

## LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* COMO COMPLEMENTO DE LAS TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN *IN VIVO* AL SERVICIO DE LA CONSERVACIÓN DE RAZAS OVINAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

Forcada, F.<sup>1</sup>, Buffoni, A.<sup>1</sup>, Abecia, J.A.<sup>1</sup>, Asenjo, B.<sup>2</sup>, Palacín, I.<sup>1</sup>, Vázquez, M.I.<sup>1</sup>, Sánchez-Prieto, L.<sup>1</sup> y Casao, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. España. E-mail: [alf@unizar.es](mailto:alf@unizar.es)

<sup>2</sup> Escuela Universitaria de Ingenierías Agrarias de Soria. España.

### INTRODUCCIÓN

La producción de embriones ovinos *in vitro* puede ser una herramienta de interés para reducir el intervalo generacional y para ayudar en la conservación de razas en peligro de extinción. No obstante, la eficiencia de la técnica sigue siendo menor que la producción de embriones *in vivo*, de manera que la recuperación de embriones directamente de la hembra sigue siendo la vía más eficiente para obtener embriones de alta calidad en un estadio de desarrollo determinado. La recuperación de oocitos *in vivo* como fuente para la producción de embriones *in vitro*, tanto por laparotomía como por laparoscopia, se ha asociado a diferentes tratamientos de estimulación ovárica, tanto con eCG como con FSH, aunque la eficacia de dichos procedimientos es limitada. Un modo de maximizar el número de embriones obtenidos de una única donadora puede ser la combinación de las técnicas de producción de embriones *in vivo* e *in vitro*, de manera que el objetivo del presente estudio fue investigar el uso de ovarios previamente superovulados para la obtención de oocitos en ovejas de raza Ojalada Soriana, determinando tanto la influencia del tratamiento de superovulación aplicado repetidamente (3 veces) sobre el número y la competencia de los oocitos recuperados 7 días tras el celo consecutivo al tercer tratamiento.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se desarrolló entre septiembre de 2008 y marzo de 2009 en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Se utilizaron 30 ovejas adultas de raza Ojalada Soriana con una edad media de 6,7±0,5 años y procedentes del rebaño de la Excm. Diputación Provincial de Soria en San Esteban de Gormaz. Se testaron 2 protocolos de superovulación en ovejas sincronizadas con esponjas vaginales conteniendo 30 mg de FGA (Sincropart®, Ceva Salud Animal, Barcelona, España). Por una parte, 8 ml (280 UI) de FSHp (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Dublin, Irlanda) administrados en un total de 6 inyecciones decrecientes (2, 1,5, 1,25, 1,25, 1, 1 ml) vía intramuscular cada 12 horas comenzando 48 horas antes de la retirada de la esponja (**Grupo D**; n=15); por otra, una única inyección de 6 ml de FSH (210 UI + 500 UI eCG vía intramuscular 48 horas antes de la retirada de la esponja (**Grupo S**; n=15). Los embriones se recuperaron 7 días tras el celo por laparotomía con la ayuda de un catéter Foley. Las ovejas recibieron el mismo tratamiento de superovulación 3 veces consecutivas. Inmediatamente tras la última recuperación de embriones, las ovejas fueron sacrificadas con un eutanásico intravenoso (T-61®; ISPAH, Salamanca, España) y los ovarios recuperados.

Todos los procedimientos de obtención de oocitos y de maduración y fecundación, así como los del posterior cultivo hasta el estadio de blastocisto, fueron los ya previamente descritos por nuestro grupo trabajo (Vázquez et al., 2010). Únicamente hay que señalar que, al objeto de evaluar adecuadamente la capacidad de los ovarios superovulados como fuente de oocitos, un **grupo control (C)** constituido por ovarios recuperados de matadero, obviamente no superovulados, fue considerado. Finalmente, para evaluar la calidad de los blastocistos obtenidos al final del proceso, sobre una muestra de ellos (n=8, n=7 y n=12 para los grupos D, S y C respectivamente) se realizó una tinción Hoechst 33342 para contar el número de células así como el test del acetato de diclorodihidrofluoresceína (DCHFDA) (Hashimoto et al., 2000) para evaluar el número de células con altos niveles de peróxido de hidrógeno, que se asocian a daño celular y apoptosis. Para la estadística, se utilizó Chi-cuadrado para porcentajes y ANOVA de una vía para el resto de parámetros.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número total de embriones viables obtenidos por oveja en los 3 tratamientos de superovulación previos a la recuperación de oocitos no fue diferente entre el grupo S

(13,7±2,5 embriones) y el grupo D (14,1±2,3 embriones). El número de oocitos recuperados y seleccionados para maduración fue asimismo muy similar en los grupos experimentales (7,1±1,2 y 8,5±1,5 oocitos por oveja para S y D) y en el C (4,5±0,3 por ovario). En la literatura, la recuperación de oocitos *in vivo* tras tratamientos de superovulación con FSH ovina o porcina ha ofrecido resultados variables, entre 3,5 y 10 oocitos aptos para maduración por oveja (Hammami, 2008; Veiga et al., 2008), con una ligera superioridad de los tratamientos de dosis constantes frente a los de dosis decrecientes (Ptak et al., 1999).

Por lo que a la competencia de los oocitos recuperados se refiere, los procedentes de las ovejas que recibieron el tratamiento D tuvieron unas tasas de maduración y de división significativamente superiores que los derivados del tratamiento S o del lote C (Tabla 1). Sin embargo, los oocitos procedentes del grupo C, de ovarios no superovulados, mostraron una superior tasa de fecundación que aquellos derivados de ovarios previamente superovulados. Las tasas de blastocisto fueron similares en los 3 grupos (Tabla 1). Algunos autores han señalado que los tratamientos de superovulación a base de varias aplicaciones de dosis decrecientes de FSH pueden alterar la tasa de maduración (Berlinguer et al., 2004) debido a que las primeras dosis altas inducen un rápido y anormal desarrollo folicular que se asocia con una asincronía entre el crecimiento de los folículos y el estado folicular que altera la capacitación del oocito (Hyttel et al., 1997). Esta teórica menor tasa de maduración de los oocitos procedentes del lote D no se ha producido en nuestro estudio; en parte, esta contradicción puede ser debida a que dichos oocitos fueron recuperados no en la onda folicular consecutiva al tratamiento de superovulación, sino en la siguiente. Además, las tasas de maduración y de división de los oocitos recuperados del grupo S fueron inferiores que las mostradas en el grupo D, probablemente como consecuencia de los altos niveles de anticuerpos anti-eCG mostrados por algunas ovejas tras tratamientos consecutivos de dicha hormona, tal y como ya hemos presentado recientemente (Forcada et al., 2011).

Finalmente, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos en relación al número total de células de los blastocistos obtenidos (160±24, 188±28 y 212±47 para los grupos D, S y C) o al número de células DCHFDA positivas, con altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (13,7±3,5, 19,1±4,1 y 20,6±3,7 células por embrión, respectivamente). Algunos autores han mostrado que los embriones producidos *in vivo* tras la aplicación de un tratamiento de superovulación simplificado pueden tener un menor número de células y por tanto una posible menor tolerancia a la crioconservación que los embriones procedentes de tratamientos con varias inyecciones de FSH (Leoni et al., 2001; Forcada et al., 2011).

En conclusión, el presente estudio parece demostrar que los oocitos recuperados el día 7 tras el celo de ovarios previamente superovulados con tratamientos repetidos con una única aplicación de eCG/FSH, tienen una menor competencia en los estadios iniciales de la producción de embriones *in vitro* que aquellos procedentes de ovarios superovulados con el tradicional protocolo de varias inyecciones de FSH. No obstante, dichas diferencias desaparecen tras la fecundación, y las tasas y viabilidad de los blastocistos obtenidos no difieren entre grupos. En total, se obtuvieron 1,7 y 1,8 blastocistos por oveja producidos *in vitro* para los grupos D y S, a añadir a los obtenidos *in vivo* tras la aplicación repetida de los tratamientos de superovulación, lo que permite maximizar la producción de embriones de una única donadora; por tanto, la metodología aquí descrita parece idónea para la producción y conservación de embriones en razas ovinas en peligro de extinción.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P.P., Rosati, I., Ledda, S., Naitana, S. 2004. *Theriogenology* 61: 1477-1486.
- Forcada, F., Ait Amer-Meziane, M., Abecia, J.A., Maurel, M.C., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., Asenjo, B., Vázquez, M.I., Casao, A. 2011. *Theriogenology*, 75: 769-776.
- Hammami, S. 2008. Producción de embriones *in vitro* para selección genética. Tesis Master of Science. CIHEAM, Zaragoza, Spain.
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H., Kashima, N. 2000. *Molecular Reproduction and Development* 57: 353-360.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997. *Theriogenology* 47: 23-32.
- Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P., Ledda, S., Naitana, S. 2001. *Reproduction Nutrition and Development* 41: 239-246.
- Ptak, G., Dattena, M., Loi, P., Tischner, M., Cappai, P. 1999. *Theriogenology* 52: 1105 - 1114.
- Vázquez, M.I., Forcada, F.,

Casao, A., Abecia, J.A., Sosa, C., Palacín, I. 2010. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 677-684. • Veiga-Lopez, A., Dominguez, V., Souza, C.J.H., Garcia-Garcia, R.M., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., McNeilly, A.S., Gonzalez-Bulnes, A. 2008. *Fertility and Sterility* 89: 1328-1337.

**Tabla 1.** Tasas de maduración, fecundación, división y de blastocistos a partir de oocitos recuperados de ovarios de ovejas Ojaladas que recibieron 3 tratamientos previos de superovulación con un total de 280 UI de FSHp en 6 inyecciones decrecientes (grupo D) o con 210 UI de FSHp y 500 UI de eCG administradas en una única inyección (grupo S). El grupo control (C) se refiere a ovarios recuperados en el matadero de ovejas no superovuladas.

Grupo	Maduración	Fecundación	División	Blastocistos
D	84/96 (87,5%) <sup>a</sup>	79/84 (94%) <sup>a</sup>	79/96 (82,3%) <sup>a</sup>	25/79 (31,6%)
S	93/124 (75%) <sup>b</sup>	88/93 (94,6%) <sup>a</sup>	87/124 (70,2%) <sup>b</sup>	27/87 (27%)
C	279/370 (75,4%) <sup>b</sup>	275/279 (98,6%) <sup>b</sup>	274/370 (74,1%) <sup>b</sup>	89/274 (32,5%)

Entre grupos, letras diferentes (a, b) indican diferencias de  $P < 0,05$ .

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el INIA (Proyecto RZ2008-00002).

#### MAXIMIZING EMBRYO PRODUCTION IN ENDANGERED SHEEP BREEDS: *IN VITRO* PROCEDURES TO COMPLEMENT *IN VIVO* TECHNIQUES

**ABSTRACT:** This study investigated the use of previously superovulated ovaries as a source of oocytes, assessing the competence of them for *in vitro* embryo production. Two superovulatory treatments were performed: eCG plus FSH in a single dose (S) or the conventional protocol of six decreasing doses of FSH (D). Thirty donor ewes of the endangered Ojalada breed were given either the simplified (group S; n=15) or the decreasing-dose (group D; n=15) treatments three times at intervals of  $\geq 50$  d. Ovaries were recovered on day 7 after the estrus following the third treatment, and the oocytes were collected to assess *in vitro* maturation, fertilization, and development to the blastocyst stage. Oocytes from non-previously superovulated ewes recovered at a local slaughterhouse served as the Control group (C). The two superovulatory treatments and the control group did not differ in the mean number of oocytes selected for maturation ( $7.1 \pm 1.2$  and  $8.5 \pm 1.5$  per ewe, and  $4.5 \pm 0.3$  per ovary in the D, S, and C groups, respectively). The oocytes recovered from ewes in Group D (87.5%) had a significantly ( $P < 0.05$ ) higher maturation rate than did those recovered from ewes in group S (75%) or the C group (75.4%). Although the oocytes from non-superovulated ewes had a higher ( $P < 0.05$ ) fertilization rate (98.6%) than did those derived from superovulated ovaries (94% and 94.6% in the D and S groups, respectively), the three groups did not differ in their blastocyst rates and the total number of cells in *in vitro*-produced blastocysts. In the two superovulated groups, 1.7 (D) and 1.8 (S) *in vitro*-produced blastocysts were generated per ewe, which indicates that it is feasible to combine *in vivo* and *in vitro* techniques to maximize embryo production in endangered sheep breeds.

**Keywords:** sheep, superovulation, *in vitro* embryo production.