



## PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES OVINOS: implicaciones de I+D

**FERNANDO FORCADA, ADRIANA CASAO Y JOSÉ ALFONSO ABECIA** ▶ Universidad de Zaragoza,  
c/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza forcada@unizar.es

TRABAJO PRESENTADO EN EL SEGUNDO CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS VETERINARIAS, PUEBLA, MÉXICO

### RESUMEN

LA PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES OVINOS TIENE UN CONJUNTO DE APLICACIONES Y VENTAJAS QUE ACONSEJAN SU DESARROLLO Y LA BÚSQUEDA DE NUEVAS POSIBILIDADES. LAS MAYORES LIMITACIONES DE LA TÉCNICA EN EL GANADO OVINO SE REFIEREN A LA NECESIDAD DE UTILIZAR LA VÍA QUIRÚRGICA PARA LA RECUPERACIÓN Y A LA VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA DE LOS TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACIÓN, POR OTRA PARTE MUY EXIGENTES EN MANO DE OBRA. EN LA PRESENTE REVISIÓN SE PRETENDE PRESENTAR LA SITUACIÓN ACTUAL DE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS Y LAS POSIBILIDADES FUTURAS A LA HORA DE MEJORAR SU EFICIENCIA Y DE ABARATAR COSTES, ESPECIALMENTE EN RELACIÓN A LA MANO DE OBRA NECESARIA Y PARA RAZAS UBICADAS EN LATITUDES MEDIAS Y DE MODERADA TASA OVULATORIA.

### INTRODUCCIÓN

LA PRODUCCIÓN *IN VIVO* de embriones ovinos supone la recuperación del embrión directamente de la hembra en el estadio adecuado. A la hora de obtener embriones de hembras valiosas, es un sistema más eficaz que las técnicas *in vitro*, que requieren la recuperación de oocitos desde los folículos y el desarrollo posterior de las técnicas de maduración y fecundación *in vitro* seguidas del cultivo hasta el estadio deseado. La producción *in vivo* de embriones va asociada siempre a superovulación, intentando obtener una elevada tasa ovu-

latoria para maximizar el número de embriones recuperados, que posteriormente serán transferidos directamente o tras conservación previa. Todas estas técnicas fueron agrupadas bajo el término "MOET" ("multiple ovulation and embryo transfer") por Nicholas y Smith en 1983.

### OBJETIVOS E IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS MOET

■ **Mejora genética.** Las técnicas MOET permiten mejorar la tasa reproductiva de las hembras aumentando el número

de descendientes de las hembras de mayor valor genético. También es posible acortar el intervalo generacional cuando las donantes son hembras jóvenes.

■ **Introducción y difusión rápida de razas de interés.** Los costes de transporte, requerimientos de cuarentena y los potenciales riesgos sanitarios de exposición son muy inferiores en embriones que para animales vivos.

■ **Conservación indefinida de razas o individuos, manteniendo por tanto la diversidad genética.** Dado que los embriones se pueden almacenar casi indefinida-

mente en N líquido, el establecimiento y la regulación de bancos genéticos está adquiriendo un especial interés en un buen número de países.

■ **Bioseguridad.** Los aspectos relacionados con la biología del embrión junto con los protocolos específicos de su manejo, procesado y almacenamiento, reducen los riesgos de transmisión de enfermedades en el ámbito nacional o internacional.

■ **Apoyo a otras técnicas reproductivas** en las que interviene la manipulación de embriones (splitting, sexaje, clonación,...) y a la investigación en fisiología de la reproducción.

En cuanto a las **limitaciones de las técnicas MOET**, en particular en ganado ovino, destacan la necesidad de la vía quirúrgica para la recuperación de embriones, lo que limita el número de procedimientos a desarrollar en una oveja, la variabilidad de los resultados de la superovulación y la influencia de la estación en los resultados, sobre todo en las razas más estacionales. En conjunto, se trata de una técnica con una eficiencia media-baja, pues el total de embriones viables obtenidos por oveja superovulada no suele superar el 50% del valor de la tasa de ovulación.

### AUMENTO DEL POTENCIAL OVULATORIO

Se utilizan gonadotrofinas para aumentar el número de folículos que ovulan, existiendo distintas posibilidades:

■ **eCG (Gonadotrofina Coriónica Equina).** Descubierta por Cole y Hart en 1930, ha sido la primera hormona utilizada en programas de superovulación ovina. Presenta actividad FSH y LH, predominando la primera, con lo que actúa promoviendo el desarrollo foli-

cular y la secreción y la multiplicación de las células de la granulosa así como la liberación endógena de LH (Pelletier y Thimonier, 1975). Una característica particular de la eCG es su elevado contenido en ácido siálico, lo que retrasa su metabolización y aumenta considerablemente su periodo de acción hasta casi las 24 horas, facilitando su aplicación en una única dosis de 1000-2000 UI aplicada entre 24-48 horas antes del fin del tratamiento de sincronización.

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.

■ **FSH (Hormona Folículo Estimulante).** Como alternativa al uso de la eCG, el uso de FSH para inducir superovulación se asocia con una menor variabilidad de la tasa ovulatoria y con una menor cantidad de folículos anovulatorios sin alterar de manera significativa la esteroidogénesis. Las fuentes comerciales de FSH disponibles en el mercado son extractos de hipófisis de diferentes especies, principalmente la ovina y la porcina. Así, las preparaciones comerciales contienen cantidades altas de FSH y variables de LH dependiendo del producto, siendo al parecer más purificados (menos contenido de LH) los extractos de FSH ovina. Una mayor purificación supone un aumento de la respuesta ovulatoria (Torres *et al.*, 1987).

Como la FSH presenta una vida media

corta, se requiere una administración frecuente de la misma al objeto de mantener concentraciones plasmáticas suficientes para lograr una respuesta ovárica adecuada, de manera que la inducción a la superovulación con una única inyección de FSH no ha ofrecido resultados satisfactorios. Por ello, se utilizan protocolos de 4 a 8 inyecciones cada 12 horas. Tradicionalmente, se ha considerado que un protocolo de dosis constantes era más adecuado para preparados con un menor contenido de LH. Sin embargo, recientemente González-Bulnes *et al.* (2004) han mostrado unos mejores resultados de tasa de ovulación y de embriones viables con protocolos decrecientes de FSH ovina en relación a los constantes, señalando que los primeros pueden estar más próximos a los cambios de la secreción hipofisaria de FSH que tienen lugar en la fase folicular del ciclo sexual natural. En conjunto y para razas de reducido potencial ovulatorio, se puede esperar una tasa de ovulación entre 9 y 14 cuerpos lúteos tras la aplicación de los citados protocolos.

### FECUNDACIÓN Y RECUPERACIÓN DE EMBRIONES

El momento de inicio del celo varía con el tratamiento de superovulación, aunque se produce más temprano que con el clásico tratamiento de inducción y sincronización del celo con esponja y 400-500 UI de eCG. Los tratamientos simplificados FSH+eCG son los que inducen una salida en celo más temprana, entre 20 y 26 h tras la retirada de la esponja, seguidos de los protocolos de varias inyecciones con FSH porcina (22-28 horas) y de aquellos que suponen varias inyecciones de FSH ovina (30-36 horas). Del mismo modo, el momento de la ovu-



Cigoto. Se aprecian los dos pronúcleos y los dos corpúsculos polares.



Embrión de dos células.



Embrión en estadio de mórula.

lación se produce a las 44-54 horas tras la retirada de la esponja con protocolos simplificados FSH+eCG, a las 54-60 horas con protocolos de FSH porcina y a las 58-64 horas con tratamientos con FSH ovina. Hay que tener en cuenta que el momento de la ovulación está más sincronizado entre individuos cuando el tratamiento se realiza en la estación reproductiva que cuando tiene lugar en el periodo de anestro. Las diferencias entre tratamientos son importantes tanto a la hora de considerar el momento más oportuno para la inseminación intrauterina como a la hora de precisar la edad de los embriones que vamos a recuperar con posterioridad.

Por lo que a la tasa de fecundación se refiere, cuando se utiliza monta natural se puede obtener una tasa de fecundación próxima al 90% con protocolos de FSH y ligeramente inferior con tratamientos simplificados FSH+eCG. No obstante, y sobre todo con vistas a la mejora genética, se hace necesario el uso de la inseminación artificial. Con inseminación cervical con semen fresco es posible conseguir unos resultados aceptables, próximos al 70%, aunque con una gran variación individual. No obstante, el uso de semen congelado por esta vía se desaconseja totalmente, pues la fertilización se reduce hasta unos niveles del 10%. Por ello, cuando se asocia superovulación con inseminación artificial, se recomienda encarecidamente el uso de la inseminación intrauterina por laparoscopia, que permite garantizar unas buenas tasas de fecundación en ovejas superovuladas tanto con

semen fresco (80-90%) como con semen congelado (70%).

En relación a la recuperación de embriones, hay que señalar que las características anatómicas del cuello uterino de la especie ovina hacen imposible el lavado vía vaginal, con lo que hay que recurrir a laparotomía. El lavado puede realizarse del oviducto o del útero. En el primer caso, los embriones permanecen en él los tres primeros días tras el inicio del celo, hasta el estadio de 8 células. El lavado es relativamente simple y la tasa de recuperación elevada, del 90 a 100% en relación a la tasa de ovulación, dado que el volumen de líquido a introducir

es reducido. El lavado de útero se realiza cuando se pretende recuperar embriones en un estadio de desarrollo posterior al de 16 células (mórula y blastocisto). El porcentaje de recuperación es menor que en el caso anterior, del 70-80%.

A la hora de valorar la calidad de los embriones recuperados, se debe evaluar en primer lugar la sincronía entre la edad del embrión y el estadio de desarrollo que presenta al ser obtenido. En la especie ovina se ha publicado dicha sincronía para las distintas fases de desarrollo preimplantacional (Wintenberger-Torres y Sevellec, 1987; Figura 1), de manera que estadios precoces al esperado indican un desarrollo inadecuado y por tanto una menor calidad embrionaria. Así y por ejemplo, si se transfieren embriones en una fase de desarrollo 24-48 horas retrasada con respecto a la esperada en relación al momento de su recuperación, las tasas de gestación son muy reducidas en relación a las logradas con embriones en fase de desarrollo sincronizada con su edad (Moore y Shelton, 1964). Finalmente, se debe realizar asimismo una calificación morfológica del embrión, penalizando distintos aspectos tales como ausencia de simetría de blastómeros, tamaño celular irregular, células con vacuolas, daños en la membrana pelúcida o formas ovaladas del embrión. Existen distintos criterios de valoración morfológica, siendo uno de los más utilizados el propuesto por Lindner y Wright (1983)

Figura 1. Estadios de desarrollo embrionario previo a la implantación en ganado ovino. Adaptado de Witenberger-Torres y Sevellec (1987).

ESTADIO ANTES Y DESPUES DE LA OVULACIÓN	TIEMPO TRAS INICIO CELO
<b>INICIO DEL CELO</b>	<b>0 HORAS</b>
<b>ESTANCIA EN OVIDUCTO</b>	
Ovulación	24-30 horas
Primera división (2 blastómeros)	56 horas
Estadio de 4 blastómeros	60 horas
Estadio de 8 blastómeros	72 horas
<b>ESTANCIA EN ÚTERO</b>	
16 células: mórula	96 horas
48 células (44-150) mórula	Día 5
100 células (44-150) blastocisto joven	Día 6
200 células (138-308) blastocisto expandido	Día 7
400 células (150-650) blastocisto eclosionando	Día 8
400 células (250-550) blastocisto eclosionado	Día 9

**POSIBILIDADES DE MEJORA DE LA EFICACIA DE LAS TÉCNICAS MOET**

**■ Alternativas a las inyecciones repetidas de FSH.** Se han propuesto diferentes protocolos simplificados de superovulación que permitieran reducir el número de aplicaciones de FSH y por tanto economizar el coste laboral de los tratamientos. De las distintas opciones desarrolladas en la literatura, una de las combinaciones más estudiadas ha sido la aplicación conjunta de eCG y FSH en una única inyección, bajo la hipótesis de que la primera, por su ele-

vada vida media, permitiría sostener la estimulación folicular iniciada por la FSH. Tras el primer protocolo combinado propuesto por Maxwell y Wilson en 1989, los resultados obtenidos en la literatura han sido bastante variables, en particular en función de la base genética y de las dosis utilizadas. Así, se ha descrito que los tratamientos combinados suelen inducir una elevada estimulación ovárica asociada a bajas tasas de fertilización o incluso una regresión luteal prematura (Watanabe *et al.*, 1998). Una buena aproximación al problema



Tipos de blastocistos a día 7-8 tras el celo: expandidos (1), ecllosionados (2), en ecllosión (3) y pelúcida vacía tras ecllosión (4)

Tabla 1. Eficacia de los tratamientos simplificados de superovulación en ovejas Corriedale en época reproductiva (Simonetti *et al.*, 2008)

TRATAMIENTO	SIMPLIFICADO 1	SIMPLIFICADO 2	8 DOSIS FSH
Ovejas en celo	15/16	14/14	17/17
Ovejas superovuladas	15/15	14/14	16/17
Inicio del celo, horas	22 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	30 <sup>b</sup>
Inicio pico LH, horas	25 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	33 <sup>b</sup>
Tasa de ovulación	13,7	10,3	10,7
Recuperados/oveja	7,9	5,8	7,8
Tasa de recuperación, %	57,3 <sup>a</sup>	56,7 <sup>a</sup>	72,5 <sup>b</sup>
Fecundados/oveja	4,3 <sup>c</sup>	4,8 <sup>c</sup>	7,3 <sup>d</sup>
Tasa de fecundación, %	54,2 <sup>a</sup>	81,6 <sup>b</sup>	93,9 <sup>b</sup>
Viables/oveja	3,3	4,0	5,5
Tasa de viabilidad, %	42,4 <sup>a</sup>	68,4 <sup>b</sup>	71,2 <sup>b</sup>

Simplificado 1. 176 unidades NIH-FSH-S1 + 500 UI eCH en una inyección  
 Simplificado 2. 132 unidades NIH-FSH-S1 + 500 UI eCH en una inyección  
 8 dosis decrecientes de FSH hasta un total de 176 unidades NIH-FSH-S1  
 Superíndices diferentes indican diferencias de P<0,05 (a,b) o P<0,1 (c,d)

Tabla 2. Efecto del tratamiento repetido con FSH ovina sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones en ovejas Rasa Aragonesa al final de su vida reproductiva (Forcada *et al.*, 2000)

Nº DE TRATAMIENTO	1	2	3
Ovejas en celo	84/113	63/73	22/25
Ovejas superovuladas (con CL funcional)	70/84	52/63	19/22
Tasa de ovulación	11,4 <sup>c</sup>	11,6 <sup>c</sup>	8,5 <sup>d</sup>
Recuperados/oveja	7,3 <sup>cd</sup>	8,0 <sup>c</sup>	5,4 <sup>d</sup>
Fecundados/oveja	5,8	6,2	4,0
Viables/oveja	5,0	5,4	3,5
Congelables/oveja	4,1 <sup>c</sup>	4,5 <sup>c</sup>	2,4 <sup>pd</sup>

Superíndices diferentes indican diferencias de P<0,05 (mayúsculas) o P<0,1 (minúsculas)

ha sido la recientemente aportada, en la que la asociación de 500 UI de eCG con una dosis de FSH ovina un 25% inferior a la del protocolo habitual de 8 inyecciones, ha permitido obtener unos resultados muy satisfactorios en ovejas Corriedale (Tabla 1), siempre teniendo en cuenta que el uso de eCG se asocia con un adelanto del celo y del pico pre-ovulatorio de LH, lo que conviene tener en cuenta en tratamientos asociados al uso de la IA.

**■ Recuperaciones repetidas de ovejas al final de su vida productiva.**

El utilizar como donadoras ovejas de élite al final de su vida productiva puede ser un método interesante para obtener embriones de alto valor genético. Así, en una raza de reducido potencial ovulatorio como la local Rasa Aragonesa en España, el realizar 3 tratamientos

**HOY DÍA, LAS TÉCNICAS MOET SON EL MEDIO MÁS EFICIENTE PARA OBTENER EMBRIONES DE CALIDAD DE UNA HEMBRA DONADORA Y EN EL ESTADIO DE DESARROLLO ADECUADO**

de superovulación sucesivos con FSH ovina y un intervalo de 2 meses entre ellos puede permitir obtener cifras entre 12 y 15 embriones viables por oveja (Forcada *et al.*, 2000). En dicho estudio, donde aquellas ovejas que no salieron en celo o presentaron cuerpos lúteos regresados no recibieron un subsiguiente tratamiento de superovulación al objeto de optimizar el protocolo de-

sarrollado, el tratamiento repetido con FSH redujo la tasa de ovulación en la tercera repetición, aunque las tasas de recuperación de embriones, de fecundación y de viabilidad no se vieron afectadas (Tabla 2).

#### Mejora de la eficacia de los tratamientos de superovulación en el anestro.

Entre los factores que modifican la respuesta a la superovulación, sin duda está la estación del año, de manera que en época reproductiva los resultados son superiores en relación a una superovulación en anestro, particularmente en las razas de superior estacionalidad sexual. Así, distintos autores han mostrado que la presencia de cuerpo lúteo al inicio de la estimulación ejerce un efecto positivo sobre la viabilidad embrionaria (Veiga-López *et al.*, 2005), parámetro que también puede verse mejorado con un tratamiento con melatonina a las ovejas donadoras durante el anestro (Forcada *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES

En conclusión, las técnicas MOET se revelan como necesarias en determinadas situaciones de conservación y mejora de determinados genotipos ovinos de interés. El optimizar los resultados de las mismas es un objetivo para el que ya se dispone de un buen número de protocolos y herramientas válidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- FORCADA, F., J.M. LOZANO, J.A. ABECIA, AND ZÚÑIGA. 2000. Repeated superovulation of high prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high quality embryos. *Livest. Prod. Sci.* 66: 263-269.
- FORCADA, F., J.A. ABECIA, J.A. CEBRIÁN-PÉREZ, M.T. MUIÑO-BLANCO, J.A. VALARES, AND I. PALACÍN. 2006. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 65: 356-365.
- GONZÁLEZ-BULNES, A., D.T. BAIRD, B.K. CAMPBELL, M.J. COCERO, R.M. GARCÍA-GARCÍA, E.K. INSKEEP, A. LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.S. MCNEILLY, J. SANTIAGO-MORENO, C.J.H. SOUZA, AND VEIGA-LÓPEZ, A. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 421-435.
- LINDNER, G.M., AND R.W. WRIGHT. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-417.
- MAXWELL, W.N.C., AND H.R. WILSON. 1989. Superovulation and embryo recovery in ewes treated with a single injection of PMMSG and FSH-P. *Proc. Austr. Soc. Reprod. Biol.* 21: 50 (Abstr.).
- MOORE, N.W., AND SHELTON, J.N. 1964. Egg transfer in sheep. Effect of degree of synchronization between donor and recipient, age of eggs and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J. Reprod. Fertil.* 7: 145-152.
- PELLETIER, J., AND J. THIMONIER. 1975. Interactions between ovarian steroids or progestagens and LH release. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15: 131-146
- SIMONETTI, L., F. FORCADA, O.E. RIVERA, N. CAROU, R.H. ALBERIO, J.A. ABECIA, AND I. PALACÍN. 2008. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 104:227-237
- TORRES, S., Y. COGNIE, AND G. COLAS. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 27: 407-419.
- VEIGA-LÓPEZ, A., A. GONZÁLEZ-BULNES, R.M. GARCIA-GARCIA, V. DOMINGUEZ, AND M.J. COCERO. 2005. Effects of previous ovarian status in ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology* 63: 1973-1983.
- WATANABE, H., H. KIMURA, N. ISHIDA, M. OKADA, A. MIYAMOTO, AND Y. FUKUI. 1998. A simple superovulation method of a single injection of FSH combined with eCG for superovulation of Suffolk ewes during the breeding season. II. The ovarian responses and the embryo qualities. *J. Reprod. Dev.* 44: 177-183.
- WINTENBERGER-TORRES, S., AND SEVELLEC, C. 1987. Atlas of the Early Development of the Sheep Embryo. INRA. Paris.