.

CONCLUSIONES

- ? Se obtiene una mejor tasa de respuesta ovárica a la superovulación con eCG cuando se aplica durante la fase no luteal, en comparación con aquella obtenida en fase luteal inducida.
- ? El número y calidad de embriones producto de una superovulación en fase no luteal es mayor en comparación con los embriones resultantes de una superestimulación en fase luteal.

LITERATURA CITADA

1. **Bourke DA, Adam C, Kyle C, Young P, Mcevoy T. 1992a.** Superovulation and embryo transfer in the llama. In: Proc. 1st Int. Camel Conference Newmarket. Dubai. p. 183-185.
2. **Bourke DA, Adam C, Kyle C. 1992b.** Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). Vet Rec 130: 424-428.
3. **Bourke DA, Kyle C, Mcevoy T, Young P, Adam C. 1995.** Superovulatory responses to eCG en llamas (*Lama glama*). Theriogenology 44: 255-268.
4. **Bravo PW, Tsutsu T, Lasley L. 1995.** Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. Small Rum Res 18(2): 157-163.
5. **Correa J, Ratto M, Gatica R. 1994.** Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterona y gonadotropinas. Arch Med Vet 26: 59-64.
6. **Correa J, Ratto R., Gatica R. 1997.** Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and eCG used individually or combination. Anim Reprod Sci 46: 289-296.
7. **Del Campo M, Del Campo H, Adams G, Mapletoft R. 1995.** The application of new reproductive technologies to South American camelids. Theriogenology 43: 21-30.
8. **Huanca W, Cárdenas O, Cordero A, Huanca T, Sapana R. 1999.** Respuesta ovárica a gonadotropinas (eCG y hCG) en alpacas durante la época seca. En: Resúmenes II Cong Mundial Camélidos. Cusco. p. 92.
9. **Huanca W, Huanca T. 2004.** Transferencia de embriones en camélidos sudamericanos. Rev Mundo Veterinario 2(6): 12-16.
10. **Novoa C, Leyva V. 1996.** Reproducción en alpacas y llamas. Publ Cient IVITA N° 26. 32 p.

11. **Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. 1999.** Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev Inv Vet, Perú* 10(1): 48-53.
12. **Ratto M, Gatica R, Correa J. 1997.** Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. *Anim Reprod Sci* 48: 325-330.
13. **Santiani A, Leyva V, García W. 2002.** Efecto inhibitorio de la progesterona sobre el desarrollo de la onda folicular en llamas. *Rev Inv Vet, Perú* 13(2): 10-17.
14. **Schacht C, Foote R. 1978.** Progesterone induced asynchrony and embryo mortality in rabbits. *Biol Reprod* 19: 534-539.
15. **Stringfellow D, Seidel G. 1990.** Manual of the International Embryo Transfer Society, 2^d ed. Champaign, Illinois: IETS. 79 p.
16. **Velásquez C, Novoa C. 1999.** Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev Inv Vet, Perú* 10(1): 39-47.