

## **Efecto de la dosis de cipionato de estradiol al finalizar un tratamiento con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF en vaquillonas.**

Butler H.M. <sup>(1)</sup>, Butler A. <sup>(1)</sup>, Etcheverry E. <sup>(1)</sup>, Cesaroni, G.C <sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>Veterinarios Asociados a Sincrovac SH, Juncal 2092 3P. Buenos Aires, Argentina.

### **Resumen**

El presente trabajo se realizó para evaluar el efecto de la dosis de cipionato de estradiol aplicada al finalizar un tratamiento con un dispositivo intravaginal liberador de progesterona sobre la tasa de gestación después de una IATF. Se utilizaron 100 vaquillonas Angus de 24 meses de edad ginecológicamente aptas, con una condición corporal de 3,5 (escala 1-5), a las que se les colocó un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIB<sup>®</sup> 0,5 g Syntex) y se les aplicó 2 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de Estradiol<sup>®</sup> Syntex). A los 8 días se retiraron los DIB y se asignaron al azar a dos grupos de 50 vaquillonas, a los que se aplicó respectivamente 0,5 ó 1,0 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn<sup>®</sup> Syntex). Simultáneamente se inyectó 500 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL<sup>®</sup> Syntex) en ambos grupos. La IATF se realizó entre las 52-53 hs después de retirados los DIB. El semen utilizado fue del mismo reproductor. El diagnóstico de gestación fue realizado por medio de ultrasonografía a los 33 días posteriores a la IATF. La tasa de preñez fue de 54 y 56 % para 0,5 y 1,0 mg respectivamente ( $P > 0,05$ ). Los porcentajes de gestación fueron comparados por medio de la prueba del Chi cuadrado ( $\alpha = 0,05$ ).

Palabras clave: Vaquillonas. IATF. Cipionato de estradiol. Fertilidad.

### **Effect of different dose of estradiol cypionate, measured by the pregnancy rate at FTAI in heifers, treated with an intravaginal progesterone device.**

#### Summary

The aim of this assay was to evaluate two different dose of estradiol cypionate (ECP) injected at the end of an intravaginal progesterone treatment. The experiment was carried out with 100 pubertal Angus heifers; 24 months old; with a body condition score of 3.5 (scale 1-5). The heifers were treated with a progesterone intravaginal device during 8 days (DIB<sup>®</sup> 0,5 g Syntex). At the beginning of the treatment all females were injected with 2 mg of BE and at the end, heifers were randomly assigned to two groups, each one of 50 females, injected with 0.5 mg or 1 mg of ECP respectively (Cipiosyn<sup>®</sup> Syntex). All the heifers received a full dose of a synthetic Cloprostenol (500 mcg) (Ciclase DL<sup>®</sup> Syntex) at the end of the treatment and were fixed time artificial inseminated 52-53 hours after the withdrawal of the device. The semen was the same for each group and the results were statistically checked by the Chi Square test. Pregnancy diagnosis was made by ultrasonography 33 days after FTAI. The pregnancy rates were 54 and 56 % for 0.5 and 1.0 mg respectively ( $P > 0.05$ ). In summary, pregnancy rate to FTAI did not differ between heifers treated with ECP dose, 0.5 or 1.0 mg, given at the end of a treatment with progesterone intravaginal device.

Key words: Heifers. Fixed-time AI. Estradiol cypionate. Fertility

#### **Introducción**

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es la biotecnología reproductiva que ha alcanzado mayor difusión y extensión en la última década. Además de la mejora que implica su implementación, la simplicidad de su aplicación ha facilitado su desarrollo. En este sentido, cualquiera sea el protocolo que se utilice, este se basa en sincronizar la onda folicular e inducir una ovulación fértil.

La sincronización de la onda folicular se logra por medio de la asociación de la progesterona liberada por el dispositivo intravaginal o un progestágeno en caso de implantes subcutáneos y la aplicación de una sal de estradiol, ya sea benzoato o valerato si se trata de un dispositivo intravaginal o un implante respectivamente <sup>(5)</sup>. Esta combinación provoca la regresión de la onda folicular presente y el surgimiento de una nueva onda sincronizada a los 3-4 días <sup>(1)</sup>.

La sincronización de la onda pre-ovulatoria de LH y por lo tanto las ovulaciones, se logra por medio de la aplicación de benzoato de estradiol (BE) al momento de retirar la fuente de progesterona <sup>(20,26)</sup> o 24 hs más tarde <sup>(6, 11,13)</sup>.

Otra forma de inducir sincronizadamente la onda pre-ovulatoria de LH, es aplicando GnRH al momento de la IATF <sup>(10)</sup>. Si bien los resultados de preñez son similares a los obtenidos cuando se aplica estradiol <sup>(7,31)</sup>, su costo es significativamente mayor (entre 20 y 40 veces más). Por lo tanto y en términos generales, el protocolo que más se utiliza es aplicar estradiol al retirar la fuente de progesterona o 24 horas más tarde.

La aplicación del BE al momento de retirar la fuente de progesterona, evita un movimiento adicional de las hembras, hecho que bajo las condiciones de explotación extensiva de la ganadería en nuestro país es de una gran relevancia.

El momento de la aplicación del BE ha generado controversias, aunque en términos generales, aplicándolo al momento del retiro o a las 24 hs, la tasa de preñez a la IATF, no ha mostrado ser diferente <sup>(2, 26,29)</sup>.

En otros trabajos se muestran diferencias en la tasa de preñez, pero es importante señalar que en esos trabajos hay dos variables interactuando: momento de aplicación y momento de la IATF <sup>(12,13, 28)</sup>.

Fernández Francia y col. <sup>(15)</sup>, y Zapiola y col. <sup>(33)</sup> no encontraron diferencias en la tasa de preñez en vaquillonas IATF luego de haber sido tratadas con BE a la 0 ó 24 hs de retirados los dispositivos. Sin embargo en ambos trabajos, el momento de la inseminación fue diferente según el momento de aplicación del estradiol.

Una opción alternativa para la sincronización de la onda pre-ovulatoria de LH y la ovulación utilizando el estradiol como inductor, es la utilización de otra sal de estradiol de vida media más prolongada, como es el cipionato de estradiol (ECP) <sup>(32)</sup>.

Se ha demostrado que con la aplicación de 0,5 mg de ECP al momento de retirar la fuente de progesterona, se logran porcentajes de preñez similares a los obtenidos con BE <sup>(8, 19, 25)</sup>.

Posteriormente, se realizaron trabajos con el objetivo de evaluar si aumentando la dosis de ECP a 1,0 ó 1,5 mg se podía mejorar la fertilidad <sup>(9, 17, 23)</sup>. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias según dosis utilizadas.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) evaluar el efecto de la dosis (0,5 ó 1 mg) de ECP aplicado al finalizar un tratamiento intravaginal con progesterona e IATF sobre la fertilidad y b) secundariamente, aumentar la casuística para determinar la dosis apropiada.

## **Materiales y métodos**

### Animales y diseño experimental

Se utilizaron 100 vaquillonas Angus de 2 años de edad con un estado corporal de 3.5 (escala 1-5) y en las que se realizó palpación por vía rectal para evaluar su aptitud reproductiva. Se consideró apta a aquella vaquillona que tuviese un buen desarrollo uterino, al menos un ovario mayor a 1,5 x 2 cm y estructuras palpables. Las vaquillonas aptas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal conteniendo 0,5 g de progesterona (DIB® 0,5 Syntex) y se les aplicó una inyección de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol® Syntex). A los 8 días los dispositivos fueron retirados y se aplicaron 500 µg de Cloprostenol sódico (Ciclase DL® Syntex) a todas las vaquillonas, asignándose al azar a dos tratamientos: T1 (n = 50) 0,5 mg de ECP y T2 (n = 50) 1,0 mg de ECP. El semen utilizado fue del mismo reproductor y de la misma partida. La IATF fue realizada entre las 52 y 53 hs de haber retirado los dispositivos con el mismo semen y un mismo operador para ambos tratamientos. El diagnóstico de gestación fue realizado por medio de ultrasonografía (Aloka SSD 500) a los 33 días posteriores a la IATF.

Los porcentajes de gestación fueron comparados por medio de la prueba de chi cuadrado ( $\alpha = 0,05$ ).

## **Resultados**

Los resultados se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de preñez obtenidos con diferentes dosis de cipionato de estradiol (ECP) al finalizar un tratamiento con DIB e IATF

Tratamiento	Preñadas (n)	Porcentaje de preñez
T1 (ECP = 0,5 mg) (n = 50)	27	54
T2 (ECP = 1,0 mg) (n = 50)	28	56

## **Discusión**

La aplicación de estradiol, en sus diferentes sales y dosis, ya sea al principio o al final de un tratamiento con progesterona para sincronizar celo y ovulación, ha sido objeto de numerosos estudios <sup>(1, 6, 8, 14,22)</sup>. Esta última aplicación es indispensable para lograr sincronizar el nacimiento de una nueva onda folicular <sup>(4)</sup>, y para obtener una ovulación concentrada entre las 58 a 64 hs de finalizado el tratamiento.

Si no se aplicase estradiol al inicio de un tratamiento con progesterona, se obtendría una baja sincronización de las ondas foliculares con una baja tasa de fertilidad <sup>(20)</sup>. Por un lado muchos folículos persistirían en el tiempo con ovocitos que retoman su meiosis antes de la ovulación con su consecuente baja fertilidad <sup>(3,27)</sup> y por el otro, la sincronización del celo, dependería más del día en el ciclo estral en que la fuente de progesterona fue aplicada

(regresión de la primera onda folicular, día 11) que de un mecanismo fiable para realizar una IATF <sup>(21)</sup>.

La aplicación de ECP al finalizar un tratamiento con progesterona fue evaluado por diferentes autores <sup>(1, 8, 14,21)</sup> para, por un lado intentar mejorar la fertilidad y por el otro, como se describió anteriormente, evitar un cuarto movimiento de las hembras tratadas como en el caso de aplicar BE a las 24 hs post finalización del mismo.

La fertilidad se podría ser mejorada por la acción del estradiol, supuestamente, ya que no está del todo esclarecido, por un incremento en la luteinización de las células de la teca interna y de la granulosa del folículo con la consiguiente mejora en la calidad del cuerpo lúteo. Durante la fase folicular, el estradiol es un factor mitógeno muy importante para la multiplicación celular de la granulosa <sup>(16)</sup>, células que van a dar origen a las células grandes del cuerpo luteo y que además producen el 80% de la progesterona, sin ser su producción dependiente de la LH <sup>(14,16, 18,)</sup>.

Luego de la ovulación, las células pequeñas del CL que tienen su origen en las células de la teca interna, multiplican su número por 5 a través de la estimulación de la LH, a su vez segregada por el *feed back* positivo del estradiol. <sup>(16, 18)</sup>.

Los resultados observados en este trabajo establecen que la dosis de ECP (0,5 ó 1,0 mg) no tiene influencia sobre la tasa de gestación obtenida en vaquillonas después de un tratamiento intravaginal con progesterona e IATF, en concordancia con los resultados obtenidos por Madero y col <sup>(21)</sup> y Uslenghi y col <sup>(30)</sup>. Otros trabajos orientados a determinar la dosis óptima de ECP y su relación con la tasa de preñez, determinaron que no hubo diferencias entre usar 0,5 ó 1,0 mg <sup>(9,17)</sup> o entre usar 1,0 ó 1,5 mg <sup>(23)</sup>.

Aunque dosis de ECP entre 0,5 y 1,0 mg no tendría efecto sobre la tasa de fertilidad, sí la podría tener sobre el comportamiento de las vaquillonas durante el celo. Reames y col. <sup>(24)</sup> en vacas ovariectomizadas y utilizando diferentes dosis de 17beta estradiol al final de un tratamiento con progesterona, demostraron que hubo diferencias en la presentación del estro (porcentaje de hembras, momento del comienzo, duración e intensidad). Este punto puede ser de relevante importancia cuando se decide no realizar una IATF luego de un tratamiento con progestágenos y detectar celo (ej. en transferencia de embriones). Asimismo, una conducta exagerada de celo puede ocasionar una actividad de monta exagerada que puede producir lesiones, aunque raras veces, ocurre.

Por lo tanto, si bien no habría inconvenientes en incrementar la dosis en cuanto a fertilidad se refiere, se debería tener presente las consideraciones antes mencionadas.

Nosotros consideramos que existe una aplicación práctica el tener presente que un rango de 0,5 a 1,0 mg de ECP no afecta la fertilidad. En rodeos comerciales de grandes cantidades de animales, no es necesario un enrasado perfecto de la dosis a administrar, existiendo una flexibilidad de la misma en la que no se verá afectado el resultado de la fertilidad.

## Bibliografía

1. Bo, G.A.; Adams G.P.; Caccia, M.; Martinez, M.; Pierson, R.A. y Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol. *Animal Rep. Sci.* 39: 193-204.

2. Butler H.M. 2002. Implementación de la inducción de la ovulación y/o sincronización de celos asociada a la IATF en diferentes situaciones. Memorias Primeras Jornadas Taurus de Reproducción Bovina. 12 y 13 de Septiembre, Buenos Aires, Argentina, p. 24-33.
3. Bigelow, KL; Fortune, JE. 1998. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biology of reproduction* 58, 12441-1249.
4. Bolt,DJ; Scott,V, and Kiracofe,G. 1990. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-RH treatment in ovariectomized beef heifers. *Anim. Rep. Sci.* 23: 263-271.
5. Callejas, S. 2005. Control farmacológico del ciclo estral bovino: bases fisiológicas protocolos y resultados. *Taurus.* 7 (25): 16-35.
6. Cavalieri, J.; Coleman, C.; Rodrigues, H.; Macmillan, K.L. and Fitzpatrick, L.A. 2002. The effect of timing of administration of estradiol benzoate and characteristics of estrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronized with a progesterone releasing intravaginal insert. *Aust. Vet J.* 80: 217-223.
7. Cesaroni, G.; Butler, H.M.; Mc Dermott, E.; y Cano, A. 2000. Preñez de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo después de un tratamiento con CIDR asociado con GnRH o con benzoato de estradiol aplicado 0 o 24 hs pos tratamiento. *Taurus* 2: (6): 20-25.
8. Cesaroni, G.; Butler, H.M. y Durand, M.J. 2007. Evaluación del uso de esteroides de estradiol sobre la tasa de fertilidad a la IATF en vacas secas, tratadas con dispositivos intravaginal con progesterona. *Taurus* 36:12-18.
9. Chesta, P.; Brandan, A.; Cuestas, G.; Quiñones, G.; Lozano, P. y Tribulo, H. 2009. Evaluación de diferentes dosis de cipionato de estradiol sobre la tasa de preñez en inseminación artificial a tiempo fijo en vaquillonas de 15 meses de edad. Octavo Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC, Córdoba, Argentina. En CD.
10. Colazo, M.G.; Kastelic, J.P.; Martinez, M.F.; Whittaker, P.R.; Wilde, R.; Ambrose, J.D.; Corbett, R. y Mapletoft, R.J. 2004. Fertility following fixed timed AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and feed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. *Theriogenology* 61: 1115-24.
11. Cutaia, L.; Moreno, D.; Villata, L. and Bo, G. 2001. Synchrony of ovulation beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. Annual Meeting International Embryo Transfer Society, Omaha, Nebraska, USA. *Theriogenology* 55: 244.
12. Cutaia, L.; Balla, E. y Bo, G.A. 2005a Efecto del momento de administración de benzoato de estradiol o cipionato de estradiol para inducir la ovulación en vaquillonas tratadas con DIB e inseminadas a tiempo fijo. Sexto Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, p. 394.
13. Cutaia, L.; Alisio, L.; Bertero, F.; Avilés, M. y Bo, G.A. 2005b. Tasa de preñez en vaquillonas en vacas sincronizadas con DIB y benzoato de estradiol en el momento de retiro del dispositivo o 24 hs más tarde Sexto Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, p. 395.
14. M.F. Sá Filho, J.E.P. Santos, R.M. Ferreira, J.N.S. Sales and P.S. Baruselli. 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 76: 455-463.
15. Fernandez Francia, G.; Lares, S.; Formía, N.; Giovaninni, R. y Videla Dorna, I., RL de la Sota. 2005 Eficacia de la utilización de benzoato de estradiol aplicado a la 0 o 24 hs de retiro de un dispositivo intravaginal con progesterona sobre la tasa de preñez en vaquillonas para leche. Sexto Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, p. 401.
16. Fields, M.J. and Fields P.A. 1996. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology* 45: 1295-1325.
17. Gonzalez Chaves, S.; Cledou, G.; Cabodevila, J. y Callejas S. 2009. Comparación del efecto de dos dosis de cipionato de estradiol administradas al momento de retirar un dispositivo intravaginal con progesterona en vaquillonas de 15 meses IATF. Octavo Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, 2009. PAGINA

18. Gordon, D., Niswander, J., Juengel, L., Silva, P.J., Rollyson, M.K. and McInstush, E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, vol 80. January pp 1-29.
19. Izando, L.F.; Quezada, L.M. y Ortiz, J.J. 2007. Cipionato de estradiol vs benzoato de estradiol en la sincronización de celo en vacas y vaquillonas aneloras. Séptimo Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina p. 254.
20. Manes, J. 2007. Efecto de la duración de un tratamiento con progestágenos y el momento de la aplicación de benzoato de estradiol sobre la dinámica folicular de vacas cíclicas y en anestro posparto. Tesis MSc Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina.
21. Madero, S.; De Dominis, O.; Cantallops, F.; Uslenghi, G.; Callejas, S. 2007. Efecto de dos dosis de cipionato de estradiol administradas al finalizar un tratamiento con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 226 Abst.
22. Macmillan, KI and Peterson, AJ. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 1-25.
23. Ramos, M.; Kap Perret, C.; Fuchs, E.; Chesta, P. y Bo, G. 2009. Tasas de preñez a la IATF en vacas holando argentino utilizando diferentes dosis de cipionato de estradiol. Octavo Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina. En CD.
24. Reames, T.B. Hatler, S.H. Hayes, D.L. Ray and W.J. Silvia. 2011. Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 $\beta$  in ovariectomized dairy cows. *Theriogenology* 75: 233-240.
25. Rocha, D.C.; Beskow, A.; Azeredo, D.M.; Ponsati, D.M.; Kuhl, F.N.; Mattos, R.C. y Gregory, R.M. 2005. Efecto del uso de distintos esteres de estradiol como inductor de ovulación sobre la tasa de preñez en programas de inseminación artificial a tiempo fijo. Sexto Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, p. 419.
26. Ross, J.P. 2002. Sincronización del celo y de la ovulación en vacas con cría al pié mediante el uso de acetato de medroxiprogesterona y benzoato de estradiol. Tesis MSc Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 84 p.
27. Sirois, J.; Fortune, E., 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, vol 127, nº2.
28. Sorroarain, N.; Vaca, R.J.A.; Fernandez Francia M.G.; Lares, S.F.; de la Sota R.L. y Baldo, A. 2005. Eficiencia de la utilización de benzoato de estradiol a las 0 o 24 horas de retirado el dispositivo intravaginal con progesterona para inducir la ovulación en vacas núlparas para carne. Sexto Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, p. 425.
29. Torquati, L.J.; Zalazar, P.; Alberio, R. y Callejas, S. 2006. Preñez de vacas con cría inseminadas a tiempo fijo después de diferentes tratamientos de inducción de celos y de momentos de aplicación de benzoato de estradiol (BE). *Rev. Arg. Prod. Anim.* 26 (1): 291-292.
30. Uslenghi, G.; Chayer, R. y Callejas, S. 2010: Efectividad del cipionato de estradiol inyectado al final de un tratamiento con progesterona sobre la eficiencia reproductiva. *Rev. Vet.* 21: 1,55-58.
31. Vaca R.J.A.; Prando, A.; Baldo, A. y de La Sota R.L. 2007. Tasa de preñez luego de la utilización de benzoato de estradiol 24 hs antes o GnRH en el momento de la IATFF en vacas múltiparas para carne. Séptimo Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina. p. 268.
32. Vynckier, L.; Debackere, M.; De Kruif, A.; Coryn, M. 1990. Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate-a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1: 36-42.
33. Zapiola, A.; Echeverría, S. y Callejas, S. 2005. Sincronización de celos en vaquillonas Angus utilizando benzoato de estradiol al momento o 24 horas después del retiro de un dispositivo intravaginal con progesterona (nuevo o usado). Sexto Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC. Córdoba, Argentina, p. 430.