Uso de un nuevo dispositivo intravaginal para sincronización, superovulación, colecta y transferencia de embriones en ovejas.

Suarez, G.[1], Panarace, M.[1], Young, S.[1], Cledou, G.[2], Massara N.[3], Cané, L.[1] y Medina, M.[1]

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DILP: **Cronipres CO®**, Biogénesis Bagó) para ovinos y caprinos de reciente aparición en el mercado nacional, en un programa de superovulación, colecta y transferencia de embriones. Un total de 100 ovejas adultas de la raza Corriedale fueron aleatoriamente divididas en 4 grupos según tratamiento recibido. Las donantes del Grupo 1 (n=10) fueron sincronizadas con el dispositivo colocado por 13 días y las del Grupo 2 (n=10) con un protocolo corto de 6 días de duración, ambos grupos con DILP de primer uso. Las receptoras fueron sincronizadas por 13 días ya sea con dispositivo de primer uso (Grupo 3, n=36) o de segundo uso (Grupo 4, n=44). La producción de embriones congelables por oveja donante fue de 4,7 y no hubo diferencias significativas entre los grupos de donantes (P>0.05). Los embriones obtenidos fueron congelados siguiendo un protocolo estándar que utiliza Ethilenglicol 1.5M como crioprotector y posteriormente descongelados y transferidos a tiempo fijo en las receptoras sincronizadas. El diagnóstico de gestación fue realizado 24 días post transferencia de los embriones. Se obtuvo un porcentaje de preñez general del 63%, valor que fue superior en receptoras sincronizadas con dispositivos de primer uso respecto de las que fueron tratadas con dispositivo de segundo uso (71% versus 53%), no obstante dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (P>0.05). Se concluye que los resultados obtenidos luego del uso de **Cronipres CO®** en un protocolo de superovulación, colecta y transferencia de embriones congelados ovinos fueron similares a los descriptos cuando otros dispositivos ya existentes en el mercado fueron utilizados (esponjas o DILP importados).

Palabras clave: dispositivo intravaginal, superovulación, colecta, transferencia de embriones, ovino.

Summary

The objective of the present study was to evaluate the use of a progesterone intravaginal releasing device (PRID: **Cronipres CO®**, Biogénesis Bagó) for sheep and goats (of recently introduction in the national market), in a superovulation, flushing and embryo transfer program. A total of 100 adult Corriedale ewes were used for this study and randomly divided in four groups according to the treatment received. Donors from Group 1 (n=10) were synchronized with **Cronipres CO®** for 13 days and donors from Group 2 (n=10) using a short protocol of CRONIPRES CO® for 6 days. Both groups were treated with PRID of first use. Recipients were synchronized using a PRID of first use for 13 days (Group 3, n=36) or second use (Group 4, n=44). Freezable embryo production per ewe was 4.7 and no significant difference were observed between donor Groups (P>0.05). The embryos were frozen using a standard protocol that included Ethilenglicol 1.5M as cryoprotectant and subsequently thawed and transferred at fixed time to synchronized recipients. Diagnosis of gestation was performed 24 days after embryo transfer. A general 63% of pregnancy rate was achieved, this value was higher in recipients synchronized with PRID of first use in comparison to those that were treated with PRID of second use (71% versus 53%), however this difference was not significant (P>0.05). To conclude, the results obtained after the use of **Cronipres CO®** for superovulation, flushing and embryo transfer of sheep frozen embryos were similar to those reported when other type of intravaginal devices were used (sponges or imported PRID).

Key words: intravaginal devices, superovulation, collection, embryo transfer, sheep.

(1) Goyaike S.A.A.C.I.y F., Centro de Biotecnología Animal, Ea. San Joaquín, Carmen de Areco, Buenos Aires, Argentina. Email: gsuarez@goyaike.com.ar
(2) Area de Reproducción. Biogénesis Bagó S.A. Buenos Aires. Argentina.
(3) Director Técnico de Elastec SRL. Buenos Aires. Argentina.

Introducción

Usualmente los programas de colecta y transferencia de embriones en ovinos involucran el uso de algún agente intravaginal liberador de progesterona (DILP) que permita lograr la sincronización necesaria para una efectiva estimulación hormonal de las donantes y a su vez poder sincronizar los celos de éstas con el de las receptoras, de manera que la transferencia de los embriones se realice a un útero preparado hormonal y funcionalmente acorde a la edad del embrión. En la mayoría de los casos en nuestro país, dicha sincronización se logra utilizando esponjas intravaginales conteniendo progesterona, sin embargo, existen en el mercado dispositivos intravaginales similares a los que comúnmente se utilizan en bovinos [1-9], aunque hasta la fecha dichos dispositivos para ovinos deben ser importados. El interés demostrado por el uso creciente de estos dispositivos está basado en que provocan una menor reacción del tejido vaginal que las esponjas y por su fácil manejo, colocación y remoción. También se presenta la posibilidad de su reutilización, sin pérdida de eficacia, con lo que se logra una reducción consecuente en los costos de aplicación en los programas de inseminación y colecta de embriones.El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de un nuevo dispositivo intravaginal comercial nacional (**Cronipres CO®**, Biogénesis Bagó, Argentina) en donantes y receptoras de un programa de colecta, congelación y transferencia de embriones. A su vez se compararon los resultados obtenidos utilizando el protocolo clásico de sincronización con colocación del dispositivo por 13 días versus el protocolo corto de permanencia por 6 días. Algunos trabajos demostraron que el uso del progestágeno por 6-8 días permite alcanzar resultados similares en producción de embriones a aquellos obtenidos en los protocolos largos [4,10]. Esto mejoraría el manejo tanto de donantes como receptoras, y también acortaría en aproximadamente 8-10 días el re-uso de las receptoras, conocido cuello de botella económico en los programas de colecta y transferencia de embriones a escala debido al costo adicional de mantenimiento de vientres vacíos a la espera de un embrión. Finalmente se evalúan los resultados de preñez en receptoras sincronizadas con dispositivos de primer uso versus aquellas en la que se utilizó un dispositivo de segundo uso.

Materiales y métodos

El presente estudio fue realizado en el Centro de Biotecnología de GOYAIKE, ubicado en la Ea. San Joaquín, de la localidad de Carmen de Areco, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.
Se utilizaron 85 ovejas adultas vacías, de la raza Corriedale, con una condición corporal estimada de 2,5 a 3 (escala 1 a 5) mantenidas bajo condiciones extensivas de pastoreo en campo natural mejorado e implementándose un flushing alimenticio en pasturas consociadas 20 días previos al inicio del trabajo.

Los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos:

1)Donantes (n=20): Subdivididas en 2 subgrupos:
Grupo 1 (n=10): Se les aplicó un DILP de primer uso durante 13 días, con cambio por otro dispositivo nuevo al día 7 (día 0= día de colocación).
Grupo 2 (n=10): Se les aplicó un DILP de primer uso durante 6 días.

2)Receptoras (n=65): Subdivididas en 2 subgrupos:
Grupo 3 (n=36): Se les aplicó un DILP de primer uso durante 12 días.
Grupo 4 (n=44): Se les aplicó un DILP de segundo uso durante 12 días.

1) Ovejas Donantes:

a. Superovulación: Todas las donantes recibieron al día 0, la inserción de un DILP (**Cronipres CO®**, Biogénesis Bagó, Argentina). Este dispositivo consiste en un percha inerte con 4 camisas de 40 mg de progesterona natural cada una, montadas en los brazos laterales del mismo (ver Foto1), totalizando entonces 160 mg de progesterona natural total por dispositivo. Para ambos Grupos 1 y 2, la estimulación hormonal fue realizada con la aplicación en dosis decrecientes de 8 inyecciones de hormona FSHp/LHp (Pluset®, Calier, España) totalizando 500 UI FSHp/LHp por oveja. Al momento del retiro del dispositivo se aplicó eCG 300UI IM (Novormon5000®, Syntex, Argentina). En el caso del Grupo 1 al momento del recambio de dispositivo, las ovejas recibieron una inyección IM de 37,5 ug de prostaglandina F2α (D-Cloprostenol, Bioprost®, Biotay, Argentina). Todos los tratamientos se realizaron a la misma hora, 08:00 am y 18:00 pm (Gráficos 1 y 2).

b. Inseminación: Las donantes fueron inseminadas con semen fresco diluido del mismo carnero, la inseminación se realizó a tiempo fijo (IATF) a las 48 y 60 hs post-retiro del dispositivo por vía laparoscópica [11] utilizando un total de 100 millones de espermatozoides por cada dosis inseminante.

c. Colecta de embriones: Seis días post-inseminación se realizó la colecta de todas las donantes. Para ello, las mismas fueron sedadas utilizando de 20 a 30 mg de xilacina IM (Rompún®, Bayer, Argentina) y colocadas en camillas especialmente diseñadas para maniobras de laparoscopía en ovinos. Se utilizó la técnica quirúrgica con incisión abdominal por línea media con exteriorización de ambos cuernos uterinos y fijación de sonda Foley número 10 por medio de insuflación de balón en la base del cuerno. El flujo del líquido de lavado (PBS con agregado de suero fetal bovino al 1%) fue dirigido desde la unión utero-tubárica hacia el cuerno uterino correspondiente con salida directa a una placa de Petri la que posteriormente sirvió para la búsqueda de los embriones. Cada cuerno fue lavado con un total de 40 ml de medio de lavado.

d. Congelación de embriones: Los embriones fueron congelados siguiendo las normas IETS (Internacional Embryo Transfer Society) para su manipulación, clasificación y lavado. Se congelaron sólo los embriones calidad 1 y calidad 2. Los embriones fueron congelados de a 2 o 3 por pajuela, utilizando como crioprotector Ethilenglicol 1.5M (Ethilenglicol + sucrose®, Vigro, Bioniche, USA). Previamente se realizó un período de equilibración en Ethilenglicol durante 10 minutos y luego las pajuelas fueron puestas en el pozo de frío de la congeladora –6.0° C (Freeze Control CL863®,Cryologic Pty Ltd, Australia). Al minuto se realizó la inducción de cristalización (seeding) y 7 minutos después comenzó el descenso de la curva de frío a razón de –0.5° C/minuto hasta llegar a –35.0° C. Posteriormente las pajuelas conteniendo los embriones fueron colocadas directamente a nitrógeno líquido -196° C y almacenadas en termos hasta su descongelación.

2) Ovejas Receptoras:

a. Sincronización: Para ambos grupos de receptoras se utilizó el mismo protocolo de sincronización, independientemente si se trataba de un dispositivo nuevo o reutilizado. Al momento del retiro del dispositivo todas las receptoras recibieron una aplicación IM de 300UI de eCG (Novormon5000®, Syntex, Argentina). El protocolo se resume en el Gráfico 3.

b. Descongelación de los embriones: Los embriones fueron descongelados manteniendo la pajuela durante 10 segundos al aire a temperatura ambiente y luego 30 segundos en baño maría a 35.0° C. La pajuela fue luego secada y los embriones bajados a medio Holding (Holding®, Vigro, Bioniche, USA) y lavados sucesivamente en 8 gotas del mismo medio hasta finalmente cargarlos individualmente para su transferencia.

c. Transferencia de embriones: Las transferencias se realizaron a tiempo fijo (sin detección de celos) 8 días posteriores al retiro del dispositivo intravaginal. Para ello las receptoras fueron sedadas utilizando 20 mg de xilacina (Rompún®, Bayer, Argentina). La transferencia se realizó por la técnica combinada laparoscopía-cirugía, la cual consiste en la identificación laparoscópica del ovario conteniendo el cuerpo lúteo de óptima calidad y la realización de una pequeña incisión de 3-4 cm que permite la exteriorización del cuero uterino de interés. Todas las receptoras recibieron un sólo embrión, el cual fue depositado en el cuerpo ipsilateral al ovario conteniendo el cuerpo lúteo. Posterior a la transferencia se administró 50 mg de flunixin meglumine IM (Creapaz®, Rosenbuch, Argentina) a cada receptora.

d. Diagnóstico de gestación: A los 24 días post-transferencia se realizó diagnóstico de gestación por ecografía transrectal utilizando una sonda de 7.5 MHz y un equipo Aloka SSD 500 (Tokyo, Japón).

Foto 1: Cronipres CO®. Dispositivo intravaginal con progesterona natural para uso en ovinos y caprinos.

Cada camisa contiene:

Progesterona..... 40,0 mg.
Silicona Inerte..... 1,20 g.

Gráfico 1: Protocolo de superovulación en donantes sincronizadas con dispositivo por 13 días

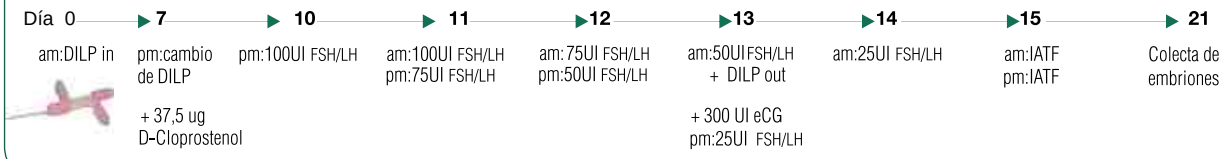

Gráfico 2: Protocolo de superovulación en donantes sincronizadas con dispositivo por 6 días

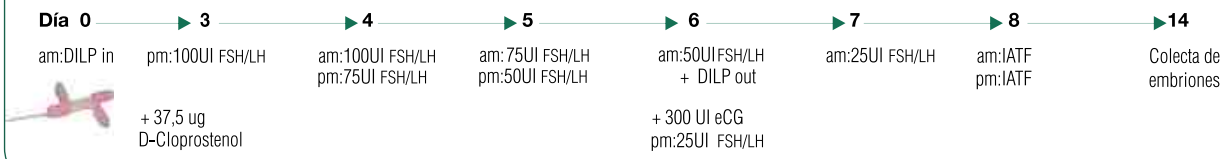

Gráfico 3: Protocolo de sincronización de receptoras con dispositivo de primer o segundo uso

Análisis estadístico: se evaluaron el número de embriones colectados por donante por grupo de tratamiento, el porcentaje de utilización de receptoras de cada grupo y el porcentaje de preñez general y por grupo de receptoras según protocolo de sincronización utilizado. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el test de Chi Cuadrado (Infostat, Córdoba, Argentina) y las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de P fue menor a 0,05 ($P<0.05$).

Resultados

Respecto del uso del dispositivo, se observó una pérdida del 1% (1/84) y la ruptura de 1 solo dispositivo (1%).

1. Colectas de embriones

El promedio general de embriones por donante colectada fue de 4,7. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Producción de embriones según protocolo de sincronización utilizado en donantes

DONANTE/GRUPO	n	HT	SF	DEG	EMB	EMB/DONANTE TRATADA	DONANTES SIN RESPUESTA	EMB/DONANTE COLECTADA
1	10	65[a]	17[a]	14[a]	40[a]	4,0[a]	1	4,4[a]
2	10	60[a]	15[a]	5[a]	40[a]	4,0[a]	2	5,0[a]
TOTAL	20	125	32	19	80	4,0	3	4,7

Diferentes superíndices entre filas indican diferencia estadística $P<0.05$.

Referencias: HT: Huevos totales/ SF: Ovocitos sin fertilizar/ DEG: embriones degenerados/ EMB: embriones viables

2. Transferencias de embriones congelados

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados de las transferencias de embriones congelados según tratamiento.

RECEPTORA/GRUPO	n	Receptoras transferidas /Sincronizadas (%)	Receptoras preñadas /transferidas (%)
3	36	17/36 (47)[a]	12 (71)[a]
4	44	15/44 (34)[a]	8 (53)[a]
TOTAL	80	32/80 (40)	20/32 (63)

Diferentes superíndices entre filas indican diferencia estadística P<0.05.

Discusión y conclusiones

En los programas de transferencia embrionaria, la producción de un gran número de embriones viables para la subsiguiente transferencia está determinado no solo por la respuesta a las gonadotropinas exógenas, sino también a la proporción de embriones o huevos que son recuperados, la proporción de huevos fertilizados y al normal desarrollo subsiguiente de los mismos. En los trabajos de Ritar et al.(1990) se sugiere que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en protocolos que involucran el uso de esponjas y los que utilizan CIDR. Por lo tanto, generalmente los protocolos utilizados en ambos casos son idénticos, misma observación fue considerada en el protocolo utilizado en el presente trabajo. En cuanto a parámetros de eficiencia, el índice de recuperación de huevos fue de 71%, siendo menor al publicado por Torrés y col. [12] y mayor al citado por Yamada y col. [13]. Este porcentaje varía aproximadamente entre el 30% y 60% (Jabbour and Evans, 1991; Rexroad and Powell, 1991; Ryan et al., 1991; Evans et al., 1994). El porcentaje de fertilización 74% y el número de embriones viables por colecta (4,7 emb/oveja) se encuentran dentro del rango esperado aunque fueron superiores a los publicados por Thompson et al. [14] y por Scudamore et al. [15].

Si bien la respuesta a la superovulación fue variable entre las ovejas, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo sincronizado con dispositivo intravaginal por 13 días versus el grupo en el cual el **Cronipres CO®** permaneció durante 6 días y ambos resultados fueron similares a los obtenidos en otros trabajos [16]. Se observó una tendencia (no significativa) a aumentar el número de embriones degenerados al utilizar el protocolo largo (26% vs. 11%) y consecuentemente el porcentaje de embriones transferibles fue menor (74% vs. 89%) al igual que el porcentaje de embriones congelables (46% vs. 75%). Esto puede estar asociado a una menor fertilidad promovida por la ovulación de folículos dominantes persistentes [10]. El porcentaje de preñez de 63% obtenido con el uso de **Cronipres CO®** luego de la transferencia de los embriones congelados fue mayor a los citados por Ishida et al. (1999) [17], Somgsasen y col. (1995) [18] en los que se utilizó esponja intravaginal y el mismo crioprotector Ethilenglincol 1.5M. Si bien no hubo diferencia estadística entre los porcentajes de preñez de ambos grupos de receptoras, los resultados obtenidos (71% vs. 53%) muestran una tendencia favorable a la sincronización de receptoras con dispositivos de primer uso, esta diferencia puede ser en parte atribuida a que las concentraciones bajas de progesterona determinan una prolongación en la vida del folículo dominante de la oveja (Viñoles y Rubianes, 1999). Por tanto, el folículo preovulatorio desarrollado tras la reutilización de DILP sería un folículo envejecido, lo que habría determinado la disminución de la fertilidad [19-20]. El índice de retención del dispositivo fue óptimo (98%), superior a lo descripto por Herve y col. y similar a lo observado por Alifakiotis y col. (1982) y por Ainsworth y Shrestha (1983), demostrando que el diseño y rigidez del dispositivo propuestos se adaptaron muy bien a la especie ovina. Estas pérdidas fueron menores en comparación con las observadas cuando se usaron esponjas intravaginales (Tristchler y col 1991).

Se concluye que los resultados obtenidos mediante el uso del nuevo dispositivo intravaginal ovino (**Cronipres CO®**, Biogénesis Bagó, Argentina) fueron similares a los reportados con otros dispositivos de origen extranjero, avalando así su implementación en programas de superovulación, colecta y transferencia de embriones en ovinos.

Referencias

[1] Welch RAS, Andrews WD, Barnes DR, Bremner K, Harvey TG. CIDR dispensers for oestrus and ovulation control in sheep. *Proc 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & AI* 1984; II: no. 354.

[2] Hamra AH, Massri YG, Marcek JM, Wheaton JE. Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-controlled internal drug release dispensers, implants and sponges. *Anim. Reprod. Sci.* 1986;11:187–194.

[3] Greyling JPC, Brink WCJ. Synchronization of oestrus in sheep: the use of controlled internal drug release (CIDR) dispensers. *S. Afr. J. Anim. Reprod.* 1987; 17: 128–132.

[4] Wheaton JE, Carlon KM, Windels HF, Johnston LJ. CIDR: a new progesterone-releasing intravaginal device for induction of oestrus and cyclic control in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 1993;33:127–141.

[5] Rhodes L, Nathanielsz PW. Comparison of a controlled internal drug release device containing progesterone with intravaginal medroxyprogesterone sponges for estrus synchronization in ewes. *Theriogenology* 1988;30:831–836.

[6] Smith JF, Parr J, Mortimer BJ. Comparison of two intravaginal devices on the reproductive performance of Coopworth ewes throughout the year. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 1989;21: no. 97.

[7] Maxwell WMC, Barnes DR. Induction of oestrus in ewes using a controlled internal drug release device and PMSG. *J. Agric. Sci. Camb.* 1986;106:201–203.

[8] Wilson HR, Maxwell WMC. Use of CIDRs and progestogen sponges in sheep AI programs. Prod. *Aust. Assoc. Anim. Artif. Breed* 1989;2:13 (Abstr).

[9] Fukui Y, Ishikawa D, Ishida N, Okada M, Itagaki R, Ogiso T. Comparison of fertility of estrous synchronized ewes with four different intravaginal devices during the breeding season. *J. Reprod. Dev.* 1999;45:337-343.

[10] Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 2001;55 no.4:993-1004.

[11] McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Henderson G. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology* 1985;24:519-535.

[12] Torrés S, Cognié Y, Colas G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-p. *Theriogenology* . 1987;27: 407-419.

[13] Yamada A, Kawana M, Tamura Y, Miyamoto A, Fukui Y. Effect of single or multiple injection of follicle stimulating hormone combined with pregnant mare serum gonadotropin on superovulatory response, and normal and freezable embryos in ewes. *J. Reprod. Dev.* 1996;42 no.2:81-87.

[14] Thompson JGE, Simpson AC, James RW, Tervit HR. The application of progesterone-containig CIDR™ devices to superovulated ewes. *Theriogenology* 1990;33(6):1297-1304.

[15] Scudamore CL, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS. The effect of method of oestrus synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. *Anim.Reprod. Sci.* 1993;34:127-133.

[16] Dixon AB, Knights M, Pate JL, Lewis PE, Inskeep EK. Reproductive performance of ewes after 5-day treatment with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of prostaglandin $F_2\alpha$. *Reprod. Domest. Anim.* 2006; 41(2):142-148.

[17] Ishida N, Jung Y, Itagaki R, Okada M, Ogiso T, Ishikawa D, Fukui Y. Non-surgical transfer of fresh or frozen-thawed ovine embryos by laparoscopy. J. Reprod. Dev. 1999; 45:289-293.

[18] Somgsasen N, Buckrell BC, Plante C, Leibo SP. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 1995;32:78-91.

[19] Ungerfeld R, Rubianes E. Reutilización de CIDRs en tratamientos cortos para inducción de celo durante el anestro estacional de la oveja. *III Simposio Internacional de Reproducción Animal.* 1999.

[20] Rubianes E, Ungerfeld R, De Castro T. Inducción y sincronización de celo en ovejas y cabras. *III Simposio Internacional de Reproducción Animal.* 1999.