

## Efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides durante la fase lútea sobre la tasa de ovulación en ovejas Rambouillet

Arturo García Álvarez\*  
Joel Hernández Cerón\*\*  
Javier Valencia Méndez\*\*

### Abstract

The effect of the administration of steroid-free equine follicular fluid (eFF) during the luteal phase on the ovulation rate of Rambouillet ewes was evaluated. Twenty six cycling ewes previously synchronized were used. On the ninth day of the oestrus cycle (day 0 = estrus day) ewes were assigned at random in two groups. Animals from the treated group ( $n = 13$ ) were intravenously treated every 8 h with 3 ml of eFF for 72 h. Ewes from the control group ( $n = 13$ ) were injected with saline solution (SSF) instead of the eFF. All ewes were treated with 15 mg of PGF2a after the last treatment with either SSF or eFF. Detection of estrus was performed using a male fitted with an apron. Ovulation rate was determined on the sixth day after estrus by laparoscopy counting the corpora lutea. The proportion of ewes with multiple or simple ovulation, and the number of ovulations were compared using the Ji square- and student's "t" tests, respectively. Blood samples were taken from 4 ewes in the treated group, and from 5 ewes from the control one every 4 hours for a period of 144 h after the administration of eFF. Concentrations of FSH were determined, and the results were compared using the variance analysis. Ovulation rate was higher ( $P < 0.05$ ) in treated ewes ( $2.0 \pm 0.29$ ) than in the control ones ( $1.23 \pm 0.12$ ). The proportion of ewes with multiple ovulations for the treated group was 69.23%, and 23.07% for the control one ( $P < 0.05$ ). Concentrations of FSH were not statistically different between groups ( $P > 0.05$ ). After the suspension of eFF, levels of FSH did not increase significantly ( $P > 0.05$ ). It is concluded that the treatment with eFF during the luteal phase 72 h before the application of PGF2a increases the ovulation rate without modifying concentrations of FSH.

Key words: INHIBIN, EQUINE FOLLICULAR FLUID, OVULATION RATE, FSH, EWE.

### Resumen

Se evaluó el efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) durante la fase lútea sobre la tasa de ovulación en ovejas de raza Rambouillet. Para este fin se utilizaron 26 ovejas que se encontraban en estro, éstas fueron sincronizadas previamente. El día nueve del ciclo (día 0 = día del estro), las ovejas se asignaron al azar a dos grupos. A los animales del grupo tratado ( $n = 13$ ) se les aplicó 3 ml de LFE iv cada ocho horas durante 72 h. Las ovejas del grupo testigo ( $n = 13$ ) recibieron solución salina fisiológica (SSF) en lugar de LFE. Todas las ovejas fueron tratadas con 15 mg de PGF2a después de la última aplicación del LFE o SSF, y se detectaron estros con machos provistos de mandil. El día seis posterior al estro se determinó la tasa ovulatoria mediante el conteo de los cuerpos lúteos a través de laparoscopia. Se comparó la proporción de ovejas con ovulación múltiple y simple, así como el número de ovulaciones, mediante las

Recibido el 10 de julio de 2000 y aceptado el 25 de octubre de 2000.

\* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México, 50000, Apartado Postal 421, E-mail: aga@coatepec.uaemex.mx

\*\* Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, E-mail: jhc@servidor.unam.mx

pruebas Ji cuadrada y "t" de Student, respectivamente. En cuatro ovejas del grupo tratado y en cinco del grupo testigo se tomaron muestras sanguíneas cada 4 h durante 144 h a partir de la administración de LFE, en aquéllas se determinaron las concentraciones de FSH. Estas últimas fueron comparadas mediante análisis de varianza. La tasa ovulatoria fue mayor ( $P < 0.05$ ) en las ovejas tratadas ( $2.0 \pm 0.29$ ) que en las testigo ( $1.23 \pm 0.12$ ), la proporción de ovejas con ovulación múltiple para el grupo tratado fue de 69.23% y 23.07% para el grupo testigo ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones de FSH no difirieron estadísticamente ( $P > 0.05$ ) entre grupos en los días evaluados, y no se observó un incremento en sus niveles después de suspender la administración de LFE. Se concluye que el tratamiento con LFE durante la fase lútea 72 h antes de la aplicación de PGF2a incrementó la tasa ovulatoria sin modificar las concentraciones de FSH.

Palabras clave: INHIBINA, LÍQUIDO FOLICULAR EQUINO, TASA OVULATORIA, FSH, OVINOS.

## Introducción

La inhibina constituye una hormona glicoproteína producida en las células de la granulosa y tiene como función inhibir la secreción de FSH a nivel hipofisiario.<sup>1</sup> La inhibina está presente en concentraciones elevadas en el líquido folicular en las diferentes especies domésticas.<sup>2-5</sup> La administración sistémica de este fluido, después de remover la fracción de hormonas esteroides, disminuye las concentraciones circulantes de FSH y, en consecuencia, se observa una supresión del desarrollo folicular.<sup>6-8</sup> En ovejas tratadas con líquido folicular bovino (LFB) se ha encontrado que después de interrumpir su aplicación, se presenta una respuesta de "rebote", caracterizada por un aumento en los niveles de FSH. Este efecto se ha asociado con el incremento en la tasa de ovulación observada en estas hembras.<sup>9,10</sup> La mayoría de los estudios en este campo se han hecho utilizando el LFB como fuente de inhibina; sin embargo, la disponibilidad de este fluido es limitada dado el pequeño tamaño de los folículos bovinos (15 a 20 mm de diámetro, como máximo).

El líquido folicular equino también representa una fuente rica en inhibina,<sup>4</sup> además se obtiene en grandes volúmenes debido al tamaño de los folículos de la yegua.<sup>11</sup> En la yegua la administración de líquido folicular equino libre de hormonas esteroides (LFE) suprime la secreción de FSH e inhibe el desarrollo folicular.<sup>12-14</sup> Estos efectos también se han observado en ovejas tratadas con LFE,<sup>11,15</sup> lo que confirma la alta homología que tiene la inhibina en las diferentes especies. No obstante que el LFE tiene actividad de inhibina en la oveja, se desconoce si su aplicación durante la fase lútea tiene efecto sobre la tasa de ovulación, similar al observado en animales tratados con LFB.<sup>9,10</sup> En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar

el efecto del tratamiento con LFE durante la fase lútea 72 h antes de la aplicación de PGF2a, sobre la tasa de ovulación y las concentraciones de FSH en ovejas Rambouillet.

## Material y métodos

El estudio se realizó en dos lugares: a) Unidad Ovina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), ubicada en Toluca, Estado de México, México; la ciudad se encuentra en los 19° 25' de latitud Norte; el clima de la región es tipo C(w<sub>2</sub>) (w) big, que corresponde a templado-frío con lluvias en verano;<sup>16</sup> y b) en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se utilizaron 26 ovejas de la raza Rambouillet que estaban en estro. El trabajo se efectuó durante agosto y septiembre. En todos los animales se sincronizaron los estros mediante la inserción vaginal de una esponja impregnada con acetato de fluorogestona, Chronogest 40 mg.\* Las esponjas se retiraron 14 días después de la inserción; la detección de estros se realizó dos veces al día utilizando un macho con mandil. El día del estro fue considerado como el día cero del ciclo. El día nueve del ciclo las ovejas fueron asignadas al azar a dos grupos. A los animales del grupo tratado ( $n = 13$ ) se les aplicó 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 h durante 72 h (días 9, 10 y 11). A las ovejas del grupo testigo ( $n = 13$ ) se les aplicó solución salina fisiológica bajo el mismo esquema. Al finalizar el tratamiento, a todos los animales se les provocó la luteólisis mediante la inyección de 15 mg de PGF2a (Lutalyse \*\*) y se detectaron estros con machos provistos de mandil dos veces al día (8:00 y 17:00 h).

El líquido folicular equino fue colectado de yeguas sacrificadas en un rastro local. Inmediatamente después del sacrificio se succionó el líquido de los folículos visibles y se conservó en refrigeración hasta su traslado al laboratorio. Con el fin de remover la fracción de

\* Laboratorios Intervet, México.

\*\* Laboratorios Upjohn, México.

Cuadro 1  
TASA DE OVULACIÓN DE OVEJAS RAMBOUILLET TRATADAS DURANTE LA FASE LÚTEA, CON LÍQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES

Grupos	n	Proporción de ovejas con ovulación múltiple	Tasa de ovulación
Tratado	13	69.23 (9/13) <sup>a</sup>	2.0 ± 0.29 <sup>a</sup>
Testigo	13	23.07 (3/13) <sup>b</sup>	1.23 ± 0.12 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes literales en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

hormonas esteroides, el LFE fue tratado con carbón activado y dextrán, de acuerdo con la técnica descrita por Hernández et al.<sup>11</sup>

Para la determinación del número de ovulaciones se realizaron laparoscopías el día seis posestro y se contabilizó el número de cuerpos lúteos. En las laparoscopias se utilizó la técnica descrita por Seeger y Klatt<sup>17</sup> y Fitzgerald y Stellflug.<sup>18</sup> Se comparó la proporción de ovejas con ovulación múltiple y simple y el número de ovulaciones mediante las pruebas Ji cuadrada y "t" de Student, respectivamente.

A cuatro ovejas del grupo tratado y a cinco del grupo testigo, se les tomaron muestras de sangre cada 4 h durante 144 h a partir de la administración de LFE. Las muestras se obtuvieron por venopunción yugular utilizando tubos al vacío heparinizados. Inmediatamente después de su obtención, las muestras se centrifugaron a 1 500 g durante 10 minutos, para la separación del plasma, el cual se conservó a -20°C hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones

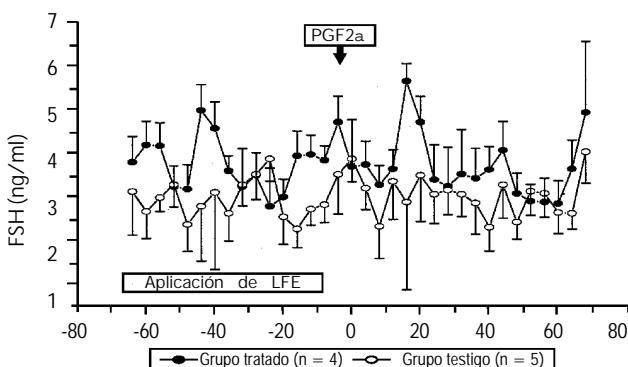


Figura 1. Concentraciones medias ± error estándar de FSH de ovejas Rambouillet tratadas con 3 ml de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) cada 8 h durante la fase lútea (barra horizontal), previo a la administración de PGF2a (flecha). Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a intervalos de 4 h a partir del inicio del tratamiento con LFE.

de FSH utilizando un radioinmunoanálisis homólogo en fase líquida.<sup>11</sup> Bajo estas condiciones, el sistema presentó una sensibilidad de 0.25 ng/ml, el coeficiente de variación intraensayo para la dosis baja (2.5 ng/ml) fue de 12.02%, y para la dosis alta (7.44 ng/ml), de 9.22%. El coeficiente de variación interensayo para la dosis baja (2.26 ng/ml) fue de 5.16%, y para la dosis alta (7.12 ng/ml) de 1.65%.

Las concentraciones de FSH se compararon mediante análisis de varianza utilizando como variables independientes el tratamiento y la hora en que se tomó la muestra.<sup>19</sup>

## Resultados

El grupo tratado con LFE tuvo  $2.0 \pm 0.29$  cuerpos lúteos; por su parte, el grupo testigo tuvo  $1.23 \pm 0.12$ , esta diferencia fue significativa ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1). También se encontró una diferencia significativa entre grupos con respecto al porcentaje de ovejas que tuvieron más de una ovulación. Las concentraciones de FSH (Figura 1) no difirieron estadísticamente ( $P > 0.05$ ) entre grupos. Tampoco variaron significativamente a lo largo del tiempo en ninguno de los grupos.

## Discusión

En los animales tratados se incrementó significativamente la tasa de ovulación, por lo que en el día seis posestro se encontraron  $2.0 \pm 0.29$  cuerpos lúteos en el grupo tratado vs  $1.23 \pm 0.12$  cuerpos lúteos en el testigo ( $P < 0.05$ ). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios parecidos en los que se utilizó LFB.<sup>9,10,20</sup> Sin embargo, en dichos estudios el efecto sobre la tasa de ovulación se asoció con un incremento de las concentraciones de FSH, después de la finalización del tratamiento con LFB. En el presente trabajo no se observó un efecto del LFE sobre las concentraciones de FSH y tampoco fue posible observar un incremento (rebote) después de suspender su administración, lo que permite sugerir que el efecto del LFE sobre la tasa de ovulación puede ser independiente de las concentraciones de FSH.

Si bien los tratamientos agudos con FSH se utilizan para provocar superovulación,<sup>21</sup> se ha observado que la variación en la tasa de ovulación entre individuos no depende de la variación en las concentraciones de FSH entre ellos.<sup>22,23</sup>

El mecanismo por el cual el tratamiento con LFE incrementó la tasa de ovulación en el presente trabajo se desconoce, pero puede deberse al efecto inhibidor del LFE sobre el desarrollo de los folículos. Así, se ha observado en ovejas que el LFE suprime el crecimiento folicular, particularmente de los folículos > de 4 mm de diámetro.<sup>15</sup> Es posible que el LFE provoque la

eliminación del folículo dominante, lo que permitiría un aumento en el número de folículos potencialmente reclutables por la FSH.<sup>23</sup> Se ha demostrado que la tasa de ovulación puede incrementarse por un aumento en el número de folículos dependientes de gonadotropinas, sin haber una modificación en las concentraciones de FSH.<sup>24</sup> Por ejemplo, en ovejas el tratamiento de sobrealimentación energética (flushing) ha incrementado la tasa de ovulación sólo con aumentar la oferta de folículos sensibles a la FSH.<sup>25</sup>

No obstante que el tratamiento con LFE no afectó las concentraciones de FSH, sí pudo haber un efecto supresor del desarrollo folicular, ya que este efecto no sólo es mediado por la supresión de las concentraciones de FSH. El efecto del líquido folicular sobre el desarrollo folicular no sólo depende del contenido de inhibina, ya que tanto en vaquillas como en ovejas, la administración de líquido folicular al que previamente se le removió la inhibina, continuó provocando una inhibición del crecimiento folicular.<sup>26-28</sup> Esto último indica que en el líquido folicular existen sustancias que participan en la regulación del desarrollo folicular directamente en el ovario. Aunque se esperaba que el LFE suprimiera las concentraciones de FSH, este efecto no fue comprobado en el presente trabajo. Estos resultados fueron diferentes a lo encontrado por Hernández et al.,<sup>11</sup> quienes trataron ovejas en anestro y en diestro, y observaron un efecto supresor significativo sobre los niveles de FSH. Asimismo, son diferentes a los resultados obtenidos en otros estudios en ovejas utilizando LFB como fuente de inhibina.<sup>7,29,30</sup> En este estudio y en los trabajos realizados por Hernández et al.<sup>11</sup> se utilizó una preparación cruda de líquido folicular equino, la cual sólo se trató para eliminar la fracción de hormonas esteroides, ya que su contenido proteínico y en particular de inhibina se desconoce. A pesar de que el líquido folicular se colectó y procesó de la misma forma en ambos estudios, es posible que el contenido de inhibina haya variado entre un estudio y otro, ya que las concentraciones de esta hormona pueden variar de acuerdo con el día del ciclo y el tamaño de los folículos de los cuales se obtuvo.<sup>5,14</sup>

Los resultados de este estudio permiten concluir que el tratamiento con LFE durante la fase lútea 72 h antes del tratamiento con PGF2a incrementó la tasa de ovulación sin que se modificaran las concentraciones de FSH en ovejas de la raza Rambouillet.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto 1228/97 de la CGIEA de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los autores agradecen al doctor D. Carlos Gutiérrez sus valiosas aportaciones y comentarios, así como al biólogo Gerardo Perera Marín y a las MVZ

Clara Murcia Mejía y Susana Rojas Maya, el apoyo técnico en el procesamiento del líquido folicular equino y en la determinación de FSH.

## Referencias

- Findlay JK, Clark IJ, Robertson DM. Inhibin concentration in ovarian and jugular venous plasma and relationship of inhibin with follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during the ovine estrous cycle. *J Endocrinol* 1990;126:528-535.
- Leversha LJ, Robertson DM, Vos FL, Morgan FJ, Hearn MTW, Wettenhall REH, et al. Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J Endocrinol* 1987;113:213-221.
- Knight PG. Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. *J Reprod Fertil* 1991;43:111-123.
- Taya K, Kaneko H, Watanabe G, Sasamoto S. Inhibin and secretion of FSH in oestrous cycles of cows and pigs. *J Reprod Fertil* 1991;43(Suppl):151-162.
- Roser JF, McCue PM, Hoye E. Inhibin activity in the mare and stallion. *Dom Anim Endocrinol* 1994;11:87-100.
- Miller K, Crister JK, Rowe RF, Ginther OJ. Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1979;21:537-544.
- McNelly AS. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1984;72:165-172.
- Hunter MG, Southee JA, Lamming GE. Function of abnormal corpora lutea in vitro after Gn-RH-induced ovulation in the anoestrous ewe. *J Reprod Fertil* 1988;84:139-148.
- Miller DW, Martin GB. Increases in ovulation rate and gonadotrophin concentration in goats and Merino sheep after treatment with bovine follicular fluid. *Anim Reprod Sci* 1993;31:225-236.
- Wallace JM, McNelly AS, Baird DT. Ovulation rate and embryo survival in Dama-line ewes after treatment with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1985;75:101-109.
- Hernández CJ, Murcia MC, Valencia MJ, Rojas MS, Zárate MJ, Zarco QL. Efecto del líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación del estro inducido con PGF2a en ovejas ciclando. *Vet Méx* 1997;28:117-121.
- Miller KF, Wesson JA, Ginther OJ. Changes in concentrations of circulating gonadotropins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. *Biol Reprod* 1979;21:867-872.
- Bergfelt DR, Ginther OJ. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine fluid in the mare. *Theriogenology* 1985;24:99-109.
- Gremmes S. The secretional profile of gonadotrophines in the mare following hormonal intervention, doctor thesis. Hannover, Germany: Tierärztliche Hochschule Hannover, 1990.
- Hernández CJ. Control de la longitud de la fase lútea en ovejas mediante la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (tesis de doctorado en ciencias veterinarias). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996.
- García ME. Modificación del sistema de clasificación climatológica de Koeppen. México (DF): Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, 1981.

17. Seeger KH, Klatt PR. Laparoscopy in the sheep and goat. In: Harrison RM, Wildt DE, editors. *Animal laparoscopy*. Baltimore, (Ma): Williams and Wilkins, 1980:107-120.
18. Fitzgerald JA, Stellflug JN. Laparoscopy and artificial insemination of sheep. *Memorias del Curso de Actualización de Ovinos*; 1994 marzo 22-25; Toluca, Edo. de México. Toluca, Edo de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 1994:89-97.
19. Steel RGD, Torrie JH. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. México (DF): McGraw-Hill, 1985.
20. Vosniakou A, Karagiannidis A, Liberopoulos A, Koptopoulos G, Tsakalof P. Ovulation and lambing rates in Karagouniki ewes after treatment with follicular fluid. *Theriogenology* 1991;35:785-795.
21. Mejía VO, Zarco QL, Rojas MS, Rosas GM, Valencia MJ. Efecto del líquido folícular equino y la somatotropina bovina en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. *Vet Méx* 1998;29:359-367.
22. Campbell BK, Picton HM, Mann GE, McNeilly AS, Baird DT. Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J Reprod Fertil* 1991;93:81-96.
23. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 1993;5:459-478.
24. Findlay JK, Drummond AE, Fry RC. Intragonaladal regulation of follicular development and ovulation. *Anim Reprod Sci* 1996;42:321-331.
25. Gutierrez CG, Saharrea A, Palacios T, Alvarez J, Aguilera I, López N. The effect of short-term administration of a glycogenic solution on plasma glucose concentrations and ovulation rate in Pelibuey sheep. *J Reprod Fertil* 2000;25(Abstr):143.
26. Campbell BK, Picton HM, McNeilly AS, Baird DT. Effect of FSH on ovarian inhibin secretion in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil* 1991;91:501-509.
27. Campbell BK, Webb R. Evidence that inhibin has autocrine and paracrine actions in controlling ovarian function in sheep. *J Reprod Fertil* 1995;15 (Abstr):48.
28. Law AS, Baxter G, Logue DN, O'Shea T, Webb R. Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. *J Reprod Fertil* 1992;96:603-616.
29. McNeilly AS. Effect of changes in FSH induced by follicular fluid and FSH infusion in the preovulatory phases on subsequent ovulation rate and corpus luteum function in the ewe. *J Reprod Fertil* 1985;4:661-668.
30. McLeod BJ, McNeilly AS. Manipulation of plasma FSH concentrations by administration of bFF effects LH secretion in seasonally anoestrus ewes. *Anim Reprod Sci* 1991;25:115-124.