EFECTO DE LA SIMPLIFICACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN Y VIABILIDAD DE EMBRIONES EN LA RAZA OJALADA SORIANA

Ait-Amer-Meziane, M.[1], Buffoni, A.[1], Casao, A. [2], Abecia, J.A. [1], Forcada, F. [1], Calvo, J.L. [3] y Asenjo, B. [3]

[1] Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. mehdi_aa@hotmail.com

[2] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

[3] Escuela Universitaria de Ingenierías Agrarias de Soria

INTRODUCCIÓN

La eCG fue la primera hormona utilizada para superovulación en ovino. A pesar de su reducido precio y de la facilidad de su uso, la eCG tiene un problema relativo a su elevada vida media, alargando y alterando la sincronización de la ovulación e incluso induciendo la formación de folículos grandes que persisten tras la ovulación secretando estradiol. Además, la actividad eCG es variable entre lotes de fabricación y su aplicación repetida induce la formación de anticuerpos en algunos animales. La FSH, porcina u ovina, ha dado buenos resultados, si bien su reducida vida media conlleva que sean necesarios protocolos de varias inyecciones muy costosos en mano de obra y que además pueden resultar estresantes para los animales. La obtención de embriones in vivo de razas de reducido efectivo requiere la optimización de un protocolo de superovulación sencillo y efectivo.

La combinación en una única inyección de FSH y eCG ha sido ya probada en algunas razas como la Merino (Maxwell y Wilson, 1989), Sarda (Leoni et al., 2001), Rasa Aragonesa (Ledda et al., 1992) o Corriedale (Simonetti et al., 2008), obteniéndose buenos resultados con dosis de FSH reducidas al 66% o 50% de las utilizadas en los protocolos de varias inyecciones asociadas con dosis de eCG utilizadas en tratamientos de inducción-sincronización de celos a nivel comercial.

En el presente trabajo se pretende evaluar la eficacia de estos últimos protocolos combinados para superovulación en ovejas ojaladas evaluando la produción de embriones y su viabilidad tras la vitrificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se desarrolló entre septiembre y diciembre de 2008 en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, instalación que cumple todos los requisitos legales de la UE. Se utilizaron 40 ovejas de raza Ojalada Soriana, entre 3 y 8 años de edad, procedentes del rebaño experimental de la Excma. Diputación Provincial de Soria en San Esteban de Gormaz. Se testaron 2 protocolos de superovulación en ovejas sincronizadas con esponjas vaginales conteniendo 30 mg de FGA (Sincropart®, Ceva Salud Animal).

Por una parte, 8 ml (280 UI) de FSHp (Folltropin®, Bioniche Animal Health) administrados en un total de 6 inyecciones decrecientes (2, 1,5, 1,25, 1,25, 1, 1 ml) vía im cada 12 horas comenzando 48 horas antes de la retirada de la esponja (Grupo D; n=19); por otra, una única inyección de 6 ml de FSH (210 UI + 500 UI eCG vía im 48 horas antes de la retirada de la esponja (Grupo S; n=21). Se detectaron celos cada 4 horas desde las 24 hasta las 36 horas y desde las 48 a las 60 horas. Se realizó monta natural. Los embriones se recuperaron 8 días tras la retirada de la esponja por laparotomía con la ayuda de un catéter Foley, y se evaluaron de acuerdo a su estadio de desarrollo y a su morfología (Winterberger-Torres y Sevellec, 1987). Se consideraron como viables las mórulas compactas y los blastocistos jóvenes, expandidos y eclosionados, y como congelables los viables excepto los blastocistos eclosionados (Forcada et al., 2006). También se analizaron las tasas de recuperación (recuperados/tasa de ovulación), de fecundación (fecundados/recuperados), de viabilidad (viables/recuperados) y de congelabilidad (congelables/recuperados).

Los embriones fueron vitrificados de acuerdo con el protocolo de Naitana et al. (1997), de manera que todos los medios de vitrificación y descongelación fueron preparados con PBS suplementado con alcohol polivinilo (PVA) (50 mg/50 ml). Todos los procedimientos fueron desarrollados a 37ºC. Los embriones fueron congelados a razón de 2 por pajuela de

0,25 ml protegidos por dos columnas de sacarosa 0,25 M. Para la descongelación, las pajuelas fueron sumergidas en agua a 35ºC durante 10 segundos y su contenido vertido en una placa mezclando suavemente la solución de vitrificación con los embriones con la de sacarosa. Los embriones fueron recuperados y transferidos a una solución de sacarosa 0,25 M durante 3 minutos para permitir la eliminación del crioprotector. Tras una posterior permanencia de 10 minutos en una solución de PBS+20% de FCS para rehidratación, fueron cultivados en TCM-199+10% FCS a 39ºC en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Cada 12 horas se evaluaban las tasas de reexpansión y de eclosión como reflejo de viabilidad de los embriones descongelados. Tras el cultivo in vitro los blastocistos se transfirieron a un medio con 10 mM de DCHFDA, donde se mantuvieron durante 20 minutos. Tras ese tiempo, se tiñeron con Hoechst 33342 (10 µg/ml) durante 10 minutos, se fijaron con glutaraldehido al 1,5% y se montaron en portaobjetos con medio de montaje CC-Mount (Sigma-Aldrich, Co). Las células se contaron en un microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de producción de embriones en función del protocolo de superovulación se exponen en la Tabla 1. No se detectaron diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros analizados. Llama la atención el buen comportamiento de las ovejas ojaladas sorianas, de las que es esperable obtener entre 6 y 7 embriones congelables por oveja independientemente del tratamiento de superovulación recibido. Por tanto, hay que destacar los buenos resultados del tratamiento simplificado, incluso por encima de los obtenidos en raza Sarda (5,9 embriones viables/oveja; Leoni et al., 2001), siendo muy superiores a los 4 embriones viables por oveja señalados por Simonetti et al. (2008) en ovejas Corriedale, en ambos casos con dosis similares de ambas hormonas. Incluso, en el presente estudio el grupo simplificado mostró unas tasas de recuperación y de fecundación muy adecuadas, al contrario que lo referido por otros autores, que señalan que ambas se ven notablemente perjudicadas por la asociación hormonal en una única inyección (Ledda et al., 1992; Leoni et al., 2001).

En cuanto a los resultados de descongelación se refiere, fueron descongelados 33 embriones del grupo S y 18 del grupo D, todos ellos al menos en estadio de blastocisto joven. Las tasas de reexpansión fueron del 63,6% y del 50,0% respectivamente, porcentajes que se pueden considerar adecuados teniendo en cuenta que el cultivo se realizó sin soporte celular ninguno y que los embriones fueron vitrificados en presencia de PVA en lugar de FCS para evitar en síndrome de elevado peso al nacimiento que induce este último tras la transferencia. De hecho, el porcentaje de viabilidad del grupo S es muy similar al referido en la literatura con el uso de PVA en embriones de similar estadio (Naitana et al., 1997; Leoni et al., 2001), lo que parece confirmar la idoneidad del protocolo de superovulación utilizado. Por lo que al grupo D se refiere y aunque sería necesario aumentar el tamaño muestral para confirmar los resultados obtenidos, hay que señalar que en general y en el momento de la recuperación de embriones, se observó en ellos un estadio de desarrollo ligeramente anterior al mostrado por el grupo S. Es posible que la menor viabilidad mostrada por los embriones del grupo D pueda ser debida a ello, pues se ha visto que la viabilidad tras la descongelación se reduce en embriones vitrificados en estadio de blastocisto joven frente al expandido (Naitana et al., 1997). Los resultados del número total de células de los embriones descongelados (228±49 vs 65±11), superiores en el grupo S ($P<0,01$) parecen confirmar esta hipótesis.

En conclusión, el protocolo simplificado de superovulación utilizado en el presente trabajo parece ser muy adecuado para obtener una buena respuesta en hembras ojaladas, tanto en términos del número de embriones viables por oveja como en la viabilidad de los mismos tras la descongelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Forcada, F., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., Valares, J.A., Palacín, I. and Casao, A. (2006). The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on

embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. Theriogenology 65 (2): 356-365.
Ledda, S., Naitana, S., Cappai, P., Branca, A., Loi, P., Forcada, F., Abecia, J.A. & Zarazaga, L. (1992). *Actas de las VI Jornadas Cientificas de Reproducción Animal e IA* 298-303.
Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P., Ledda, S. & Naitana, S. (2001). *Reproduction Nutrition Development* 41: 239-246.
Maxwell, W.N.C. & Wilson, H.R. (1989). *Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology* 21: 50 (abstract).
Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M. & Cappai, P. (1997). *Animal Reproduction Science* 48: 247-256.
Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O.E., Carou, N., Alberio, R.H., Abecia, J.A. & Palacin, I. (2008). *Animal Reproduction Science* 104: 227-237.
Winterberger-Torres, S. & Sevellec, C. (1987). INRA, Paris.

Tabla 1. *Respuesta ovárica y producción de embriones de ovejas Ojalada de Soria tratadas con un protocolo de superovulación de 6 inyecciones decrecientes con un total de 280 UI de FSH (Grupo D) o con una única inyección de 210 UI FSH + 500 UI eCG (Grupo S)*

Tratamiento	FSH (D)	FSH+eCG (S)
Ovejas en celo (%)	18/19 (94,7)	18/21 (85,7)
Inicio celo, horas	29,3±1,6	26,4±1,1
Ovuladas con CL normal (%)	12/18 (66,6)	17/18 (94,4)
Tasa de ovulación	15,9±2,0	14,5±2,1
Estructuras recuperadas	10,7±1,7	11,3±1,8
Tasa de recuperación (%)	128/191 (67,0)	193/246 (78,4)
Embriones fecundados	9,2±1,9	8,6±1,9
Tasa de fecundación (%)	110/128 (85,9)	147/193 (76,2)
Embriones viables	7,8±1,7	7,7±1,6
Tasa de viabilidad (%)	94/128 (73,4)	131/193 (67,9)
Embriones congelables	6,4±1,5	6,6±1,6
Tasa de congelabilidad	77/128 (60,2)	113/193 (58,6)

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el INIA (Proyecto RZ2008-00002).

THE EFFECT OF SIMPLIFIED SUPEROVULATORY TREATMENTS ON EMBRYO PRODUCTION AND VIABILITY OF EWES FROM OJALADA SORIANA BREED

ABSTRAC: The effect of two superovulatory treatments (eCG/FSH in single dose -Group S; 21 ewes- or FSH alone in six decreasing doses – Group D; 19 ewes-) on the production of embryos and in vitro viability after vitrification was studied in the Spanish local Ojalada breed. The ovarian response and embryo production were assessed on Day 7 after oestrus. No differences were elucidated between groups either on ovulation rate 15.9±2.0 vs 14.5±2.1 corpora lutea for D and S groups, and number of viable (7.8±1.7 vs 7.7±1.6, respectively) and freezable (6.4±1.4 vs 6.6±1.6, respectively) embryos per ewe. After vitrification, re-expansion rates were 50,0% and 63,3%, respectively. After staining, blastocysts derived from group S showed a mean number of cells significantly higher than those derived from group D (228±49 vs 65±11; P<0.01). It was concluded that a single injection of eCG/FSH can be an efficient simplified superovulatory protocol in Ojalada ewes in terms of the number and viability of recovered embryos.

Keywords: superovulation, embryo viability, vitrification, sheep.