

Evaluación de dos dosis de Buserelina como inductor de ovulación en yeguas

Alicia Montesi^{*(1)}, Marcelo Miragaya⁽²⁾, Luis Losinno⁽³⁾⁽⁴⁾

¹Universidad Nacional del Nordeste (Facultad de Cs. Veterinarias),² Universidad de Buenos Aires (Facultad de Cs. Veterinarias, INITRA). ³Laboratorio de Producción Equina; ⁴Maestría en Producción Equina, Universidad Nacional de Río Cuarto (Facultad de Agronomía y Veterinaria), Argentina.

*tierraeq@gmail.com

Resumen

El manejo racional y controlado de la reproducción equina en programas comerciales ha llevado al desarrollo de fármacos que contribuyan a la regulación de ciertos fenómenos fisiológicos en la yegua, como la luteólisis y la ovulación. Entre ellos, la gonadotropina coriónica humana (hCG) y los análogos sintéticos de la GnRH (histrelina, deslorelina, gonadorelina, buserelina, entre otros) como inductores de la ovulación permiten mayor eficiencia reproductiva. La buserelina lleva muchos años en el mercado veterinario mundial, sin embargo ninguna formulación está adaptada específicamente a las necesidades de los equinos. Esta comunicación describe los resultados preliminares obtenidos de experimentos desarrollados durante la temporada reproductiva 2019-2020 en la que se utilizaron dos dosis diferentes de una nueva formulación de buserelina como inductor de ovulación en yeguas, con el objetivo de evaluar y comparar su eficacia clínica, en el marco de la Maestría en Producción Equina (UNRC). En el análisis se incluyeron 51 yeguas sanas (25 de raza Cuarto de Milla y 26 mestizas) con un total de 96 ciclos, las mismas fueron asignadas al azar en grupo 1 (n=61) y grupo 2 (n=35) que frente a la presencia de signos clínicos de celo, un folículo ≥ 35 mm y edema uterino recibieron 0,2mg (G1) y 0,4mg (G2) de buserelina por vía endovenosa. Los resultados mostraron muy buena eficacia de la droga con ambas dosis, obteniendo una tasa de ovulación del 89% en el grupo 1 y 77% en el grupo 2 dentro de las 48 horas posteriores a la inducción. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos al test de χ^2 ($p > 0.05$). Tampoco se vieron diferencias estadísticamente significativas entre distintos grupos etarios ($p > 0.05$).

Palabras clave: Yeguas, Inducción, Ovulación, Buserelina

Abstract

The rational and controlled management of equine reproduction in commercial programs has led to development of drugs that contribute to regulate certain physiological processes in mares, such as luteolysis or ovulation. Among them, human chorionic gonadotrophin (hCG) and GnRH synthetic analogs (histrelin, deslorelin, gonadorelin, buserelin, among others), as ovulation inducers, allowing greater reproductive efficiency. Buserelin has been on the global veterinary market for many years, however there is no formulation adapted specifically to equines. This communication describes our preliminary results from experiments carried out during the 2019-2020 reproductive season, in which two different doses of a new formulation of buserelin were used as ovulation induction drug in mares, with the aim of evaluating and comparing their clinical efficacy, in the framework of a Master in Equine Production (UNRC). The analysis included 51 healthy mares (25 Quarter Horses and 26 mixed breed), in a total of 96 cycles. They were randomly divided into group 1 (N = 61) and group 2 (N = 35) that in the presence of estrous clinical signs, a ≥ 35 mm follicle and uterine edema received 0,2mg (G1) and 0,4mg (G2) of buserelin intravenous route. The results showed a greater efficacy of the drug, which produced 89% ovulation rate within 48 hours after application in group 1 and 77% of ovulations in group 2. No statistical significance difference was found between treatments using chi square test ($p > 0.05$). Also there wasn't found statistical significance difference between age groups ($p > 0.05$).

Keywords: Mares, Induction, Ovulation, Buserelin.

Introducción

Debido a la intensificación de los programas comerciales de cría de equinos, se ha incrementado en los sistemas reproductivos, la demanda de fármacos que permitan la optimización del manejo de los ciclos estrales. Para ello, existen inductores de la ovulación que permiten obtener y predecir tasas de ovulación superiores al 90% en periodos de tiempo definidos, logrando mayor eficiencia y éxito en la utilización de padrillos en monta natural o del semen en programas de inseminación artificial, reduciendo el número de revisiones, de tiempo y de insumos por ciclo.

Una de las drogas más utilizadas internacionalmente como inductor de la ovulación, es la gonadotropina coriónica humana (hCG), una proteína formada por dos cadenas peptídicas. La misma es producida por los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas de la placenta humana, y obtenida a partir de la orina de mujeres embarazadas (McKinnon *et al.*, 2011). Su acción predominantemente LH, ha demostrado tasas de inducción ovulatoria de entre 78 y 100% en múltiples estudios realizados en programas experimentales y comerciales (McKinnon y Voss 1993; McCue *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2009; Tazawa *et al.*, 2017). A pesar de ser ampliamente aceptada y sus valores de mercado relativamente estandarizados y aceptados por los

INVESTIGACIÓN

Montesi *et al.*

Evaluación de dos dosis [...]

usuarios, existen reportes que demuestran que la utilización durante ciclos subsecuentes, produciría la creación de anticuerpos anti-hCG por parte de la yegua, ya que se trata de una molécula compleja y de gran peso molecular, lo cual disminuiría su potencial de acción a largo plazo (Wilson *et al.*, 1990; Newcombe y Cuervo-Arango, 2016). Se ha reportado también un menor efecto como inductor en yeguas mayores de 18 años de edad (Barbacini *et al.*, 2000; McCue *et al.*, 2004), las cuales representan una población considerable dentro de los haras o criaderos de caballos (>10%).

Todo lo expuesto, sumado a la controversia reciente debido a la falta de regulación sanitaria para la recolección de orina de las mujeres gestantes, la variación de concentración del compuesto en las diferentes muestras y la aplicación del mismo a una especie distinta a la de origen ha llevado a numerosos intentos por investigar sobre alternativas de sustitución de la hCG por otras drogas más eficaces.

La composición molecular de la GnRH fue descubierta en 1978, permitiendo la comprensión de su mecanismo de acción sobre la estimulación de síntesis de las hormonas LH y FSH a nivel de la hipófisis, en las distintas especies (Conn *et al.*, 1987; Picard-Hagen *et al.*, 2015). Seguidamente, cerca de 2000 diferentes compuestos análogos han sido desarrollados y testeados en los últimos 30 años (Padula, 2005), entre ellos gonadorelina, triptorelina, buserelina, deslorelina, histrelina y muchos más. Todos ellos son decapeptidos modificados en su estructura aminoacídica con el objetivo de potenciar el efecto original de la GnRH (Newcombe y Cuervo-Arango, 2016). Los más utilizados en la actualidad en la yegua son la deslorelina e histrelina, ambas de molécula más pequeña, menos antigénica comparada con la hCG, con una potencia biológica 144 veces mayor respecto a la GnRH natural para la primera y 210 veces para la segunda, pero de elevados costos. La buserelina, sin embargo posee una eficacia similar con solo una potencia relativa in vivo de 20 (Conn y Crowley, 1991).

Los primeros estudios con buserelina utilizaron múltiples regímenes diferentes de administración y dosis, con resultados variables en la inducción del desarrollo folicular y la ovulación en yeguas (McKinnon y Voss, 1993; Horspool, 2015). Posteriormente, otros investigadores realizaron aplicaciones de 0,02 a 0,04mg de buserelina cada 12 horas vía endovenosa, obteniendo resultados similares de tasas de ovulación en el tiempo esperado que utilizando hCG (Barrier-Battut *et al.*, 2001), sin embargo, este último protocolo incrementa en gran medida los costos y resulta poco práctico en la rutina de las explotaciones productivas debido a la necesidad de múltiples aplicaciones a horarios determinados.

Recientemente un estudio realizado en España (Newcombe y Cuervo-Arango, 2016), con una única dosis que va de 0,125 a 1mg, y otros estudios realizados en Francia, con una sola aplicación de una dosis de 3 a 6mg, utilizando un producto comercial de farmacopea humana a base de buserelina evidenciaron una respuesta óptima (tasas de ovulación de 84 a 90%) comparadas con las mencionadas anteriormente (Levy y Duchamp, 2007; Normandin *et al.*, 2016).

El mercado internacional de la farmacopea veterinaria, actualmente produce preparaciones comerciales a base de buserelina en concentraciones bajas (0,004 a 0,01mg/ml), por lo tanto, para obtener resultados óptimos como los ya citados habría que inyectar al animal con unos 40 a 100ml del preparado comercial. Existen

INVESTIGACIÓN

Montesi *et al.*

Evaluación de dos dosis [...]

evidencias de que la buserelina utilizada en determinados protocolos de estimulación folicular elevaría las tasas de ovulaciones múltiples (Newcombe y Cuervo-Arango, 2018), sin embargo dichos ensayos han sido realizados con productos destinados a humanos. Por este motivo, se hacen necesarios nuevos estudios que permitan la formulación de productos adecuados a las necesidades de la producción equina mundial así como también las correspondientes evaluaciones *in vivo* en los diferentes sistemas productivos que respalden su uso.

Los objetivos de este estudio son describir la tasa de eficiencia en la inducción de ovulaciones de un nuevo producto comercial a base de buserelina formulado específicamente para yeguas y adaptado a las necesidades de la producción equina (0,02g/100ml); comparar dos dosis diferentes del producto farmacológico, determinando la tasa de ovulación de cada una dentro de las 48 horas de suministrada la droga y evaluar el efecto de la edad de las yeguas en la misma.

Materiales y Métodos

La primer etapa de este ensayo experimental dentro de un programa comercial, de tipo prospectivo clínico, analizó los datos recolectados durante la temporada reproductiva en los meses de agosto de 2019 a marzo de 2020, en un haras ubicado en la provincia de Corrientes, Argentina (latitud 27°27'40.30" Sur) donde las yeguas son expuestas a servicio natural (SN) y transferencia embrionaria (TE). Se utilizaron 51 yeguas (25 de raza Cuarto de Milla y 26 Mestizas) de entre 4 y 22 años de edad, pre-examinadas e identificadas como ovulatorias (evidencian un CL funcional determinado por ultrasonografía). Las mismas fueron examinadas en un régimen periódico a través de palpación y ecografía transrectal utilizando transductor lineal 5MHz. Se determinó el tamaño folicular previo a la inducción con buserelina, a través de la distancia media de dos líneas trazadas perpendicularmente desde los bordes del folículo dominante en la imagen congelada (eje mayor + eje menor/2); edema endometrial clasificado en escala de 0 (sin edema, gris homogéneo) al 3 (edema marcado con distintos patrones grises y blancos) según Ginther y Pierson (1984); día de la ovulación (registrada por la presencia de cuerpo hemorrágico o cuerpo lúteo); día y hora de inducción con buserelina.

Los ciclos se asignaron de manera aleatoria a dos grupos. Al momento de presentar folículos mayores a 35mm y edema uterino (con clasificación 1-4), fueron inyectadas, por única vez, con 0,2mg de buserelina (G1 N=61) y con 0,4mg de buserelina (G2 N=35), por vía endovenosa, como inductor de la ovulación. Luego, se revisaron cada 12hs hasta corroborar la misma mediante ultrasonografía, considerándose como exitosa, una ovulación dentro de las 48hs de la inducción. Las yeguas usadas en el grupo 1 (que no resultaron preñadas) continuaron en experimentación de manera aleatoria en el siguiente ciclo (G1 o G2). Se utilizaron en promedio 1,45 veces cada animal.

Se realizó un análisis estadístico de chi cuadrado para evaluar las variables tratamiento- respuesta y comparar sus frecuencias relativas a fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 7 (4) 2020: 64-71

Se evaluó también el efecto edad sobre la respuesta en ambos grupos dividiendo a las yeguas en tres rangos etarios, menores de 10, entre 10 y 15 y mayores a 15 años, utilizando el test de chi cuadrado, para corroborar si existían diferencias conforme al avance de la edad.

Resultados

Se analizaron un total de 96 ciclos estrales. Los resultados se muestran en la Figura 1. Se observó una tasa de ovulación de 89% y 77% para G1 y G2 respectivamente. La diferencia entre grupos tratados no resultó estadísticamente significativa frente al análisis del chi cuadrado ($p > 0.05$).

Se realizó un análisis según edad dividiendo a las yeguas en tres rangos, menores de 10 años, de 10 a 15 y mayores a 15 años. Observando que un 15,7%(8/51) de la población pertenecía al último grupo. Sin embargo, no se demostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en las respuestas entre grupos etarios con ninguna de las dos dosis (85,7% vs 95,4% vs 81, 8% respectivamente para cada rango del G1 y 75% vs 75% vs 85,7% respectivamente para G2) (Figura 2).

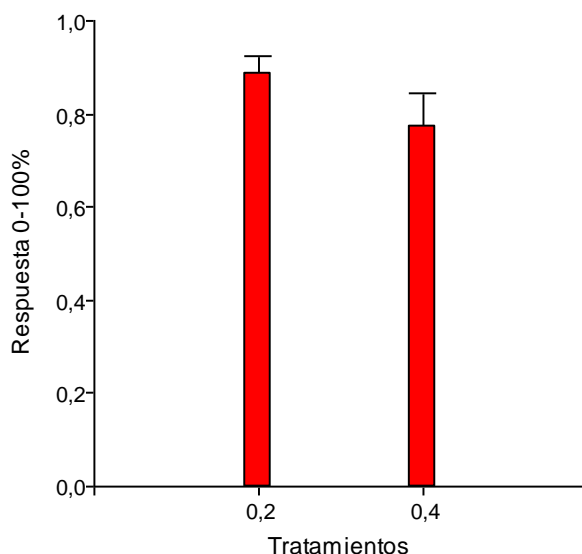


Figura 1. Resultados de inducción a ovulación con buserelina

Nota: el grupo 1 (G1) recibió 0,2mg y grupo 2 (G2) 0,4mg.

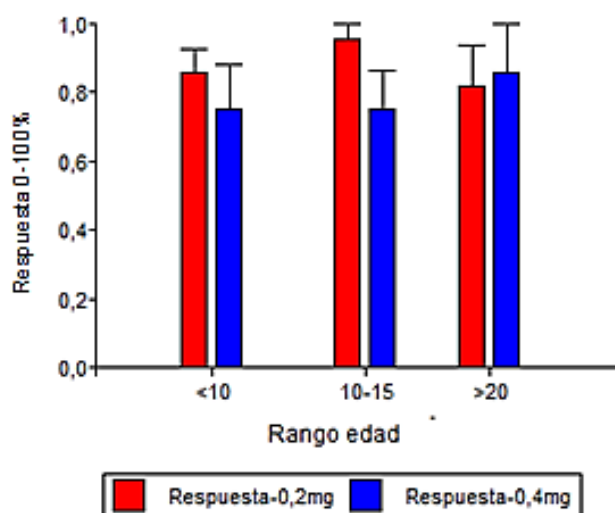


Figura 2. Respuesta según edad en cada tratamiento

Conclusiones

Los resultados preliminares expuestos, para esta nueva preparación comercial de buserelina, especialmente diseñada y adaptada para su uso en yeguas, demuestran una tasa de inducción ovulatoria de 89% y 77% con las distintas dosis probadas (0,2mg vs 0,4mg respectivamente), sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos tratados.

Estos datos reflejan una gran similitud a los ya descritos por Newcombe y Cuervo-Arango (2016) (86,9% 0,5mg vs 82,6% con 0,25mg) con la utilización de un preparado comercial de buserelina para utilización en humanos (Suprefact®); como así también frente a otros análogos sintéticos de la GnRH (81,7 a 91% con 1,5mg de deslorelina; 92% para histrelina con 0,5 o 1mg) descritos por McCue *et al.* (2007) y Voge *et al.* (2012) o inductores como la hCG donde McCue *et al.* observaron una tasa de ovulación de 78,4% utilizando 2500UI, pero con disminuciones en la eficacia de la misma durante la aplicación repetida o en yeguas de edad avanzada. La formulación utilizada en este experimento clínico evidencia que no hubo diferencias significativas en la respuesta al tratamiento conforme a los grupos etarios de las reproductoras, observándose tasas de inducción ovulatoria similares.

De acuerdo a todo lo expuesto, resulta una alternativa competitiva y eficaz frente a otros productos farmacológicos, permitiendo así su uso en sistemas comerciales de producción equina. Algunas ventajas son la utilización de dosis pequeñas, la no necesidad de mantener el producto refrigerado, buena respuesta en yeguas de edad avanzada y que de acuerdo a múltiples reportes, no produciría respuesta inmunológica bloqueante de su propia acción a largo plazo.

Bibliografía

Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, *et al.* (2000). Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet Edu.* 12 (6):404-410.

Barrier-Battut L, Le Poutre N, Trocherie E, Hecht S, Grandchamp des Raux A, Nicaise JL, Vérin X, Bertrand J, Fiéni F, Hoier R, Renault A, Egron L, Tainturier D, Bruyas JF. (2001). Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. *Theriogenology.* (55):1679-1695.

Conn MP, Crowley WF. (1991). Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *The New England Journal of Medicine.* (324) 2: 93-103.

Conn MP, Huckle WR, Andrews WV and McArdle CA. (1987). The Molecular Mechanism of Action of Gonadotrofin Releasing Hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent progress in hormone research.* (43)29-60.

Cox TJ, Squires EL, and Carnevale EM. (2009). Effect of follicle size and follicle-stimulating hormone on ovulation induction and embryo recovery in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science.* (29) 4: 213–218.

Ginther OJ, Pierson RA. (1984). Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology.* (21)3:505–516.

Harrison LA, Squires E L, McKinnon AO. (1991) Comparison of hcg, buserelin and luproliol for induction of ovulation in cycling mares. *Journal of Equine Veterinary Science.* (11)3: 163-166.

Horspool L. (2015). *The equine edition of the compendium of animal reproduction.* Intervet International. 11° edition. 50-52.

Levy I, Duchamp GA. (2007). Single subcutaneous administration of buserelin induces ovulation in the mare: field data. *Reprod. Dom. Anim.* (42) 550–554.

McCue P, Hudson JJ, Bruemmer JE and Squires EL. (2004). Efficacy of hCG at Inducing Ovulation: A New Look at an Old Issue. *Proc. Am. Assc. Equ. Pract.* (50) 510 – 513.

McCue PM, Magee C and Gee EK. (2007). *Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares.* *Journal of Equine Veterinary Science.* 27 (2): 58-61.

McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011). *Equine Reproduction.* Second edition. 1873-1874. Wiley-Blackwell.

McKinnon AO, Voss JL. (1993). *Equine Reproduction.* 330-331. Lea & Febiger.

Newcombe JR, Cuervo-Arango J. (2018). Induction of multiple ovulation in mares following multiple treatment with low dose buserelin. *Journal of Equine Veterinary Science.* (66) 95.

INVESTIGACIÓN

Montesi *et al.*

Evaluación de dos dosis [...]

Newcombe R, Cuervo-Arango J.(2016). Comparison of the efficacy of different single doses of buserelin with hCG for timed ovulation induction in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. (41) 51-84.

Normandin L, Frilley C, Cochard A, Terris H, Bruyas JF. (2016).Efficacy of a single injection of buserelin acetate in saline solution and a single injection of hCG for the induction of ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 41. 69:82-83.

Padula AM. (2005). GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*. 88(1–2): 115–126.

Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayrard V. (2015) Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge,ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology*. (84)2:177-183.

Tazawa SP, Gastal MO, Silva LA, Evans MJ, Gastal EL. (2017). Preovulatory Follicle Dynamics, Ovulatory and Endometrial Responses to Different Doses of hCG, and Prediction of Ovulation in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. (56) 40-51.

Voge JL, Kendrick A, Brinsko SP, Burns PJ, Blanchard TL. (2012). Comparison of Efficacy of Two Dose Rates of Histrelin to Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*.32: 208-210.

Wilson CG, Downie CR, Hughes JP, *et al.* (1990). Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. (10) 4:301-308.

Agradecimientos

Al Laboratorio Cimol (Buenos Aires, Argentina) por la provisión de la formulación específica de Buserelina para la ejecución de estos ensayos.

Al Haras El Remanso (Corrientes, Argentina) por permitir el uso de sus instalaciones y la práctica sobre sus animales.