

# SUPEROVULACION EN LA OVEJA DURANTE EL ANESTRO ESTACIONAL CON eCG Y ANTI-eCG

Rubianes E<sup>(1)</sup>, Ungerfeld R., Ibarra D. y Kmaid S.

## RESUMEN

Se aplicó un tratamiento superovulatorio durante el anestro estacional a 18 ovejas Corriedale de 8 dientes. El mismo consistió en pesarios de medroxiprogesterona (60 mg MAP) durante 13 días y 1200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG ó PMSG) 48 hs previo al retiro de los mismos. A las 12 hs de retirados fueron administrados 2.5 ml de suero anti-eCG crudo a 9 animales (grupo S) permaneciendo los restantes 9 animales como grupo control (grupo eCG). A los 6-7 días del retiro de los pesarios los animales fueron laparotomizados exponiéndose sus ovarios. Se estableció el número de cuerpos lúteos (CL) y de folículos anovulatorios mayores de 6 mm (FA) presentes en su superficie. El número de FA fue significativamente diferente ( $5.6 \pm 2.6$  vs  $0.7 \pm 0.5$ , para los grupos eCG y S respectivamente,  $p < 0.05$ ), mientras que la diferencia en la tasa ovulatoria no alcanzó significación estadística ( $5 \pm 1.5$  y  $3 \pm 0.6$  para los grupos eCG y S respectivamente).

De acuerdo a estos resultados se concluye en primer término que es posible inducir ovulaciones múltiples durante el anestro estacional mediante la técnica empleada. Además, para evitar el sobrestímulo del desarrollo folicular es aconsejable la utilización de suero anti-eCG.

**Palabras claves:** ovejas, eCG, anti-eCG, superovulación, anestro estacional.

## SUMMARY

Eighteen Corriedale seasonal anestrus ewes were treated with intravaginal progestagen pessaries (60 mg MAP) and 1200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG or PMSG) 48 hs before pessary withdrawal (PW). Nine ewes (S group) received an injection of ovine eCG antiserum 12 hs after PW. The other nine remained as control group (eCG). Six or seven days after PW, the ovaries were exposed by laparotomy and number of corpora lutea (CL) and anovulatory follicles ( $>6$ mm; LAF) were counted. Injection of anti-eCG cause a significant reduction in LAF ( $5.6 \pm 2.6$  and  $0.7 \pm 0.5$ ; for C group and S group respectively,  $p < 0.05$ ). Ovulation rate was not significantly affected by the treatment ( $5 \pm 1.5$  and  $3 \pm 0.6$ ; for group C and group S respectively).

We conclude that it is possible to induce superovulation during seasonal anestrus using this technic. Furthermore, we conclude that the use of eCG antiserum has a beneficial effect in controlling ovarian overstimulation.

**Key words:** ewes, eCG, anti-eCG, superovulation, seasonal anestrus.

## INTRODUCCION

La gonadotropina coriónica equina (eCG ó PMSG) es utilizada ampliamente en tratamientos superovulatorios en la oveja (19), la vaca (18) y la cabra (14), caracterizándose su respuesta por una amplia variabilidad racial e individual (9). En nuestro país, la

utilización de técnicas superovulatorias en la oveja ha sido desarrollada solamente durante la estación reproductiva (7), aunque en otros países y con otras razas se han realizado ensayos exitosos durante el anestro estacional (6,20).

La larga permanencia en sangre de la eCG (5 a 7 días de vida media; 2) provoca, luego de la multiovulación, un importante desarrollo folicular secundario observándose 4 a 7 días después del estro un elevado número de folículos

anovulatorios y/o quísticos a nivel del ovario (18). En diversos trabajos se ha asociado la producción de estrógenos por parte de los mismos con un acelerado pasaje de los embriones a lo largo del oviducto y del útero (24), lo que disminuye su calidad. Otros trabajos han planteado una acción perjudicial sobre el folículo en su maduración final provocada en forma directa por la eCG circulante (10, 11) aunque no existe coincidencia al respecto entre todos los trabajos (3,8).

<sup>(1)</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo, URUGUAY

La administración de anticuerpos contra la eCG luego de que esta ha provocado el estímulo superovulatorio deseado ha sido postulada como una alternativa efectiva de mejorar la respuesta superovulatoria (1, 12), aunque los antecedentes de su utilización en oveja son escasos (5, 13, 15). En diversos laboratorios de investigación, y también a nivel comercial se han preparado sueros mono o policlonales contra la eCG (4, 17). En nuestro laboratorio hemos producido un suero anti-eCG cuya técnica de obtención y valoración por bioensayos en ratas y ratones ya ha sido descrita (23).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las ventajas de la utilización de suero anti-eCG en tratamientos superovulatorios con eCG en ovejas en anestro estacional.

## MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó entre los meses de setiembre y noviembre en el laboratorio del Departamento de Fisiología, Montevideo. Se utilizaron 18 ovejas Corriedale, de 8 dientes, que pesaban  $38.2 \pm 2.5$  kgs. (media  $\pm$  E.S.) y que fueron alimentadas con heno de alfalfa, ración y agua ad libitum durante toda la experiencia.

En el día 0, se les colocaron esponjas intravaginales a todas las ovejas conteniendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona. Al día 11 todos los animales recibieron por vía intramuscular una dosis de 1200 U.I. de eCG (Folligon, Intervet, partida 20144). Cuarenta y ocho horas después, las esponjas fueron retiradas (día 13) y los animales divididos en dos grupos. A 9 de ellos (grupo S) se les administraron 2.5 ml. de suero anti-eCG por vía intramuscular a las 12 hs, es decir 60 horas después de administrada la eCG, mientras que los restantes 9 animales permanecieron como control (grupo eCG).

La técnica de obtención del suero anti-eCG utilizado fue descrita anteriormente y la valoración realizada por medio de bioensayo en roedores demostró que el suero neutralizó totalmente la actividad ovariotrófica de un preparado comercial de eCG (Folligon, Intervet, partida 20144) a la dosis más

baja utilizada: 1 ul por U.I. de eCG (23). La dosis utilizada en las ovejas fue de 2.5 ml., el doble de la mínima efectiva.

Todas las ovejas fueron testadas con un carnero al menos dos veces por día para verificar la aparición de comportamiento estral entre las 12 y las 120 horas posteriores al retiro de la esponja. Para ello se utilizaron dos carneros de raza Ideal que mostraron buena libido a lo largo del ensayo. A los 6 y 7 días de retiradas las esponjas todos los animales fueron sometidos a una laparotomía bajo anestesia regional y local para estudiar la respuesta ovárica.

Durante la laparotomía se determinó en cada animal el número de cuerpos lúteos (tasa ovulatoria) y de folículos anovulatorios mayores de 6 mm presentes en la superficie ovárica. La respuesta ovárica total (ROT) fue definida como la suma de ambas variables. Se consideró que un animal respondió al tratamiento si los ovarios presentaban al menos un cuerpo lúteo.

A partir del retiro de las esponjas se obtuvieron diariamente muestras sanguíneas por venopunción yugular a 4 animales del grupo eCG y 3 del grupo S para posteriores estudios hormonales. Rápidamente luego de la retracción del coágulo, el suero fue separado por centrifugación (3000 rpm durante 10 minutos) y mantenido a -20 grados hasta su cuantificación por RIA.

La concentración de progesterona fue estimada por medio de un RIA en fase sólida (Coat-A-Count TKPG; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA. U.S.A.) utilizando directamente muestras de 100 ul en duplicado. De acuerdo a las indicaciones del fabricante las principales reacciones cruzadas fueron de 2.4 y 2% para desoxycortisol y 20 alfa hidroxipregn-4-ene-3-ona, respectivamente y de menos del 2% para los otros esteroides testados. La curva standard del kit comercial mostró una alta correlación (0.9) con la obtenida con suero de oveja (Tagle, R & Gama, S., Laboratorio de Radioinmunoanálisis, Facultad de Veterinaria, Uruguay; comunicación personal).

Como parte de un trabajo paralelo de puesto a punto de un RIA para 17 beta estradiol en la oveja se utilizó un kit

comercial para fase sólida (Coat-A-Count TKE; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA. U.S.A.) utilizando directamente muestras de 100 ul en duplicado sin previa extracción con éter. La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg/ml y de acuerdo al fabricante la reacción cruzada con otros esteroides es inferior al 1.1%

Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio del análisis de varianza de una vía. Dada la heterogeneidad de las varianzas en la comparación del número de folículos anovulatorios y de la respuesta ovárica total (ROT) los valores fueron transformados por medio de la raíz cuadrada y del logaritmo respectivamente. La comparación de frecuencias se realizó por medio de los test de chi cuadrado y de probabilidad exacta de Fisher.

## RESULTADOS

Mientras que todos los animales del grupo eCG manifestaron celo, solo 5 animales del grupo S mostraron comportamientos estral completo (9/9 vs 5/9,  $P < 0.05$ ). Tres no lo hicieron y una oveja presentó un comportamiento estral incompleto durante más de 72 horas. El tiempo medio para el inicio del estro fue similar:  $33.3 \pm 6.6$  hs para el grupo eCG ( $n=9$ ) y  $28.8 \pm 2.9$  hs para el grupo S ( $n=5$ ).

A la laparotomía se observó que dos de los animales del grupo eCG que presentaron celo no tuvieron respuesta ovárica (ningún cuerpo lúteo). Por su parte, en el grupo S, la oveja que mostró estro incompleto presentó igualmente respuesta ovárica (1 cuerpo lúteo y 1 folículo anovulatorio). De acuerdo al criterio previamente enunciado 7 animales del grupo eCG y 6 del grupo S presentaron respuesta al tratamiento.

La media del número de cuerpos lúteos, de folículos anovulatorios mayores de 6 mm y de la ROT de ambos grupos se muestran en la Tabla 1.

La administración de suero anti-eCG disminuyó significativamente la ROT ( $P < 0.05$ ). Esta diferencia fue provocada por la disminución del número medio de folículos anovulatorios, sin que variara el de cuerpos lúteos.

**TABLA 1. RESPUESTA OVÁRICA AL TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON eCG SOLA (eCG) O COMBINADA CON SUERO ANTI-eCG (S)**

Grupo	n	Ovulaciones (Cuerpos lúteos)	Folículos Anovulatorios	Respuesta Ovárica Total
eCG	7	5.0 ± 1.5	5.6 ± 2.6a	10.6 ± 2.5a
S	6	3.0 ± 0.6	0.7 ± 0.5b	3.7 ± 0.6b

Para una misma columna : <sup>a</sup> vs <sup>b</sup>; P<0.05.

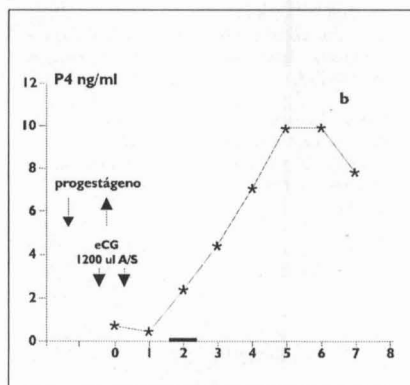
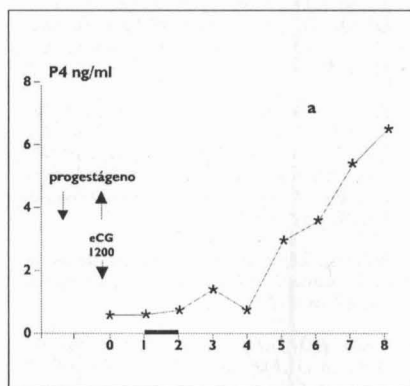
En las figuras 1 y 2 se muestra la evolución de los niveles hormonales de algunas ovejas.

Inmediatamente luego del estro la concentración de progesterona se elevó rápidamente alcanzando valores superiores a los 6 ng/ml a los 2-3 días postestro. Por su parte las concentraciones sanguíneas de estradiol estuvieron por debajo de los niveles detectables para el RIA utilizado salvo en dos animales -una oveja de cada grupo- que presentaron una respuesta inadecuada al tratamiento superovulatorio. En uno de estos animales se observó un marcado incremento de los estrógenos asociado con una respuesta superovulatoria de 2 cuerpos lúteos y 21 folículos anovulatorios. El otro animal con niveles de estrógenos detectables durante el periodo de estudio correspondió a la oveja que tuvo comportamiento estral incompleto y prolongado (más de 72 hs) y que, a la laparotomía presentó un cuerpo lúteo y un gran folículo anovulatorio de 14 mm de diámetro.

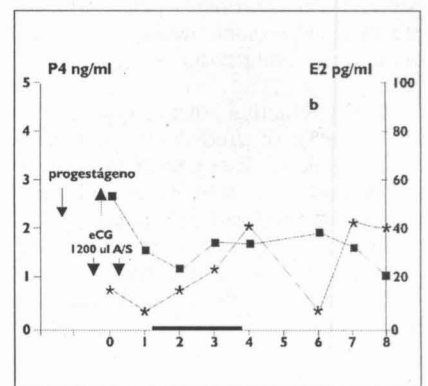
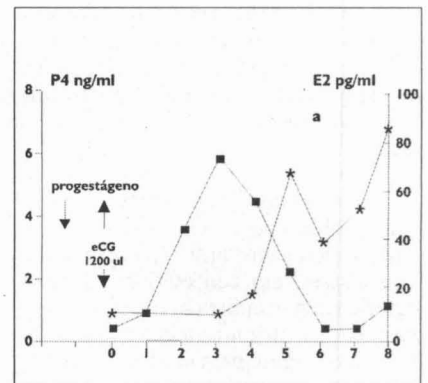
**DISCUSION**

Los resultados obtenidos muestran, en primer lugar, que es posible inducir superovulación durante el anestro estacional de la oveja Corriedale mediante tratamiento con progestágenos y eCG. Esto confirma los resultados de experiencias realizadas anteriormente en otros países (15, 20).

El tiempo de aparición del celo fue similar entre ambos grupos, observándose diferencias en el número de animales que lo manifestaron. El intervalo desde el retiro de los pesarios



**Figura 1. Niveles séricos de progesterona (P4) en: a) una oveja luego del tratamiento superovulatorio con progestágeno i/vag durante 13 días + 1200 UI de eCG 48 hs antes del retiro de la esponja (día 0), con respuesta ovárica de 2 cuerpos lúteos y 3 folículos anovulatorios > 6 mm; b) tratamiento igual a a) más administración de 2.5 ml de suero anti-eCG 12 hs luego del retiro de las esponjas, con respuesta ovárica de 4 cuerpos lúteos y 1 folículo anovulatorio (barra = estro).**



**Figura 2. Niveles séricos de progesterona (P4 ; ■—) y estradiol (E2 ; \*—): a) oveja con sobrestímulo folicular (2 cuerpos lúteos y 21 folículos anovulatorios). Obsérvese el gran aumento de los estrógenos que se mantienen varios días luego del celo, b) oveja con comportamiento estral incompleto y prolongado y que presentó un folículo anovulatorio de 14 mm. Obsérvese la persistencia de niveles elevados de E2.**

a la aparición del celo coincide con el reportado en la literatura (16).

La ROT en los animales del grupo eCG fue similar a la obtenida durante la estación reproductiva. Sin embargo, la tasa ovulatoria es menor que la obtenida en tratamientos realizados durante este período (10-12 cuerpos lúteos/oveja). Esta diferencia es debida a la mayor incidencia de folículos anovulatorios presentes en los tratamientos realizados en primavera (22).

El suero anti-eCG bloqueó el desarrollo folicular secundario provocado por la eCG circulante. En las ovejas del grupo S la utilización del suero logró controlar el efecto

sobrestimulador de la eCG, disminuyendo el número de folículos anovulatorios. Similares resultados fueron obtenidos en experimentos realizados en ovejas durante la estación reproductiva (5) y en vacas (1).

Si bien el menor número de cuerpos lúteos observados en los animales tratados con suero anti-eCG respecto a los tratados solo con eCG no alcanzó significación estadística, dicha tendencia puede ser atribuida a lo temprano del momento elegido para la administración del suero. La administración del suero en la proximidad de la ovulación parecería más apropiada para evitar un efecto deletéreo sobre las últimas etapas del proceso ovulatorio.

Una alternativa práctica consiste en inyectar el suero alrededor del momento de la ovulación. Este podría presumirse en función del comienzo del celo. En tratamientos realizados durante el otoño en nuestro laboratorio, el suero fue administrado a las 12 hs de iniciado este, obteniéndose la misma tasa ovulatoria que cuando se utiliza eCG sola (21). En ovejas Milchschaef, cuyo celo es más prolongado que en las Corriedale (43 hs vs 22.5 hs respectivamente) nosotros observamos que la administración del suero a las 24 hs de comenzado este, arrojó resultados superiores a los obtenidos cuando se lo administró a las 12 hs (9.2 vs 3.5 cuerpos lúteos respectivamente; datos no publicados). Recientes trabajos en vacas confirman los mejores resultados con este método (10).

En resumen, el presente trabajo: 1) confirma que la técnica de superovulación empleada puede ser utilizada exitosamente durante el anestro estacional de la oveja y 2) muestra que el uso del suero anti-eCG adecuando el momento de administración tal como fue sugerido anteriormente, puede ser un tratamiento efectivo para mejorar la respuesta superovulatoria, evitándose el sobrestímulo folicular secundario provocado por la eCG.

## AGRADECIMIENTOS

A las Brs. C. Viñoles y B. Carbajal por la colaboración prestada durante las cirugías; a los Drs. R. Tagle y S. Gama (Laboratorio de Radio Inmunoanálisis,

Facultad de Veterinaria) por la realización del RIA de progesterona, al Dr. R. Roca (Departamento de Medicina, Hospital de Clínicas) y la Dra. A. Meikle (Area de Bioquímica, Facultad) por la realización del RIA de estrógenos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Alfurajji, M. M., Atkinson, T., Broadben, P., y Hutchinson, J. S. M., 1993. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG monoclonal antibodies. *Anim. Reprod. Sci.* 33 : 99-109.
- 2- Bevers, M. M. y Dieleman, S. J., 1987. Superovulation of cows with PMSG: variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 15 : 37-52.
- 3- Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Gielen, J. Th., Wurh, Y. A., Janszen, B. P. M., van de Broek, J. Y. Willemsse, A. H., 1993. Yield of embryos in PMSG-superovaluated cows treated with anti-PMSG six or 18 hours after the peak of luteinising hormone. *Vet. Rec.* 132 : 186-189.
- 4- Bindon, B. M., 1970. Prolonged activity in vivo of rabbit antisera to placental gonadotrophins. *J. Endocr.* 46 : 221-227.
- 5- Bindon, B. M., y Piper, L.R., 1977. Induction of ovulation in sheep and cattle by injections of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum. *Theriogenology* 8 : 171.
- 6- Bondioli, K. R., Allen, R. L., y Wright, R. W. Jr., 1982. Induction of estrus and superovulation in seasonally anestrous ewes. *Theriogenology* 18 : 209-214.
- 7- Bonino Morlán, J., Hughes, P., Villamil, A., Azzarini, M. y Valledor, F., 1989. Multiovlación y trasplante embrionario en ovinos. Resumen de experiencias realizadas en Uruguay. *Prod. Ov.* 1 : 11-22.
- 8- Chupin, D., Steiner, M. y Saumande, J., 1988. Neutra-PMSG injected early after the LH peak does not improve ovulation rate in PMSG treated heifers. En: *Proceedings de 11<sup>th</sup>. Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988, Dublin, Ireland*, p. 147.
- 9- Dhondt, D., Bouters, R., Spincemaille, J., Coryn, M. y Vandeplassche, M., 1978. The control of superovulation in the bovine with a PMSG antiserum. *Theriogenology* 9 : 529-533.
- 10- Dieleman, S. J. y Bevers, M. M., 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG treated cows. *J. Rep. Fert.* 81 : 533-542.
- 11- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Kruip, Th. A. M., van Tol, H. T. M. y Blankenstein, D. M., 1988. Steroid profiles and micromorphology of the follicle population before ovulation in PMSG-superovaluated cows with or without monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. En: *Proceedings del 11<sup>th</sup>. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Vol. 2, p. 154.*
- 12- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Vos, P. L. A. M. y de Loos, F. A. M., 1993. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 39 : 25-41.
- 13- Jabbour, H. N. y Evans G., 1991. Ovarian and endocrine responses of merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim. Rep. Sci.* 24 : 259-270.
- 14- Kumar, J., Osbord, J. C., Cameron, A. W. N. y Trounson, A. O., 1992. Follicular steroidogenesis and oocyte maturation after superovulation of goats (*Capra hircus*) with gonadotrophins. *J. Rep. Fert.* 95 : 371-383.
- 15- Martemucci, G., Toteda, F., Manchisi, A., Minervini, F. y Dallesandro, A., 1991. Superovulation in sheep with PMSG: effect of administration of anti-PMSG. *Zoot. Nut. Anim.* 17 : 35-43.
- 16- Oyedipe, E. O., Pathiraja, N., Gyang, E. O. y Edqvist, L. E. 1989. Effect of dose of Pregnant Mare Serum Gonadotrophin on estrus parameters, ovulation rate and peripheral progesterone concentrations in Yankasa ewes. *Anim. Rep. Sci.* 20 : 255-264.
- 17- Saumande, J. y Chupin, D., 1981. Production of PMSG antiserum in cattle: assay of inhibitory activity and use in superovulation heifers. *Theriogenology* 15 : 108.
- 18- Saumande, J., 1990. Superovulation chez les bovines: actualités et perspectives. En: *Proceedings de la 6<sup>e</sup>. Reunión de la Asociación de Transferencia Embrionaria, 7-8 setiembre, Lyon, Francia*, 97-141.
- 19- Shelton, J. N. y Moore, N. W., 1967. The response of the ewe to pregnant mare serum and to horse anterior pituitary extract. *J. Rep. Fert.* 14 : 175-177.
- 20- Stancic, R., Vulic, I. D. y Maric, Z., 1990. Stimulation of superovulation in ewes by different combinations of PMSG. *W. Rev. An Prod.* 25 : 63-66.
- 21- Ungerfeld, R., Ibarra, D. y Rubianes, E. 1995. Use of anti-eCG improves the ovarian response of ewes superovulated with eCG. *Theriogenology* 43 : 365 (abstr.).
- 22- Ungerfeld, R., Ibarra, D., Viñoles, C., Carbajal, B., de Castro, T. y Rubianes, E., 1994. Estacionalidad en la respuesta superovulatoria en ovejas Corriedale. En: *Terceras Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, 5 al 7 de octubre, Montevideo, Uruguay*.
- 23- Ungerfeld, R., Viñoles, C. y Rubianes, E., 1993. Obtención y valoración de suero anti-PMSG. *Veterinaria* 29 : 18-22.
- 24- Whyman, D. y Moore, R. W., 1989. Effect of PMSG and the prostaglandin F-2<sup>α</sup> analogue, cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J. Rep. Fert.* 60 : 267-272.