RENDIMIENTO DEL MOET APLICADO AL PROGRAMA DE SELECCIÓN DE LA RASA ARAGONESA DE UPRA-GRUPO PASTORES

Folch, J. [1], Alabart, J.L. [1], Lahoz, B. [1], Mozo, R. [1], Calvo, J.H. [1], Cocero, M.J. [2], Quintin, F. [3], Sevilla, E. [3], Hernández, M. [3], Ramón, J.[4], Olivera, J. [5], Echegoyen, E. [1], Sánchez, P. [1], Fantova, E.[6], Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores[6], Jurado, J.J. [7]
[1]CITA de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza; [2]INIA Departamento de Reproducción. Ctra. La Coruña Km 5.9, Madrid; [3]Centro de Mejora Ganadera. Av. de Movera s/n. Zaragoza; [4]ITC-CeSyRO Conkal, Yucatán, Mexico; [5]Fac. de Veterinaria, Ruta 3, km 363, Paysandú, Uruguay; [6]Grupo Pastores. Cº de Cogullada s/n. Zaragoza; [7]INIA Departamento de Genética. Ctra. de La Coruña Km 7.0 Madrid. jfolch@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La Unión de Productores de Rasa Aragonesa (UPRA) es una de las organizaciones gestoras del Libro de la Raza. UPRA mantiene desde 1994 un Programa de Selección por prolificidad basado en el testaje de moruecos por su descendencia, utilizando la inseminación artificial para la conexión de los rebaños y para la difusión de la mejora. La evaluación genética se realiza mediante BLUP modelo animal (Jurado y Cea, 2000). Los machos a testar se eligen entre los hijos de las madres de valor genético (VG) más alto del núcleo de selección y de los mejores sementales de la población (115.000 ovejas y 42 machos en 2014). En ganaderías semiextensivas, la localización de dichos corderos es dificultosa, por problemas de identificación y porque se comercializan a una edad muy temprana. Por otro lado, el valor genético con alta fiabilidad de una oveja se conoce cuando ya tiene una edad avanzada, lo que limita las posibilidades de tener un descendiente a testar. Por todo ello, UPRA acordó con el CITA de Aragón en 1998 que los machos a testar fueran producidos por superovulación y transferencia de embriones (MOET; Multiple Ovulation and Embryo Transfer). En este trabajo se resumen el rendimiento obtenido en el programa MOET en el periodo 1998 a 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS

Donantes. Se eligen entre las 200 ovejas de VG y fiabilidad más altos, para lo cual deben tener un mínimo de tres partos controlados. Deben ser negativas a Brucelosis, Visna Maedi, Paratuberculosis, Agalaxia, ser de genotipo no-sensible a Scrapie y cumplir con el estándar racial. Las ovejas se trasladan al CITA, donde son superovuladas e intervenidas después de un periodo mínimo de 30 días de adaptación. Las ovejas de las que no se consigue un número suficiente de embriones son operadas nuevamente a un intervalo mínimo de 3 meses, para asegurar descendientes machos.

Transferencia de embriones. Las donantes se tratan con esponjas (40 mg FGA, Intervet hasta 2009; 30 mg FGA, CEVA; posteriormente) durante 13 días siendo sustituidas por otras nuevas a los 7 días de su colocación. Hasta 2007, se superovularon con 8,8 mg de oFSH (NIADDK-oFSH-17, Ovagen^{TM}) en 8 dosis decrecientes (2 x 1,32; 4 x 1,1 y 2 x 0,88 mg) a 12h de intervalo. Desde 2008, 5 días antes de la inserción de la esponja de FGA se aplican dos inyecciones de Cloprostenol (125 μg) separadas 8 días, con el objetivo de presincronizar las donantes. La segunda esponja se retira coincidiendo con la séptima inyección. A partir de 2008, se sustituyó el OVAGEN por 8 dosis de pFSH (Folltropin). La fecundación se realiza por inseminación intrauterina 51h después de retirar las esponjas, con semen diluido y refrigerado a 15ºC (200 x 10^6 espermatozoides/oveja), de machos selectos del Programa, localizados en Centro de Mejora Ganadera (CMG) del Gobierno de Aragón. Los emparejamientos se realizan evitando que machos y hembras tengan algún abuelo común, con el fin de evitar consanguinidad.

Los embriones se obtienen siete días después de retirar las esponjas por perfusión retrógrada desde la parte distal del cuerno a la unión útero-tubárica (Ramón et al., 1991) bajo anestesia general. A partir de 2008, la recogida se realiza con sonda Foley (sentido de lavado inverso) y los embriones se biopsian previamente a su transferencia para determinar el sexo, genotipo frente a scrapie (Dervishi et al., 2011) o presencia del alelo prolífico *FecX*^{R}. Los oocitos no fertilizados y embriones degenerados son eliminados. Se transfieren dos mórulas o blastocistos viables (grados 1 a 3; Overstrom, 1996) a receptoras tratadas con

FGA + eCG, asegurando que presenten al menos una ovulación. Los partos se controlan en jaulas individuales, realizando la identificación genética en todos los casos desde 2006. A la edad de 6 meses, los machos que cumplen el estándar racial y los controles sanitarios obligatorios ingresan en el CMG para ser testados.
Las diferencias de resultados en función del periodo, número de obtenciones y valor genético se analizaron mediante el procedimiento CATMOD de SAS (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se han localizado en las ganaderías 213 ovejas donantes que se superovularon entre 1 y 5 ocasiones, totalizando 331 tratamientos (1,55 tratamientos/donante en promedio) en 37 sesiones. El 20,5% de las perfusiones previstas no se realizaron por problemas de metritis, cuerpos lúteos regresados o ausencia de respuesta a la superovulación. Estos problemas afectaron a un 15% de las donantes (32) que no se pudieron perfundir. En las restantes 181 se realizaron un total de 263 perfusiones. De ellas, se recuperaron 3.076 estructuras embrionarias, el 20,9% de las cuales correspondieron a oocitos no fertilizados y el 12,9% a embriones no viables. En concreto, no se consiguió obtener ningún embrión viable (transferible) en 13 de las 181 donantes perfundidas (6,1% respecto del total de donantes). De las 168 restantes se obtuvieron 2.037 embriones viables. El rendimiento por donante fue de 11,3 embriones viables por cada una de las 181 donantes perfundidas, y de 12,1 por cada una de las 168 donantes que produjeron embriones transferibles. El rendimiento por cada tratamiento (n=331) fue de 6,2 embriones viables y 7,7 embriones viables por cada perfusión realizada (n=263).
De los 2.037 embriones viables obtenidos, se transfirieron en fresco 1.684 (el 82,7%), procedentes de 209 perfusiones realizadas en 152 donantes, mientras que los restantes se congelaron o se destinaron a otros usos.
Se obtuvo descendencia del 76,5% de las 213 donantes localizadas. Del 23,5% restante, no se obtuvo descendencia por no poderse perfundir (n=32), por no obtenerse embriones viables de las perfusiones (n=13) o por no haber nacimientos de los embriones transferidos (n=5). Nacieron 931 corderos (50,5% machos y 49,5% hembras). Es decir, se obtuvo un promedio de 6,1 corderos nacidos (CN) por donante perfundida (DP) y de 6,6 por donante que produjo embriones viables, en el total de los tratamientos. El número medio de corderos nacidos por cada perfusión fue de 4,5. Globalmente, la supervivencia embrionaria de los embriones transferidos en fresco fue del 55,3%.
Los resultados han variado en función de muchos factores. La experiencia y la mejora de la metodología se ha traducido en que el número de corderos nacidos por donante perfundida en su primera obtención tendió a aumentar a lo largo del tiempo: 3,6, 4,9 y 5,2 CN/DP en los periodos 1998-2001; 2002-2007 y 2008-2013, respectivamente ($P<0,14$). La repetición de las obtenciones ha complicado las cirugías debido a la formación de adherencias y ha disminuido el número de CN/DP: 4,7, 4,5, 1,8 y 2,0 en la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª+5ª obtenciones, respectivamente ($P<0,0001$). A raíz de estos resultados, a partir de 2008 se decidió no operar a las donantes más de dos veces.
La respuesta individual a los tratamientos ha sido muy variable. El número de embriones recogidos estuvo positivamente relacionado con el número de folículos de 2-3 mm al inicio del tratamiento con FSH, mientras que la presencia de grandes folículos (>6 mm) fue perjudicial (Folch et al., 2004). La supervivencia embrionaria (número de fetos/número de embriones transferidos) depende tanto de la calidad del embrión como de la receptora (Olivera et al., 2004). Así, la respuesta a la superovulación en el primer tratamiento de las donantes en que se lavaron ambos cuernos fue mayor en aquellas de VG alto: 16,7 *vs.* 13,6 CL en donantes de VG superior e inferior a 12,21, respectivamente ($P<0,01$). En las receptoras, el mayor número de CN se ha obtenido en las que presentan tasa de ovulación doble bilateral (Alabart et al., 2005).
El número medio de CN por cada perfusión ha sido de 4,5 con gran variación individual (de 0 a 20; D.S.: 4,2). En total, se han enviado 226 corderos al CMG para ser testados (48,1% de los nacidos). Los restantes fueron rechazados por no cumplir con el estándar racial.
A pesar de las limitaciones de la variabilidad individual de las donantes y de las exigencias morfológicas de los corderos producidos, el MOET mejora la presión de selección y el control

de descendencia, con la garantía sanitaria que ofrece la transferencia de embriones (IETS, 2011). La eficiencia de la transferencia de embriones aumentará próximamente con la identificación electrónica de donantes en las ganaderías, la elección de donantes por la tasa de AMH (Lahoz et al., 2015), la disponibilidad de FSH recombinante, etc. La biopsia de embriones por láser facilitará el sexado sin alterar los resultados (Alabart et al., 2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alabart et al., 2005. Reprod. Fert. Dev. 27(1): 162-163 • Alabart et al., 2015. Reprod. Fert. Develop. 27(1): 264. • Dervishi et al., 2011. Reprod. Dom. Anim 46: 999-1003 • Folch et al., 2004. Reprod. Dom. Anim.: 512. • IETS, 2011. Manual IETS • Jurado, J.J. y Cea, R., 2000. OVIS 68: 37-51 • Lahoz et al., 2015. Reprod. Fert. Develop. 27(1): 162-163 • Olivera et al., 2004. Reprod Fert. Develop 16: 514 • Overstrom, E.W., 1996. Theriogenology 45:3-16. • Ramón et al., 1991. ITEA Vol Extra 11(1):61-63. • SAS Institute Inc. 2012. SAS OnlineDoc® 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Agradecimientos: Financiación: Acuerdos de colaboración Oviaragón con CITA; INIA y CENSYRA. Financiación parcial a través del proyecto Ciencia Básica CONACYT 164592. Participación del Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores: Blasco M.E., Galeote A., Gallego B., Riaguas L., Roche A., Servera E. y Yarritu J.

Tabla 1*.Resumen de resultados de embriones obtenidos, transferidos en fresco y corderos nacidos en el programa MOET*

	Obtenidos			Transferidos	Corderos Nacidos		
	EE	NF	NV	ET	Totales	Machos	Machos a testar *
Donantes recogidas	14,4 (3076/213)	3,0 (643/213)	1,9 (397/213)	---	---	---	---
Donantes perfundidas	17,0 (3076/181)	3,6 (643/181)	2,2 (397/181)	11,1 (1684/152)	6,1 (931/152)	3,1 (470/152)	1,5 (226/152)
Perfusiones realizadas	11,7 (3076/263)	2,4 (643/263)	1,5 (397/263)	8,0 (1684/209)	4,5 (931/209)	2,2 (470/209)	1,1 (226/209)

EE: estructuras embrionarias (incluye NF y NV), NF: no fertilizados, NV: no viables, ET: embriones viables transferidos; * Entregados al CMG (Centro de Mejora Ganadera).

PERFORMANCE OF THE MOET APPLIED TO THE PROGRAM OF SELECTION OF THE RASA ARAGONESA BREED OF THE UPRA-GRUPO PASTORES

ABSTRACT: In the selection scheme to improve prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed, the males to be tested are produced by a MOET programme, using the ewes of higher genetic value as donors. In the period 1998-2013, a total of 331 flushings have been performed in 213 donor ewes. Ewes were treated with FGA sponges and superovulated with 8.8 mg of oFSH (Ovagen) in eight decreasing doses (2 x 1.32; 4 x 1.1 and 2 x 0.88 mg) at 12h intervals. Since 2008, Ovagen was replaced by Folltropin. Intrauterine insemination ($200x10^6$ spermatozoa/ewe) with fresh semen from selected rams was carried out 51h after sponge withdrawal. A total of 3076 embryos were obtained (2037 morphologically viable), 1551 of which were fresh-transferred to FGA+eCG synchronized recipients (two morulae or blastocysts per recipient). A total of 931 lambs were born (470 males), 226 of which were suitable to be tested. The efficiency of the MOET program has been influenced by many factors, such as the improvement of the techniques, the number of flushings per donor, the genetic value of the donor or the ovulation rate of the recipient. The importance of MOET in the selection scheme is discussed.

Keywords: ovine; embryo transfer; genetic program