

VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS DE PELO

González-Parra E.I; Erosa-Denis S; Aguiar-Loría A; Piña-Aguilar R.E; López-Saucedo J; Navarrete-Sierra L.F., Ramón-Ugalde J.P. 2007. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. Centro de Selección y Reproducción Ovina, Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal, México. jramon@itaconkal.edu.mx
www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Inseminación artificial ovinos](#)

RESUMEN

Para obtener embriones frescos se utilizaron 22 ovejas donantes suplementadas con levaduras (Yea-Sacc®), y 71 ovejas receptoras, todas de la raza Pelibuey. La sincronización del estro fue mediante esponjas vaginales (40mg FGA) durante 12 días. La superovulación en las donantes consistió en la aplicación de 200mg-NIH FSHp, en dosis decrecientes cada 12 horas, siendo la primera aplicación 72 horas antes del retiro de las esponjas. Se inseminaron intrauterinamente con semen fresco (100×10^6 spz) a las 56 horas del retiro de las esponjas. La recuperación de embriones se realizó por endoscopia y se vitrificaron con soluciones a base de Glicerol y Etilenglicol. La TO de las ovejas donantes fue de 11.0 y la TR del 58%, de las cuales, el 64.5% fueron embriones viables (EV). De 91 EV, 44 se transfirieron en fresco y 41 se vitrificaron. La fertilidad obtenida a los 17 días postransferencia fue del 47.72% y 37% en embriones frescos y vitrificados. Los resultados permiten concluir que es posible utilizar la técnica de vitrificación de embriones ovinos bajo condiciones de clima tropical con resultados de fertilidad aceptables.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción pecuaria en países tropicales han incorporado exitosamente a los ovinos de pelo, se estima que comprenden aproximadamente el 10 % de la población de ovejas del mundo (Bradford y Fitzhugh, 1983), originalmente se localizaron principalmente en regiones tropicales de África, Sur América y el caribe (Wilddeus, 1997). Uno de los países más importantes con intensiva producción de ovejas en Latino América es México, donde, existen diferentes razas de ovejas, incluyendo ovejas de pelo tales como el Pelibuey, Blackbelly, Katahdin, Saint Croix, Dorper y razas de lana como el Dorset, Hampshire, Rambouillet, Romanov, Suffolk, Charollais, East Fresian y Texel (Asociación Mexicana de Criadores de Ovejas, <http://www.asmexcriadoresdeovinos.org>). Sin embargo, de entre todas destaca la raza Pelibuey, que compone del 90 al 95% del total de ovejas de pelo de la población en México (González-Reyna, 1991). De ahí que actualmente existe interés por su multiplicación mediante programas de mejoramiento genético, mismo que incorpora técnicas de reproducción asistida. De entre ellas, la vitrificación es un método simple, práctico, económico y de fácil aplicación en animales de laboratorio y de campo. Es un método de congelación en el que debido a la alta concentración de crioprotectores y ultrarrápida velocidad de enfriamiento, cuando se congela el sistema embrión-medio, se solidifica sin la formación de cristales de hielo. La vitrificación de embriones permite que las ventajas que ofrecen las tecnologías de reproducción asistida, aumenten significativamente, ya que posibilita utilizar eficientemente a las donantes y receptoras. Actualmente es posible obtener embriones viables luego de un proceso de vitrificación, además, la vitrificación tiene ventajas sobre la congelación, ejemplo de esto tenemos que el tiempo de congelación va desde un a varias horas, mientras que en la vitrificación no lleva más de treinta minutos (González-Parra, 2005). El objetivo de este trabajo fue estudiar la eficiencia de la técnica de vitrificación sobre la supervivencia de embriones ovinos bajo condiciones tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Centro de Selección y Reproducción Ovina en Conkal, localizado al noreste del estado de Yucatán, México (21°02', 89°29') con medio ambiente tropical y una temperatura promedio anual de 26° C.

Noventa y tres ovejas adultas, multíparas, no lactantes de la raza Pelibuey fueron usadas como donadoras de embriones (n=22, peso vivo de 40 ± 1.8 kg) y receptoras de embriones (n=71, peso vivo de 38 ± 1.8 kg) ambas con una escala de 3 de condición corporal. Los animales fueron alimentados con una preparación de comida comercial conteniendo 15% de proteína cruda (Nutrimyn) adicionada con Yea-Sacc (levadura *Saccharomyces cerevisiae cepa 1026*; medio de cultivo compuesto de maíz, malta y melaza de caña de azúcar; Alltech) en una dosis de 5gr/anim/día y heno de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) ad libitum, en el caso de las receptoras,

únicamente se les proporcionó 1kg de alimento concentrado comercial con 15% de proteína cruda (Nutrimyn) y pastoreo durante 6 horas en las mañanas de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) (González-Parra et al., 2007).

El estro fue sincronizado usando esponjas vaginales impregnadas con 40 mg de Acetato de Fluorogestona (FGA, Chronogest®, Intervet, México) durante 12 días, al retiro de las esponjas se administró a las receptoras 200 IU de Gonadotropina Coriónica equina (eCG; Folligon®, Intervet, México). El tratamiento superovulatorio en las ovejas donantes consistió en la aplicación de 1.5 mL de un análogo de Prostaglandina (PGF_{2α}; Iliren®, Intervet, México) a los 10 días de la inserción de la esponja. Así mismo, se aplicó 200 mg (NIH) de Hormona Folículo Estimulante porcina (FSHp; Folltropin-V®, Bioniche, México) inyectado cada 12 horas en 8 dosis decrecientes (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10, 10 mg) durante los últimos 3 días del tratamiento de progesterona (días 10-12). A las 36 horas del retiro de las esponjas, las ovejas donadoras fueron inyectadas con 100 µg de Hormona liberadora de las Gonadotropinas (GnRH; Fertagyl®, Intervet, México) e inseminadas intaruterinamente con semen fresco (100x10⁶ espermatozoides) a las 56 horas del retiro de las esponjas.

La recuperación de embriones se realizó a los 7 días del retiro de las esponjas usando una técnica semi-quirúrgica (Ramón et al., 1991) sólo en aquellas ovejas con más de 3 cuerpos lúteos y la viabilidad de los embriones se clasificó mediante criterios morfológicos (Winteberger-Torres y Sevelec, 1987).

Los embriones en medio de lavado (Dulbecco PBS con 4% BSA), fueron vitrificados en un protocolo de 3 pasos (Mermillod et al., 1997) como sigue: 10% de Glicerol por 2 minutos, 10% de Glicerol y 20% de Etilenglicol por 3 min, y 25% de Glicerol y 25% de Etilenglicol por 5 minutos, los embriones fueron puestos en pajuelas de 0.25 mL (IMV, Francia) con 20-30 µL de solución vitrificante entre burbujas de aire y 2 segmentos adyacentes de 30 µL de solución vitrificante, fueron selladas con calor y puestas en vapores de nitrógeno líquido (-120°C) por 20 segundos y sumergidas dentro del nitrógeno líquido. Para la desvitrificación fueron mantenidas 20 segundos en aire y el contenido expelido y embriones fueron incubados en PBS a temperatura ambiente por 5 min y después en PBS Dulbecco a 39°C hasta la transferencia.

Los embriones viables fueron transferidos a receptoras sedadas después del control endoscópico de ovulación, en el cuerno uterino ipsilateral del ovario con un cuerpo lúteo (Ramón et al., 1991).

La fertilidad se midió al parto.

Se utilizó un diseño completamente al azar para evaluar 2 tratamientos (fresco o embriones vitrificados) y fue usado el siguiente modelo: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$, donde, μ =media general, α_i = efecto del tipo de embrión, ε_{ij} = error observado.

RESULTADOS

La tasa de ovulación media de las ovejas donantes resultó de un 11.0, con una tasa de recuperación del 58%, de los cuales, el 64.5% resultaron como embriones viables. De un total de 91 embriones viables, 44 fueron transferidos en fresco y 41 vitrificados.

La respuesta superovulatoria en las ovejas donantes de embriones fue el siguiente: Ovejas superovuladas: 35, Ovejas lavadas: 22, Cuerpos lúteos: 327, Total de cuerpos lúteos: 243, Embriones recuperados: 141, Embriones viables: 91, Embriones viables por oveja tratada: 2.6 y Embriones viables por oveja lavada: 4.1.

Cuando se contrastó la fertilidad a los 17 días posttransferencia se observó una tendencia ($P < 0.1$) a favor de los embriones frescos vs. vitrificados, resultando esta de un 47.2% vs. 37%, respectivamente.

La siguiente tabla muestra la fertilidad de las ovejas receptoras de embriones vitrificados y embriones frescos en clima tropical.

Fertilidad en Ovejas Receptoras de Embriones Vitrificados vs. Embriones Frescos

	Total	Embriones Transferidos	Fertilidad
Embriones Vitrificados	41	27	10 (37%)
Embriones Frescos	44	44	21 (47%)*

$P < 0.1$

DISCUSIÓN

El protocolo de vitrificación usado en este estudio a demostrado su capacidad de generar embriones con alta viabilidad, sin embargo, nuevas estrategias que aumentan la viabilidad embrionaria desarrolladas en caprinos como son la transferencia embrionaria directa y la adición de sucrosa al medio de vitrificación prometen mejorar aun más los resultados con este protocolo. Este trabajo presenta el primer reporte de vitrificación de ovinos de pelo bajo condiciones tropicales. La técnica de vitrificación promete remediar los problemas que genera la producción de embriones *in vivo* por ovulación múltiple y transferencia embrionaria y/o *in vitro*, como son la cantidad, sincronización y el manejo de receptoras de embriones entre otras que no han permitido extender el uso de estas biotecnologías reproductivas a los ovinos y menos aún en Latinoamérica. La vitrificación no requiere el

costoso equipo y manejo especializado de la congelación tradicional, permitiendo llevar a cabo la criopreservación de embriones en condiciones de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, G.E., Fitzhugh, H.A. 1983. Hair sheep: A general description. In: Fitzhugh, H.A., Bradford, G.E. (Ed.) Hair Sheep of Western Africa and the Americas: A Genetic Resource for the Tropics. Westview Press, Boulder, CO.
- González-Parra E., Navarrete-Sierra L., Cruz-Tamayo A., Aguiar-Loría A., Erosa-Denis S., Bolio-Oses R., Domínguez-Rebolledo A., Paredes-Monsreal L., Sanguinés-García R., Ramón-Ugalde J. 2007. Influencia de levaduras y minerales sobre la producción de ovocitos en ovejas púberes estimuladas ovaricamente. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 17,77-82.
- Gonzalez-Reyna, A., Valencia, J., Foote, W., Murphy, B.D., 1991. Hair sheep in Mexico: reproduction in the pelibuey sheep. *Anim. Breed. Abstr.*, 59, 509-524.
- Mermillod P., Traldi A.S., Guerin Y., Poulin N., Massip A.P., Cognie Y. 1997. Successful vitrification of in vitro produced ovine embryos. 13th Scientific Meeting AETE, Lyon.
- Ramón J.P., Fernández-Arias A.A., Alabart J.L., Cocero J.M., Echegoyen E. 1991. La técnica de transferencia de embriones en el ganado ovino. *ITEA. Extra* 11, 61-63
- Wildeus, S. 1997. Hair Sheep Genetic Resources and Their Contribution to Diversified Small Ruminant Production in the United States. *J. Anim. Sci.* 75, 630-640
- Winterberger-Torres S., Sevellec C. 1987. Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. INRA, Paris

Volver a: [Inseminación artificial ovinos](#)