

# Superovulatory response and embryonic quality of Brahman suckling cows synchronized with low doses of FSH under conditions in southern Mexico

## Respuesta superovulatoria y calidad embrionaria de vacas Brahman lactando sincronizadas con dosis bajas de FSH en condiciones del sur de México

Ponce-Covarrubias, José L.<sup>1</sup>; Mendoza-Medel, Gabriel<sup>2</sup>; Hernández-Ruiz, Pedro E.<sup>1</sup>; Pineda-Burgos, Blanca C.<sup>1</sup>; Valencia-Franco, Edgar<sup>2</sup>; Velázquez-Morales, José V.<sup>3</sup>; García y González, Ethel C.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Escuela Superior de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 3. Tecpan de Galena, Guerrero, México. C.P. 40900. Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Cuajinicuilapa, Guerrero, México. C. P. 41940.

<sup>2</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Agrohídrica-Programa Ingeniero Agrónomo Zootecnista. Tlatlauquitepec, Puebla, México. C.P. 73900. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Programa de Ganadería. Texcoco, Estado de México, México, C.P. 56230.

\*Autor para correspondencia: eth\_cat@hotmail.com

### ABSTRACT

**Objective:** Assess the superovulatory response and embryonic quality of a group of suckling Brahman cows undergoing a low dose FSH protocol.

**Methodology:** In the study 33 multiparous suckling Brahman cows were superovulated. For this, the females were synchronized with CIDR (insertion day 0) and decreasing doses of FSH (day 5: 250 mg FSH, day 6: 200 mg FSH, day 7: 150 mg), on day 9 and 10 artificial insemination was performed (IA); finally on day 17 the washing was done to collect the embryos. The embryos were collected with a Foley catheter and the contents were deposited in a 100×100 mm square Petri dish with a squared bottom for the subsequent search for embryos in the microscope provided with an increase of 20 to 30 X. The embryos were classified according to their morphology and stage of development on a scale from 1 (stage of a cell) to 9 (stage of hatched blast) and quality as 1 (excellent), 2 (good), 3 (regular) and 4 (degenerate).

**Results:** Of the 100% of the cows treated 363 embryos were obtained: 41.8% were viable; 65% were classified as hatched blastocyst of quality 8 and 34.8% of quality 7. Of the embryos classified as hatched blastocyst, 60.6% were of excellent quality, 28.28% of good quality and 11.11% of regular quality. The average of viable embryos per cow was 2.9% and 1.9% transferable.

**Implications:** It's difficult to superovulate lactating cows, due to the control of calves during the experimental process, this type of treatment also is not recommended due to the metabolic and reproductive expenditure to which these females are subjected.

**Conclusions:** Suckling Brahman cows have a low superovulatory response when they are synchronized with a low dose FSH protocol.

**Key words:** synchronization, hormones, oocytes, lactating cows.

## RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la respuesta superovulatoria y calidad embrionaria de un grupo de vacas Brahman lactando sometidas a un protocolo de dosis bajas de FSH.

**Metodología:** en el estudio fueron superovuladas 33 vacas de raza Brahman múltiparas lactando. Las hembras fueron sincronizadas con CIDR (inserción día 0) y dosis decrecientes de FSH (día 5: 250 mg FSH, día 6: 200 mg FSH, día 7: 150 mg), el día 9 y 10 se practicó la inseminación artificial (IA); finalmente el día 17 se realizó el lavado para la recolección de embriones. Los embriones fueron colectados con una sonda Foley, y el contenido fue depositado en una caja de Petri cuadrada de 100 × 100 mm con fondo cuadrículado para la posterior búsqueda de embriones en el microscopio provisto de un aumento de 20 a 30 X. Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su morfología y estadio de desarrollo en una escala del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocito eclosionado) y calidad como 1 (excelente), 2 (bueno), 3 (regular) y 4 (degenerado).

**Resultados:** Del 100% de las vacas tratadas se obtuvieron 363 embriones: 41.8% fueron viables; 65% se clasificaron como blastocito eclosionado de calidad 8 y 34.8% de calidad 7. De los embriones clasificados como blastocito eclosionado, 60.6% fueron de calidad excelente, 28.28% de calidad buena y 11.11% de calidad regular. El promedio de embriones viables por vaca fue de 2.9% y 1.9% transferibles.

**Implicaciones:** Es difícil superovular vacas lactando, por el control de los becerros durante el proceso experimental, y no es recomendable este tipo de tratamiento por el gasto metabólico y reproductivo a las que son sometidas las hembras.

**Conclusiones:** Las vacas de raza Brahman lactando tienen una respuesta superovulatoria baja cuando son sincronizadas con un protocolo de dosis bajas de FSH.

**Palabras clave:** sincronización, hormonas, ovocitos, vacas lactando.

te) (Blondin, 2015). La variabilidad en la respuesta a los tratamientos de superovulación por las donadoras de embriones, continúa siendo el mayor problema en los programas comerciales de transferencia de embriones (Bó *et al.*, 2009). El éxito de los programas de superovulación y recolección de embriones en vacas donadoras depende de algunos factores; entre los que destacan: las condiciones ambientales, el manejo reproductivo y hormonal practicado a las hembras donadoras (gonadotropinas y gonadotropina coriónica equina (eCG), hormona folículo estimulante (FSH), dinámica folicular de cada donante, tales como el tamaño de la población folicular o el número de ondas foliculares (Bó y Maplatoft, 2014; Mikkola y Taponen, 2017; Bó *et al.*, 2018).

Al respecto Hafez *et al.* (1963) mencionan que el uso de eCG en los protocolos de superovulación en ganado bovino se convirtió en el protocolo de superovulación estándar. Así, la aplicación de entre 2000 y 3000 UI de eCG el día 16 del ciclo estral, seguido de 10 mg de estradiol 17- $\beta$  (entre los días 19 y 20) y 2000 UI de hCG en el día 21 del ciclo, promovió buenos resultados. Posteriormente Gordon (1975) lo confirmó. Sin embargo, los protocolos a base de eCG traen algunos problemas; como estimulación ovárica prolongada, folículos no ovulados y mala calidad embrionaria debido a que la vida media de la hormona es de 40 h y su duración en sangre es hasta de 10 d. Esto ha llevado al uso de otras hormonas para superovular a las hembras bovinas; tal es el caso de la FSH considerado actualmente como el protocolo estándar para la superovulación en vacas; dado que dosis reducidas de FSH hasta por 7 d proporciona resultados favorables

## INTRODUCCIÓN

En México y en el mundo, se transfieren más de 500,000 embriones en el ganado bovino al año. El comité de recuperación de datos de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones reportó en el año de 2013 un incremento en la recolección de embriones en África (11.2%), América del Norte (10.3%), Asia (4.7%), y una disminución en América del Sur (14.2%) y Oceanía (6.5%); Europa se mantuvo estable (caída del 0.4%; Perry, 2016). Las mejoras conseguidas en el área de reproducción bovina, específicamente en la superovulación de vacas, han facilitado la conveniencia de los protocolos hormonales, pero no para incrementar el número de embriones transferibles. Dichas mejoras consisten en la sincronización de ondas foliculares e inseminación artificial a tiempo fijo; sin embargo, una de las limitantes es lo impredecible de las ondas foliculares, debido a la variabilidad entre individuos a la respuesta ovárica y estimulación de las gonadotropinas (Mikkola y Taponen, 2017; Pérez-Sandoval *et al.*, 2019). Los porcentajes de producción de embriones han permanecido estáticos a través del tiempo (6.2 embriones viables colectados por donan-

en los protocolos de superovulación en vacas (Bó y Ma-platoft, 2014; Pérez-Sandoval et al., 2019). En hembras bovinas la administración intramuscular (i.m.) de pFSH al 2.0% de hialuronano indujo una respuesta superovulatoria similar a la administrada de manera i.m. pero dos veces al día durante 4 d (Bó et al., 2018). En un estudio donde superovularon vacas múltiparas con una dosis de 500 UI registraron en promedio 11.9 embriones transferibles por hembra (Mikkola, 2017). Hussein et al. (2017) y Pérez-Sandoval et al. (2019) sincronizaron vacas con dosis bajas (25 y 30 mg) de FSH y encontraron que las hembras que recibieron la dosis de 25 mg produjeron mayor cantidad de embriones transferibles que aquellas que recibieron la dosis de 30 mg. No es común el uso de vacas amamantando como donadoras para obtener embriones, debido a que éstas tienen bloqueado el eje hipotálamo-hipofisiario por los opiáceos que liberan durante el amamantamiento. Sin embargo, sería interesante utilizar vacas en dicho estado fisiológico para aprovechar el alto valor genético y que estas sean más eficientes en los sistemas de producción de ganado de registro. Por lo antes mencionado, se evaluó la respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en un grupo de vacas de raza Brahman sometidas a un protocolo de superovulación a base de dosis bajas de FSH.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el rancho de ganado comercial Brahman de registro "El Aguacatillo", en Ometepec, Guerrero, México. La región se localiza en el trópico a 16° 43' 26" N y 99° 07' 24" O, presenta temperaturas máximas (37 °C) durante los meses de mayo-agosto (verano) y mínimas (19 °C) durante los meses de diciembre-marzo (invierno), la precipitación promedio anual es de 1,100 mm (García, 1983). Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana; NOM-062-ZOO-1999, con especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de los animales de laboratorio (SAGARPA, 2001).

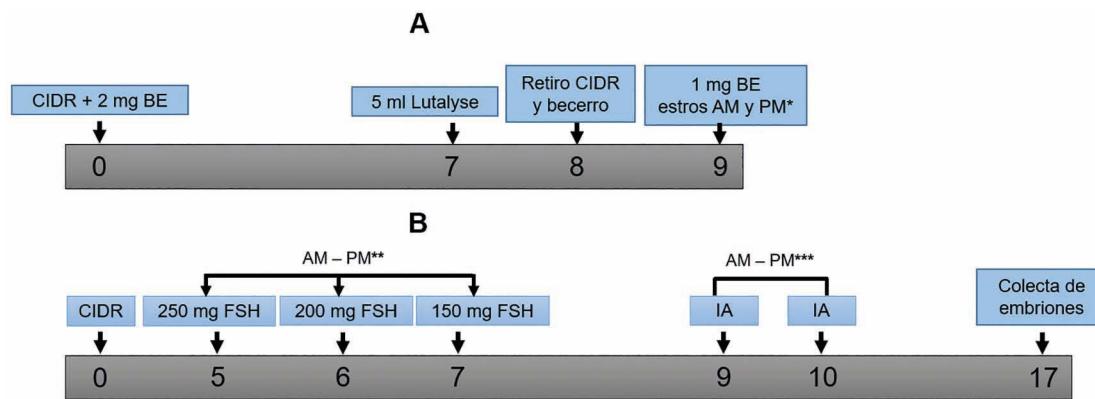
## Animales experimentales y descripción del hato

Para el estudio se superovularon 33 vacas donadoras de raza Brahman múltiparas, con becerro al pie de seis meses de edad y con peso promedio (510±50 kg), edad (7±2 años), condición corporal (3.5±1; escala de 1 a 5) (Pereira et al., 2018) y ausencia de alteraciones visibles en el tracto reproductivo. El hato contó con 180 vacas adultas de registro que se utilizan principalmente como vientres para producir becerros que posteriormente servirán para sementales de registro para venta local, nacional e internacional. Durante el periodo de empadre, las hembras fueron sometidas a tratamientos hormonales para sincronizar el celo y posteriormente ser inseminadas a tiempo fijo. Desde hace seis años comenzaron a producir embriones en vacas donadoras con excelentes características genéticas, esto con el fin de realizar transferencias de embriones en las vacas receptoras del hato. Todos los animales del rancho llevan un control reproductivo y sanitario para asegurar que no haya problemas en el funcionamiento normal del hato. A todos los animales se les suplementó con sales minerales (Fosforisal BE®-Purina), fueron desparasitadas dos veces al año con Dectomax (Laboratorio Zoetis AR). Asimismo, todos los animales se vacunaron contra rabia paralítica (Bayovac Derriengue; Laboratorio Bayer HealthCare) y carbón sintomático (Laboratorio Bayer HealthCare). Adicionalmente a las hembras donadoras y receptoras se les aplica BOVI-SHIELD® GOLD FP 5 (Laboratorio Zoetis AR). Todas las vacas donadoras fueron sincronizadas para hacer coincidir la aparición de una nueva oleada folicular con el inicio del protocolo de superovulación. Posteriormente a las mismas hembras se les aplicó un protocolo de superovulación para la recolección de embriones (Figura 1).

## Recolección de embriones

Se insertó una sonda Foley de dos vías por vía vaginal, fijándola en el cuerpo del útero para realizar las infusiones y colecciones uterinas. Se utilizaron 1.5 L de solución





**Días de muestreo: A – Sincronización de la oleada folicular y B – Protocolo de superovulación**

**Figura 1.** Definiciones de siglas de las hormonas: CIDR-liberación controlada de progesterona (1.9 g de progesterona; Zoetis®), benzoato de estradiol (BE; Syntex® S.A.), Lutalyse (Zoetis®), hormona foliculo estimulante (FSH; Folltropin-V® - Syntex® S.A.), vía de administración: (CIDR) intravaginal e (BE, Lutalyse, FSH) intramuscular. En la parte A se observó el estro (6:00 a 6:30 h) y (18:00 a 10:30 h)\* con un toro vasectomizado. En la parte B se aplicó la primera (250 mg), segunda (200 mg) y tercera (150 mg) dosis de FSH (7:00 y 19:00 h)\*\* y \*\*\*; a la misma hora se aplicó la inseminación artificial.

amortiguadora fosfatada, suplementada con glucosa, piruvato, antibióticos y 0.3% de alcohol polivinílico (PBSm). Se vació el contenido del filtro en una caja de Petri cuadrada de 100 × 100 mm con fondo cuadrículado para la posterior búsqueda de embriones en el microscopio provisto de un aumento de 20 a 30 X. En una caja de Petri de 35 mm con solución de mantenimiento (PBSm con albúmina sérica bovina) se colocaron los embriones que fueron encontrados. Estos se clasificaron de acuerdo a su morfología y estadio de desarrollo en una escala del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocito eclosionado) y según su calidad como 1 (excelente), 2 (bueno), 3 (regular) y 4 (degenerado). Durante el periodo experimental las vacas se encontraban en pastoreo en potreros de pasto Tanzania (*Panicum maximum*) y pasto Estrella (*Cynodon nlemfuensis*); de 17:00 h a 5:00 h se mantenían en corra-

les abiertos donde se les proporcionaba una suplementación de ensilaje de maíz (0.5 kg por vaca), bloques de sales minerales y agua a libre acceso. Los datos fueron sometidos a estadística básica usando procedimientos (MEANS UNIVARIATE, FREQ) de SAS 2004, así se calculó la cantidad de embriones producidos por vaca superovulada, además, se obtuvieron medias generales por cada hembra sometida al tratamiento hormonal. Los resultados se presentan en proporciones.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 33 vacas Brahman donadoras que fueron superovuladas se obtuvieron en total 363 embriones

(100%), de los cuales solo el 41.8% de estos fueron viables; de los embriones viables, 65% se clasificaron como blastocisto eclosionado de calidad 8 y el 34.8% como blastocisto de calidad 7. De los embriones clasificados como blastocisto eclosionado, 60.6% fueron de calidad excelente, 28.28% de calidad buena y 11.11% de calidad regular. El promedio de embriones viables por vaca fue de 2.9% y embriones transferibles por vaca sometida al tratamiento hormonal fueron 1.9% (Figura 2). Los resultados muestran que las vacas de raza Brahman amamantando tienen una respuesta superovulatoria aceptable cuando son sincronizadas con dosis bajas de FSH. Sin embargo, el porcentaje de embriones viables y transferibles por vaca es bajo. Algunos estudios realizados en vacas muestran una respuesta superovulatoria diferente a los encontrados en el presente estudio (Sophon *et al.*, 2003; Leingcharoen *et al.*,



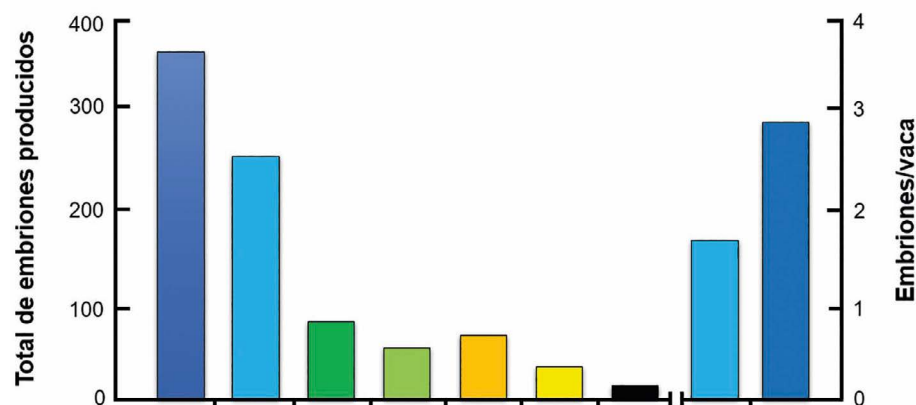
2010; Bó y Mapletoft, 2014; Bó et al., 2018; Pérez-Sandoval et al., 2019). En efecto, Sophon et al. (2003) superovularon vacas de la raza Brahman con 200 mg de FSH y encontraron resultados superiores a los del presente estudio (promedio de 10.4 embriones por vaca de los cuales únicamente 4.3 embriones fueron transferibles). De la misma manera, Leingcharoen et al. (2010) y Pérez-Sandoval et al. (2019) superovularon vacas con una dosis mayor (400 mg) de FSH y obtuvieron una respuesta superovulatoria también diferente (10.5 embriones transferibles) a la obtenida en el presente estudio y al estudio de Sophon. Esto se debe

muy probablemente a que las vacas tratadas con dosis bajas de FSH (200 - 250 mg), muestran una pobre respuesta superovulatoria; una explicación a esto es que las hembras bovinas se encontraban amamantando y aunque se les haya retirado el becerro los opiáceos producidos por el efecto del amamantamiento no permitieron que ocurriera una buena respuesta ovulatoria.

La calidad de los embriones en vacas superovuladas es importante ya que estos embriones son potenciales a ser transferidos. En efecto, en el presente estudio el 60.6% de los embriones recuperados fue de calidad excelente. Acorde con estos resultados Ling et al. (1995) mencionan que la edad del embrión después de la inseminación artificial es de entre 6 a 7 d (mórula o blastocisto temprano), momento apropiado para ser transferidos a vacas receptoras. Estos resultados son interesantes, ya que las vacas Brahman amamantando sincronizadas con dosis bajas de FSH tienen una respuesta ovulatoria y calidad embrionaria general aceptable para las condiciones en que se realizó el presente estudio.

Si bien, en el presente estudio el número de embriones viables (2.9%) y transferibles (1.9%) por vaca fue bajo; resultado acorde a lo publicado en vacas de leche (11% vs. 7%; Mikkola, 2017) es importante, ya que estas vacas productoras de leche fueron usadas como donadoras cuando estaban en lactancia. Las razones por las que ocurrió esto en estas vacas productoras de leche y las vacas de raza Brahman usadas en el presente estudio se debe a que de alguna manera ambas producían leche, y es probable que los péptidos opioides endógenos par-

## VACAS DONADORAS SUPEROVULADAS



**Figura 2.** En el eje izquierdo se presenta el total de embriones producidos por las vacas donadoras (■): embriones viables (■), blastocisto eclosionado calidad 8 (■) y blastocisto calidad 7 (■). De los blastocistos eclosionados: calidad excelente (■), calidad buena (■) y calidad regular (■). En el eje de la derecha se presentan los promedios de los embriones producidos por vaca (■) y de los embriones transferibles (■).

ticipen como neurotransmisores intermediarios a nivel central entre el estradiol y las neuronas productoras de GnRH, inhibiendo su síntesis.

## CONCLUSIONES

**Las vacas** de raza Brahman lactando tienen una baja respuesta superovulatoria cuando son sincronizadas con un protocolo a base de dosis bajas de FSH. En estas circunstancias no se recomienda el uso hormonal cuando estas hembras se encuentran lactando. Sin embargo, el uso de vacas lactando como donadoras de embriones justifica la inversión y la facilidad en el manejo ya que al amamantar a su cría pueden ser usadas para obtener embriones transferibles, así como reducir el tiempo y los gastos de producción.

## LITERATURA CITADA

- Breen, S. M., Rodríguez-Zas, S. L. & Knox, R. V. (2006). Effect of PG600 and adjusted mating times on reproductive performance in weaned sows. *Animal Reproduction Science*, 93: 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.010>
- Blondin, P. (2015). Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction*, 12(3): 356-358. <https://doi.org/10.1080/09613218.2015.993536>
- Bó, G. A., Carballo, D., Tribulo, A., Tribulo, H., Tribulo, R., Rogan, D. & Mapletoft R. J. (2010). New approaches to superovulation in the cow. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1): 106-112. <https://doi.org/10.1071/RD09226>
- Bó, G. A. & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81: 8-48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bó, G. A., Rogan, D. R. & Mapletoft, R. J. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle:

- What we have learned. *Theriogenology*, 112: 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>.
- García, E. (1973). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 2da ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F, México. pp: 11-90.
- Gordon, I. (1975). Problems and prospects in cattle egg transfer. *Irish Veterinary Journal*, 29: 21–62.
- Hafez, E. S., Sugie, T. & Hunt, W. L. (1963). Superovulation and related phenomena in the beef cow: effect of oestrogen administration on production of ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, 5: 381–388. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0050381>
- Hussein, A. M., Al-Shakaili, Y. O., Al-Ismaïly, A. N. & Al-Alawi, H. H. (2017). Effect of different doses of FSH on superovulation, production and quality of embryo in North Omani Cattle breed. *Indian Journal of Animal Research*, 51: 8–14. <https://doi.org/10.18805/ijar.v0i0F.7003>
- Leingcharoen, N., Thungsanthia, A., Apimeteetumrong, M., Thijae, K. & Glampoon, B. (2010). Superovulatory response of Thai Black cattle to three different doses of FSH. *Proceedings of the 7th Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus Annual Conference*, Bangkok, Thailand, December 3-7, 2010, pp. 278-285.
- Ling, Z., Shi, D. S., Huang H. M., Wei, Y. M., Jiang R. & Lu, K. H. (1995). Pregnancy rate following transfer of IVF bovine embryos at different developmental stages. *Theriogenology*, 43: 266. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)92420-E](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)92420-E)
- Mikkola, M. & Taponen, J. (2017). Embryo yield in dairy cattle after superovulation with folltropin or pluset. *Theriogenology*, 88: 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.052>
- Mikkola, M. (2017). Superovulation and embryo transfer in dairy cattle – effect of management factors with emphasis on sex-sorted semen. To be presented, with the permission of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, for public criticism in Walter Hall, Agnes Sjöbergin katu 2, Helsinki, on June 2nd, 2017, at 12 noon.
- Pereira, L. L., Ferrreira, A. P., Vale, W. G., Sequire, L. R., Neves, K. A. L., Morini, A. C., Monteiro, B. M. & Minervino, A. (2018). Effect of body condition score and reuse of progesterone-releasing intravaginal devices on conception rate following timed artificial insemination in nelore cows. *Reproduction Domestic Animals*, 53(3): 624-628. <https://doi.org/10.1111/rda.13150>
- Pérez-Sandoval, L., Dubeibe-Marín, D., Chávez-Rodríguez, A., García-Jiménez, J. & Velasco-Acosta, D. (2019). Respuesta superovulatoria en vacas donantes Brahman usando ablación folicular previo a protocolos de superovulación. *Revista MVZ Córdoba*, 24(2):7203-7208. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1309>
- Perry, G. (2016). Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. International embryo technology society (IETS) data retrieval committee. [En línea]. 2016. [https://www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_Report\\_2016\\_v2.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf)
- SAGARPA. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación, 22 de Agosto de 2001. <http://www.sagarpa.gob.mx/normateca/Normateca/SENASICA%20NORM.%20143.pdf>. Consultado 20 julio de 2019.
- Sophon, S., Tasripoo, K. & Jintana, R. (2003). Embryo transfer in Brahman cattle: effect of protein level in concentrates on efficiency of embryo production. *Proceedings of the 41th Kasetsart University Annual Conference*, Bangkok, Thailand, February 3-7. pp. 96-102.

