

“PROTOSCOLOS DE SUPEROVULACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES OVINOS”

Morales María^a; Vargas Juan^a; Salazar Richard^{a*}, Mancheno Richard^b

^a Facultad Medicina Veterinaria y Zootenia, Universidad Central del Ecuador, Ciudadela Universitaria: Jerónimo Leiton y Gato Sobral s/n, , Quito, Ecuador

^b Centro de Biotecnología de la Reproducción Genética 3000, La Merced de la Fontana, Pasaje s/n, La Unión Mejía, Machachi, Ecuador

Ingresado: 24/05/2017

Aceptado: 15/03/2019

Resumen

Este estudio determina el efecto de un tratamiento de superovulación y transferencia de embriones, realizado en ovejas Poll Dorset (n=16) en los meses de septiembre-octubre, en la Hacienda Zuleta y Anexas S.A. situada a una altitud de 2885 msnm. En el día 0 se colocó una esponja intravaginal Chronogest[®] CR durante 9 días, en el día 7 se administró en el Tratamiento I (1000 UI eCG Folligon[®]) y el Tratamiento II (1500 UI de eCG Folligon[®]), el día 9 se administró un análogo de la prostaglandina F2 α (Lutalyse[®] 10mg) conjuntamente con el retiro de la esponja, y al momento del celo se aplicó un análogo de GnRH (Conceptal[®] 8 μ g), se realizó la inseminación artificial cervical 48 horas post retiro de esponja intravaginal. La recuperación embrionaria se realizó 6 días posteriores por laparotomía. El número de cuerpos lúteos obtenidos en el tratamiento I (5,40 \pm 3,02) tratamiento II (9,80 \pm 5,20). Se demostró que (P<0,05) sí existe una diferencia significativa en la respuesta superovulatoria entre tratamientos. El número de embriones obtenidos tratamiento I (0,63 \pm 1,41), tratamiento II (2,13 \pm 2,30) donde (P>0,05) no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. Se concluyó que el Tratamiento II, mostró una mejor respuesta a la superovulación frente al Tratamiento I. Sin embargo, para la recolección de embriones los dos tratamientos no presentan ninguna diferencia.

Palabras clave: *Calidad embrionaria, cuerpo lúteo, inseminación artificial, ovulación múltiple, sincronización.*

“PROTOCOLS OF SUPEROVULATION USING DIFFERENT DOSES OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) IN THE SHEEP EMBRYOS PRODUCTION”

Abstract

The effect of a superovulation and embryo transfer treatment on Dorset Poll sheep (n = 16) in the months of September-October, at Hacienda Zuleta and Anexas S.A. At an altitude of 2885 meters above sea level. On day 0 an intravaginal Chronogest[®] CR sponge was placed for 9 days, on day 7 was administered in Treatment I (1000 IU Folligon[®] eCG) and Treatment II (1500 IU of Folligon[®] eCG) a prostaglandin F2 α (Lutalyse[®] 10mg) analogue was administered on day 9 in conjunction with the removal of the sponge, and at the time of estrus a GnRH analogue (Conceptal[®] 8 μ g) was administered, the artificial insemination was performed at 48 hours post removal of intravaginal sponge. Embryo recovery was performed 6 days later by laparotomy. The number of corpora lutea obtained in treatment I (5,40 \pm 3,02) treatment II (9,80 \pm 5,20). It was demonstrated that (P < 0,05) if there is a significant difference in superovulatory response between treatments. The number of embryos obtained treatment I (0,63 \pm 1,41), treatment II (2,13 \pm 2,30) where (P > 0,05) there was no significant difference between treatments. It was concluded that Treatment II, showed a better response to

* Correspondencia a: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootenia, Universidad Central del Ecuador, Ciudadela Universitaria: Gerónimo Leiton y Gato Sobral s/n, Quito, Ecuador. Teléfono: +593 997008051; +593 999816638.

Correo electrónico: rsalazar@uce.edu.ec

superovulation than Treatment I. However, for the collection of embryos the two treatments do not present any difference.

Keywords: *artificial insemination, corpora lutea, embryo quality, multiple ovulation, synchronization.*

I. INTRODUCCIÓN

El progreso genético ovino ha sido limitado debido al manejo bajo sistemas de reproducción tradicionales, siendo un factor limitante para acelerar dicho progreso, tomando en cuenta que bajo condiciones de manejo tradicionales el número de corderos durante la vida productiva de una oveja es de 6 a 8. La sincronización de celos, estimulación hormonal y la transferencia de embriones permiten incrementar el potencial reproductivo de las ovejas especialmente las de alto valor genético logrando aprovechar la reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario, dando como resultado un mayor número de corderos por hembra en un menor período de tiempo. [1] Por tanto, el estudio del control del ciclo estral en las ovejas y la respuesta ovulatoria, al ser un sistema controlado por las hormonas ha generado una constante investigación, creando un mejor entendimiento de los mecanismos de acción fisiológicos en busca de estrategias que puedan mejorar los resultados y eficiencia de los tratamientos con hormonas exógenas, incluyendo tratamientos como: sincronización de celos, inseminación artificial (IA), ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET), aumentando así el número de embriones recuperados y reduciendo la mortalidad embrionaria. [2]

Implementar la transferencia de embriones (TE) permite disminuir el intervalo entre generaciones y aumenta la tasa reproductiva de las hembras en forma similar al rol de la inseminación artificial en los machos, [3] tomando en cuenta que la importación de un animal con alto valor genético puede ser un proceso largo y costoso; la transferencia de embriones es más sencilla, con la ventaja de obtener animales de alto valor genético, con un adecuado manejo sanitario, evitando la transmisión de enfermedades facilitando el transporte del material genético a través de grandes distancias, [4] además, permitirá crear programas de producción más eficientes y con alta rentabilidad, utilizando

una menor inversión inicial, y, en los programas de producción existentes permitirá mejorar la genética a un menor costo. [1]

Dentro de los protocolos (MOET), el uso de gonadotropina coriónica equina (eCG) presenta ventajas al ser un tratamiento económico, se administra en una sola dosis lo que evita el manejo excesivo que resulta ser un factor estresante para los animales criados en sistema de producción extensivo y dicho estrés resulta ser perjudicial para el rendimiento reproductivo. [5]

A pesar de diversos trabajos de investigación realizados por años en los que se trata de predecir la respuesta ovulatoria, se han logrado resultados variables, debido a múltiples factores que intervienen en dicha respuesta, lo que sigue representando el factor limitante en este tipo de biotecnología reproductiva. [6] Esta idea coincide con otros autores que mencionan que existen otros factores que pueden afectar la respuesta ovulatoria, tales como: hormonales, ambientales, e intrínsecos de cada animal y del estado funcional del ovario. [7] En el Ecuador la inexistencia de programas de mejoramiento genético ovino, así como la escasa investigación en el área mencionada ha llevado a una ineficiencia reproductiva de las producciones ovinas en el país. Por ello esta investigación tiene por objetivo comparar dos protocolos de superovulación utilizando diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) en la producción de embriones donde se evaluará el efecto de las dosis de eCG mediante el conteo de cuerpos lúteos, y se determinará el número de embriones recuperados.

II. METODOLOGÍA

2.1. Animales y su entorno

El estudio se realizó en 16 ovejas de la Hacienda Zuleta y Anexas S.A, ubicada en la provincia de Imbabura, Cantón Ibarra, Parroquia Angochagua, a una altitud de 2589 msnm [8] entre los meses de septiembre y octubre del 2016. Las características de inclusión de las ovejas en estudio fueron: tener edad de 2-4 años, condición corporal entre 3-3,5 y con un peso entre 65-75 kg, no gestantes, alimentadas al pastoreo y con suplementación de concentrado y sales minerales. Los animales experimentales se encontraron bajo las mismas condiciones sanitarias y nutricionales de manejo.

2.2. Tratamientos

Se sincronizó las ovejas aplicando esponjas intravaginales impregnadas de Progesterona sintética (Chronogest® CR), durante 9 días, acompañada de 1ml de selenio (Seleben E®) vía intramuscular; la superovulación se estimuló administrando eCG (Folligon®) en el tratamiento I a una dosis de 1000 UI de eCG (Folligon®), y para el tratamiento II a una dosis de 1500 UI de eCG (Folligon®), vía intramuscular 48 horas antes de retirar la esponja. [9] Se retiró la esponja el día 9 acompañado de la aplicación intramuscular de un análogo de la prostaglandina F2 α (Lutalyse® 10mg). [10,11] Se detectó estro 24 horas después de retirada la esponja, y se aplicó un análogo de GnRH (Conceptal® 8 μ g) a las hembras que se mostraron receptivas al macho en la detección. [12] Las ovejas, recibieron inseminación artificial cervical 24 horas después de detectado el estro a una dosis de 0,20 ml de semen fresco con un aproximado de 100 millones de espermatozoides. [13]

2.3. Respuesta ovulatoria y recuperación de embriones

Las ovejas fueron pre-anestesiadas con Xilazina 2%, a una dosis de 0,2mg/kg por vía IM, anestesiadas con Ketamina 5%, usando una dosis de 0,2mg/kg por vía IV, además se aplicó lidocaína al 2% como anestésico local, colocado en la cara ventral del abdomen, a 6 cm por delante de la ubre. Los embriones fueron recuperados mediante laparotomía ventral media. [14]

Los ovarios fueron exteriorizados y contabilizados los cuerpos lúteos, se perforó el cuerno uterino para insertar la sonda Folley en la luz uterina, a través de esta sonda se inyectó 20-25 ml del medio (Bio-Life™ Advantage Embryo collection medium), creando una corriente de arrastre, [15] lo que permitió recuperar el medio y colocarlo en un filtro para embriones (Emcon). [2] Finalmente fue administrado un antibiótico de amplio espectro, larga acción (Shotapen® LA) por vía IM, y un análogo de la prostaglandina F2 α (Estrumate®). [16]

El contenido recuperado en el filtro fue vertido sobre una caja Petri cuadrículada para búsqueda de embriones, usando un estereomicroscopio con un aumento de 10X, una vez localizados los embriones fueron colocados en una caja Petri con medio de mantenimiento Holding (Syngro® Holding Media).

Su clasificación se realizó con un lente de aumento 40X y de acuerdo a los estándares establecidos por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS). [2,17]

2.4. Valoración de la calidad embrionaria

Clasificación elaborada por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS). Tomado de [1].

Calidad 1 (Excelente). Embrión ideal, esférico, simétrico, con células de: tamaño, color y textura uniforme. Desarrollo embrionario correspondiente al día de recolección. No existen defectos visibles, los blastómeros y la zona pelúcida está intactas.

Calidad 2 (Bueno). Posee imperfecciones triviales, el embrión tiene pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas. Su forma puede ser ligeramente irregular.

Calidad 3 (Regular). El embrión posee defectos definidos: detritus celulares, forma irregular, color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida. Pocas células degeneradas, vesículas y presencia de blastómeros desprendidos.

Calidad 4 (Malo). El embrión posee severos defectos: correspondientes a la calidad 3 más un desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida (el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma), forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. Incluye a los estados hasta 8 células y la degeneración. Esta categoría de embriones no es transferible.

2.5. Análisis estadístico

El número de cuerpos lúteos observados y el número de embriones obtenidos (variables dependientes), fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza simple. Los datos originales tuvieron una transformación logarítmica para su análisis, con el PROGRAMA STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.18 (32bits).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados para la respuesta estral y superovulatoria se presentan en la Tabla 1. El número de ovejas que presentaron celo fue del 100% en los dos grupos. Estos resultados son superiores

a los encontrados en un estudio previo [9] donde con un tratamiento de 1200UI y 1600UI de eCG se encontraron el 83,3% y 100% respectivamente, posiblemente debido a la época reproductiva y la buena condición de los animales en que se realizó la investigación.

superovulatorio en ovejas, disminuyendo el número de ovulaciones, viabilidad y la recuperación embrionaria, asociando la presencia de un folículo dominante con disminución en la tasa de ovulación y recuperación embrionaria. [18,19]

Tabla 1. Respuesta al tratamiento superovulatorio utilizando eCG.

	Tratamiento I	Tratamiento II	Valor-P
Número de ovejas tratados	8	8	
Hembras que presentaron celo	8/8 (100%)	8/8 (100%)	NS
Hembras superovuladas	7/8 (87,5%)	8/8 (100%)	NS
Número de cuerpos lúteos observados	5,40±3,02	9,8±5,20	p<0,05
Embriones viables por oveja	0,63±1,41	2,13±2,30	NS

NS: p>0,05

La respuesta superovulatoria determinada por el número de cuerpos lúteos (CL) (Tabla 1) fue alta y se registraron diferencias entre los grupos. En el tratamiento I, el 87,5% de los animales respondió con un promedio 5,40 ±3,02 CL y en el tratamiento II respondió el 100% de los animales con un promedio 9,8±5,20 CL, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (p >0,05) entre el promedio de CL del tratamiento I y II. Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio [9] donde con un tratamiento de 1200UI y 1600UI de eCG se encontró el 100% de respuesta en los dos tratamientos, y obtuvieron 6,2±0,8 CL y 11,0±3,0 CL respectivamente, encontrando una diferencia estadísticamente significativa (p >0,05) entre los tratamientos. Coincidiendo también estos resultados con un reporte [12] donde obtuvieron 7,33±0,54 cuerpos lúteos utilizando una dosis de 1200 UI de eCG.

Existe una relación directa, cuando mayor es el número de folículos después de la primera inyección utilizando pFSH (hormona folículo estimulante de origen porcino), mayor es el número de CL y embriones viables después de la superovulación. [7] Puesto que a pesar de la existencia de los receptores de gonadotropina sólo una parte de folículos podría utilizar FSH exógena para el crecimiento que culminará en la ovulación y posterior formación del CL, varios autores mencionan que la dominancia folicular tiene un efecto perjudicial sobre el resultado

El promedio de embriones viables (IETS), [2,17] que se obtuvieron (Tabla 1) en el tratamiento I fue 0,63±1,41 por donadora y en el tratamiento II el número de embriones viables fue 2,13±2,3. (p >0,05) lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los embriones viables. Dichos resultados son similares a un estudio con similares condiciones donde con dosis de 1200 UI de eCG y 1600 UI de eCG obtuvieron un promedio de 1,0±0,5 embriones viables en ambos tratamientos sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa). [10] El resultado de 0,63±1,41 embriones recuperados por donadora, difiere de lo reportado por Azawi et al., (2011) en cuyo estudio se recuperaron 4,32±0,56 embriones a una dosis de 1200UI de eCG, pudiendo deberse esta diferencia a los factores endógenos y exógenos antes mencionados.

Los estudios anteriores demostraron que una dosis alta de eCG puede causar el desarrollo de folículos anovulatorios, probablemente debido a la larga vida media de esta hormona. Dichos folículos con una alta producción hormonal podrían causar elevadas concentraciones de estradiol, afectando el medio uterino interfiriendo con el transporte y viabilidad de los óvulos al momento de la captura por las fimbrias y espermatozoides a través del tracto genital femenino afectando la recuperación de embriones. [5,9,16]

Existen estudios que mencionan otro factor capaz de interferir en la recuperación embrionaria y es una aparición temprana del estro con picos preovulatorios de LH circulante generando una mayor tasa de ovulación, [19] a pesar de ello, disminuyó significativamente la tasa de recuperación embrionaria, anulando el beneficio por número de ovulaciones en ovejas.

Estudios que comparan tratamientos superovulatorios utilizando pFSH y eCG, coinciden que la pFSH produjo mayor número de embriones viables y mejor desarrollados, en comparación con la eCG. Posiblemente esto se debe a que la pFSH, al ser una glucoproteína natural, es metabolizada eficientemente. [9,21]

Un punto crítico en la producción de embriones ovinos es la variabilidad en la respuesta ovulatoria, generando una falta de consistencia en cuanto a resultados de varios estudios. Por lo que sería necesario ampliar la orientación de las investigaciones, considerando no solo los factores exógenos como lo son: protocolos de superovulación, origen y pureza de las hormonas utilizadas, sino enfocarse también en la evaluación de aspectos relacionados con factores endógenos de cada animal como lo son: genética, estado nutricional, número de folículos en la onda folicular, concentraciones séricas de hormonas ováricas (inhibina A, estrógeno, FSH y LH endógena), y tomar en cuenta también presencia y número de estructuras ováricas (folículos y CL), incluso sería factible considerar el flujo sanguíneo en el tracto reproductivo. [21,18]

Dichos factores antes mencionados en conjunto van a inferir y modificar la respuesta ovulatoria y la recuperación embrionaria, para lo cual sería necesario realizar amplias investigaciones que permitan evaluar la relación que existe entre varios aspectos como perfiles hormonales, evaluación ecográfica de características y cambios en los ovarios de los animales evaluados, antes y durante la sincronización, también durante el tratamiento superovulatorio hasta la recuperación embrionaria, que podrían tomarse en cuenta para futuros estudios.

IV. CONCLUSIONES

El tratamiento II (1500 UI de eCG Folligon®) mostró una mejor respuesta a la superovulación, frente al tratamiento I (1000 UI de eCG Folligon®) y produjo $5,40 \pm 3,02$ CL en las ovejas tratadas, además el tratamiento II mostró mayor número de embriones viables $2,13 \pm 2,30$, frente a $0,63 \pm 1,41$ embriones recuperados del tratamiento I. Este estudio demostró que es posible implementar programas de transferencia de embriones bajo sistemas de crianza extensiva sobre los 2,500 m.s.n.m., permitiéndonos aprovechar este potencial genético de animales que ya poseen adaptación al medio ambiente.

V. AGRADECIMIENTOS

A la Hacienda Zuleta y Anexas Cía. Ltda. por consentir el uso de sus instalaciones y animales en la realización de esta investigación, permitiendo fomentar el desarrollo de la investigación en nuestro país; a la Empresa IMPVET Cía. Ltda. por su aporte con productos, que fueron usados en el desarrollo de este proyecto.

VI. REFERENCIAS

- [1] A. Gibbons, M. Cueto (2013) "Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos", 2° Edición. Bariloche, Argentina, INTA EEA Bariloche, pp. 6-20.
- [2] P. E. Phillips, M. M. Jahnke (2016) "Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients)", Vet. Clin. North Am.: Large Anim. Pract. 32(2), 365-385.
- [3] H. W. Vivanco-Mackie (2001) En "Biotecnología de la reproducción", (Ed.: G. A. Palma), Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, pp. 603-636.
- [4] A. Abecia, F. Forcada Miranda (2010) "Manejo reproductivo en ganado ovino", 1° Edición. Servet, Diseño y Comunicación, S.L., España, pp. 177-180.
- [5] L. Simonetti, F. Forcada, O.E Rivera, N. Carou, R.H. Alberio, J.A. Abecia, I. Palacin (2008) "Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes", Anim. Reprod. Sci. 104(2-4), 227-237.
- [6] X. Liu, Q. Dai, E. J. Hart, D. M. W. Barrett, N. C. Rawlings, R.A. Pierson, P.M. Bartlewski (2007) "Ultrasonographic characteristics of ovulatory

- follicles and associated endocrine changes in cyclic ewes treated with medroxyprogesterone acetate (MAP)-releasing intravaginal sponges and equine chorionic gonadotropin (eCG)”, *Reprod. Domest. Anim.* 42(4), 393-401.
- [7] F. Mossa, P. Duffy, S. Naitana, P. Lonergan, A. C. O. Evans (2007) “Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes”, *Anim. Reprod. Sci.* 100(3-4), 391-396.
- [8] Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural de Angochagua (2015) “Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial”, Ibarra, Ecuador, Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural de Angochagua.
- [9] M. R. Blanco, L. Simonetti, O. E. Rivera (2003) “Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments”, *Small Rumin. Res.* 47(3), 183-191.
- [10] H. Aski, A. Masoudi, Z. Shahneh, A. Asadzadeh, S. Dirandeh, E. Sadeghipanah (2016) “The effect of equine chorionic gonadotrophin (eCG) injection combined with prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) and gonadotrophin releasing hormone treatment on reproductive performance of Zandi ewes during non-breeding season (GnRH)”, *Arch. Razi Inst.* 71(4), 269-276.
- [11] F. Durán Ramírez (2013) “Inseminación y transferencia de Embriones en animales de granja”, 1° Edición. Bogotá, Colombia, Grupo Latino Editores, pp. 232-234.
- [12] O. I. Azawi, M. K. M. A. Al-Mola (2011) “A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation”, *Trop. Anim. Health Prod.* 43(7), 1351-1355.
- [13] J. Sanchez, O. Mejia, A. Manzur (2014) “Programa de transferencia de tecnología en aplicación de técnicas asistidas para ovinos en el trópico” IDIA XXI. 18-22.
- [14] V. R. Fajt, D.G. Pugh (2012) En “Sheep and Goat Medicine”, (Ed.: D. G. Pugh, A. N. Baird), Elsevier, EEUU, pp. 579-595.
- [15] C. J. Morrow, G. W. Asher, D. K. Berg, H. R. Tervit, P. A. Pugh, W. H. McMillan, S. Beaumont, D. R. H. Hall, A. C. S. Bell (1994) “Embryo transfer in fallow Deer (Dama dama): Superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos”, *Theriogenology* 42(4), 579-590.
- [16] J. A. Abecia, F. Forcada, A. González-Bulnes (2012) “Hormonal control of reproduction in small ruminants”, *Anim. Reprod. Sci.* 130(3-4), 173-179.
- [17] E. G. Aisen (2004) “Reproducción ovina y caprina”, 1° Edición. Buenos Aires; Argentina, Editorial Inter-médica S.A.I.C.I., pp 146-147.
- [18] P. M. Bartlewski, P. Seaton, M. E. Franco Oliveira, R. T. Kridli, M. Murawski, T. Schwarz (2016) “Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow”, *Theriogenology* 86(1), 130-143.
- [19] M. Bruno-Galarraga, M. Cueto, A. Gibbons, F. Pereyra-Bonnet, M. Subiabre, A. González-Bulnes (2015) “Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs”, *Theriogenology* 84(5), 784-790.
- [20] N. Garzón, R. Urrego, C. A. Giraldo (2007) “Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos”, *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2(2), 68-77.
- [21] G. S. Amiridis, S. Cseh (2012) “Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants”, *Anim. Reprod. Sci.* 130(3-4), 152-161.