

Repetibilidad de la respuesta superovulatoria en la producción de embriones *in vivo* con un protocolo modificado de pFSH en ovejas Merino Australiano

Repeatability of the superovulatory response in embryo production *in vivo* with a modified pFSH protocol in Australian Merino sheep

Marcela Gómez-Ceruti^{1*}, Carlos Mariano Serrano C.¹, Giordano Catenacci A.¹,
Lina Maria Correa E.^{1,2}, Claudia Letelier-Velasquez³

RESUMEN

El estudio evaluó la repetibilidad de la respuesta superovulatoria en 12 ovejas Merino Australiano durante la estación reproductiva en uno (G1), tres (G2) y cuatro (G3) años consecutivos. Se utilizó un protocolo modificado basado en 200 mg de pFSH en ocho dosis decrecientes (intervalos de 12 h) y estrategias de apoyo tales como el cambio del CIDR al día 7, el rociado de los cuernos durante el procedimiento con solución salina con heparina y el uso de Flunixin Meglumine. No se encontraron diferencias significativas en el número total de estructuras recuperadas durante los años de aplicación del protocolo de superovulación (G1=8±2, G2=18±3, G3=19±4; p>0.05). Se observó una alta repetibilidad, tanto para el número total de embriones como para el número de embriones transferibles en G2 y G3. El tratamiento superovulatorio durante 3 y 4 años sucesivos no afectó la eficacia de la recuperación de embriones.

Palabras clave: oveja, superovulación, FSH, embriones, recuperación quirúrgica

¹ Centro de Innovación de Ovinos para el Secano – OVISNOVA, Universidad Santo Tomás, Talca, Chile

² Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Talca, Chile

³ Instituto de Ciencia Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Austral, Valdivia, Chile

* E-mail: marcelagomez@santotomas.cl

Recibido: 26 de enero de 2023

Aceptado para publicación: 5 de noviembre de 2023

Publicado: 18 de diciembre de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The study evaluated the repeatability of the superovulatory response in 12 Australian Merino ewes during the breeding season in one (G1), three (G2), and four (G3) consecutive years. A modified protocol was used based on 200 mg pFSH in eight decreasing doses (12-h intervals) and supportive strategies such as changing the CIDR at day 7, spraying the horns with heparinized saline during the procedure, and use of Flunixin Meglumine. No significant differences were found in the total number of structures recovered during the years of application of the superovulation protocol (G1=8±2, G2=18±3, G3=19±4; p>0.05). High repeatability was observed, both for the total number of embryos and for the number of transferable embryos in G2 and G3. Superovulatory treatment for 3 and 4 successive years did not affect the efficacy of embryo retrieval.

Key words: sheep, superovulation, FSH, embryos, surgical recovery

INTRODUCCIÓN

En el contexto actual de cambio climático y avance de la desertificación de sectores de secano en Chile (Emanuelli *et al.*, 2016), el ovino es una especie que debe ser protegida y multiplicada, dada su habilidad para transformar forraje natural de baja calidad en proteína de alto valor (Khan *et al.*, 2022). Como parte de las acciones a tomarse, es relevante hacer más eficientes las tecnologías reproductivas, como la superovulación y la transferencia embrionaria, ya que la variabilidad de la respuesta superovulatoria, además de su alto costo, ha sido una de las mayores limitantes para su uso confiable a nivel comercial (Bartlewski *et al.*, 2016).

La respuesta ovulatoria está influenciada por factores extrínsecos e intrínsecos, incluyendo la raza, edad, estación, ubicación, nutrición, estado reproductivo y la salud de la donante. Se ha demostrado en tratamientos superovulatorios una disminución en la respuesta ovárica tanto en intervalos cortos como largos (Khan *et al.*, 2022). Algunos estudios han demostrado que tratamientos superovulatorios repetidos durante la misma temporada reproductiva disminuyen significativamente la tasa media de ovulación en ove-

jas (Cordeiro *et al.*, 2003; Forcada *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2020). Sin embargo, otros estudios realizados en intervalos anuales no han evidenciado cambios significativos en el número de embriones recuperados (Bari *et al.*, 2001).

Los protocolos hormonales se basan principalmente en la inserción de esponjas intravaginales de progesterona durante un máximo de 12-14 días, así como en la estimulación del desarrollo folicular con gonadotropinas exógenas (Khan *et al.*, 2022; Días *et al.*, 2023). La variabilidad en la tasa de ovulación entre animales similares en iguales condiciones se debe mayormente a las dosis utilizadas y al número y frecuencia de las inyecciones de hormonas exógenas (González-Bulnes *et al.*, 2004). Una correcta respuesta superovulatoria sucesiva está asociada al tiempo transcurrido entre una superovulación y otra, y a la menor presencia de formación de adherencias fibrosas en el tracto reproductivo (King *et al.*, 2022). El presente estudio evaluó la repetibilidad de la respuesta superovulatoria con un protocolo modificado, con dosis decrecientes de pFSH y con estrategias de soporte asociadas, utilizando un procedimiento quirúrgico de recuperación embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Tratamientos

El estudio se realizó en un predio comercial ubicado en el sector del secano costero de la provincia de Cardenal Caro (S34°6'26.57", W71°44'1.03"), en el centro de Chile. Todos los procedimientos de manejo animal y muestreo se realizaron de acuerdo con las directrices aprobadas por el Comité de Ética Científica de la Universidad Santo Tomás, Chile (22-73).

El grupo experimental estuvo compuesto por 12 ovejas Merino Australiano, considerando un número mínimo que permitiera obtener resultados estadísticamente significativos en un contexto de baja disponibilidad de individuos de raza pura en la región, y el costo de implementar el ensayo durante 4 años. Se trabajó con animales de 2-3 años de edad y en aparente buen estado de salud. Tenían historia de parto y condición corporal media de 3.5. No estaban preñadas ni lactantes y se mantuvieron alejadas de los machos. El estudio se llevó a cabo durante cuatro años consecutivos, durante la época reproductiva y con temperatura ambiental comprendida entre 3 y 31 °C. Todas las ovejas disponían de agua y pastoreaban *ad libitum* en régimen de descanso-rotación en pradera natural.

Protocolos de Sincronización y Superovulación

Los tratamientos superovulatorios se realizaron una vez al año. Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos: (G1) como grupo control durante una temporada, (G2) durante tres temporadas consecutivas y (G3) durante cuatro temporadas consecutivas. Cada año se aplicó un protocolo de ovulación múltiple modificado (OCFlock Management Inc., Bowden, Canadá; Figura 1). Todas las ovejas se sincronizaron con dispositivos intravaginales CIDR (día 0), que contenían 0.3 g de progesterona (CIDR, Inter Ag, Nueva Zelanda) durante 12 días, que se

sustituyeron el día 7 para mantener niveles altos de progesterona en sangre. La superovulación se indujo con la aplicación intramuscular (IM) de 200 mg de FSH porcina (pFSH, Folltropin®-V, Bioniche Animal Health, USA) dos veces al día (intervalos de 12 h) en ocho dosis decrecientes (36-32-28-24-22-20-16 mg), comenzando el día 10 hasta el día 13 (Figura 1).

El día 10, las ovejas fueron tratadas con 100 UI (0.5 mL) de eCG, gonadotropina coriónica equina (Novormon®, Zoetis, España) IM y 250 µg (1 mL) de cloprostenol (Estrumate®, Merck Animal Health, USA) IM como agente luteolítico. El día 12 se retiraron los dispositivos CIDR y los animales recibieron una inyección de 200 UI de eCG IM.

Los días 13 y 14 se introdujeron carneros, evaluados andrológicamente, para realizar la monta natural en la mañana y en la tarde, utilizando un macho por grupo. Los carneros fueron retirados el día 15 y las hembras fueron tratadas los días 17 a 19 con 3 mL del inhibidor de prostaglandina Flunixin Meglumine (Finadyne, Schering-Plough Animal Health, USA) IM para prevenir pérdidas embrionarias tempranas debidas a factores de estrés (Karasahin *et al.*, 2021). Los animales ayunaron durante el día 19 y fueron sometidos a lavado uterino el día 20.

Recuperación Embrionaria y Respuesta Superovulatoria

La respuesta superovulatoria en cada ovario se observó mediante laparoscopia, contando los cuerpos lúteos (CL). Los embriones se recuperaron mediante técnicas quirúrgicas, según el método descrito por Bruno-Galarraga *et al.*, 2014). Los animales fueron anestesiados con xilacina (0.10 mg/kg, Xila-10®, Drag pharma, Chile) y ketamina (3.5mg/kg; Ketostop®, Drag pharma, Chile) por vía intravenosa. La recuperación embrionaria se realizó al día 7 de la monta natural. Para esto, se hizo una incisión de 5 cm contigua a la línea media para permitir lavados consecutivos. Se localizó el útero mediante

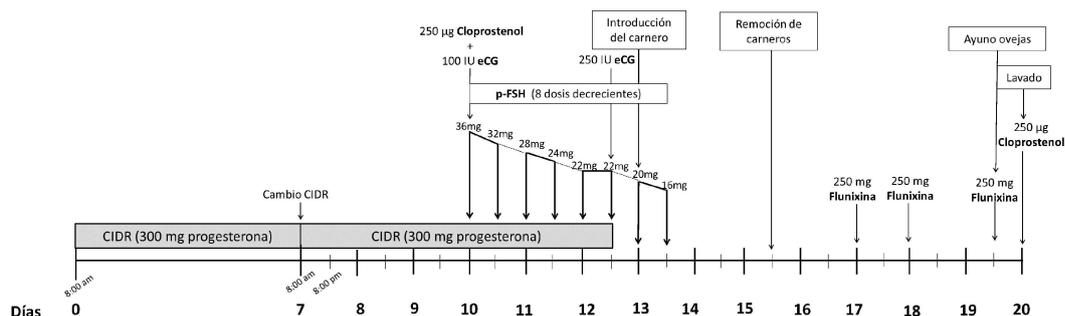


Figura 1. Representación esquemática de los procedimientos experimentales, incluidos los protocolos de sincronización del estro, tratamientos superovulatorios y protocolo de lavado en ovejas Merino Australiano. *eCG*: gonadotropina coriónica equina; *pFSH*: *FSH* porcina; *Flunixinina*: *flunixinina* Meglumine

técnica laparoscópica (Wolf 4015 lichtprojektor), Alemania y, con la ayuda de una pinza Babcock para reducir el trauma en el útero, se exteriorizaron los cuernos y el cuerpo sobre la cavidad abdominal. Durante este procedimiento, los cuernos uterinos se rociaron permanentemente con solución salina fisiológica con heparina (1000 UI/L a 38 °C) para evitar adherencias y permitir futuros lavados (Ramón-Ugalde *et al.*, 2008). Cada cuerno se enjuagó con 40 mL de medio de lavado comercial (ViGro complete Flush®, Bioniche, USA) precalentado a 38 °C.

Tras la recuperación, se evaluó la morfología embrionaria con un microscopio estereoscópico binocular (Olimphia 60x) y se clasificaron según las directrices de la International Embryo Technology Society (IETS), tanto por su estado de desarrollo como por su calidad (Robertson y Nelson, 2010). Posterior al lavado, la oveja recibió 1 mL de cloprostenol (250 µg) IM para inducir la luteólisis. Catorce días después del lavado uterino, las ovejas fueron expuestas a carneros para realizar la monta natural.

Análisis Estadísticos

En este estudio se registraron variables como la tasa de ovulación (número de CL/oveja), el número de estructuras recupera-

das y de embriones transferibles y degenerados y la tasa de respuesta superovulatoria (número de estructuras recuperadas/número de CL) de todas las ovejas de los tres grupos. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de los datos. A continuación, se compararon las variables mediante el análisis de varianza. La repetibilidad de la respuesta superovulatoria se expresó como coeficiente de correlación intraclase y se calculó a partir de la estimación de los componentes de la varianza entre las ovejas y dentro de ellas. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados se expresan como media \pm D.E. Los datos se analizaron utilizando el software Statgraphics Centurion 16.1.15 (Statgraphics Technologies, USA).

RESULTADOS

Los valores medios de las estructuras recuperadas y de los embriones transferibles y degenerados se presentan en el Cuadro 1. El número medio de estructuras recuperadas para G1, G2 y G3 en los periodos en estudio fue de 8 ± 2 , 18 ± 3 y 19 ± 4 , sin diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$). El número medio de embriones transferibles para G1, G2 y G3 fue de 4 ± 1 , 13 ± 2 y 12 ± 2 , respecti-

Cuadro 1. Efecto del número de tratamientos superovulatorios sucesivos con pFSH sobre la recuperación de estructuras y embriones en ovejas Merino Australiano

Estructuras	G1 (n=4)	G2 (n=4)				p	G3 (n=4)				p
	Año 1	Año 1	Año 2	Año 3	Año 1		Año 2	Año 3	Año 4		
Tasa ovulatoria (%)	14±9	22±9	19±6	23±9	0.89	25±9	27±9	22±8	19±1	0.78	0.12
Todas	8±2	19±6	16±3	19±9	0.92	26±10	18±10	16±9	15±1	0.95	0.11
N° embriones transferibles (%)	4±1 (48)	13±2 (70)	12±3 (77)	13±6 (70)	0.97	11±3 (41)	10±5 (53)	16±9 (100)	11±3 (73)	0.84	0.05
N° embriones degenerados (%)	4±1 (52)	6±5 (30)	4±1 (23)	6±4 (30)	0.90	16±6 (59)	9±4 (47)	0	4±2 (27)	0.05	0.60
Tasa de respuesta superovulatoria (%)	67	83	80	69	0.71	69	58	60	77	0.89	0.51

Cuadro 2. Repetibilidad estimada para el número total de embriones y número total de embriones transferibles en ovejas Merino Australiano en grupos sometidas a sucesivos tratamientos superovulatorios

Grupo	Variables analizadas	Repetibilidad	Error estándar	p
G2 (n=4)	N° total de embriones	0.84	0.08	0.06
	N° de embriones transferibles	0.89	0.08	0.03
G3 (n=4)	N° total de embriones	0.84	0.16	0.03
	N° de embriones transferibles	0.54	0.12	0.19

vamente ($p < 0.05$), en tanto que el de embriones degenerados fue de 4 ± 1 , 5 ± 2 y 7 ± 2 , respectivamente ($p > 0.05$). Se observó una alta repetibilidad para el número total de embriones en G2 y G3, y en el número de embriones transferibles en G2 (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio contribuyen a una mejor comprensión sobre los efectos de tratamientos superovulatorios repetidos

durante años consecutivos en ovejas Merino Australiano, sobre la producción de embriones *in vivo*. Es importante destacar que los sujetos de estudio fueron mantenidos en un entorno productivo de características naturales, lo que confiere a los resultados una alta relevancia en cuanto a su aplicabilidad en el contexto del mundo real. Estos resultados proporcionan una valiosa perspectiva para los productores de ovinos en el sector del secano costero de Chile, donde se enfrentan a desafíos específicos en la gestión de sus rebaños.

El protocolo de superovulación y recuperación de embriones *in vivo* usado en este estudio en cuatro años sucesivos no afectó, tanto en cantidad como en calidad, de las estructuras de recuperación. Los resultados mostraron un aumento en el número de embriones recuperados en tratamientos hormonales aplicados en años consecutivos (Cuadro 1), además se observó una elevada repetibilidad del número total de embriones recuperados para el G2 y del número de embriones transferibles para el G3 (Cuadro 2).

Estudios anteriores han demostrado que la eficacia y el éxito en la producción de embriones depende principalmente de la repetibilidad de la respuesta ovárica individual al tratamiento de superovulación, cuando las ovejas se someten a protocolos hormonales sucesivos. De acuerdo con investigaciones donde se emplearon protocolos sucesivos con intervalos de corta duración (27 a 50 días), se pudo observar que la tasa ovulatoria y la formación de estructuras estuvieron influenciadas por el número de tratamientos superovulatorios, lo que conlleva a una disminución en la producción de embriones (Forcada *et al.*, 2011; Bruno-Galarraga *et al.*, 2014).

La capacidad de respuesta de las ovejas no fue influenciada por la repetición del tratamiento de superovulación, el cual fue realizado en forma anual, durante cuatro años consecutivos. Estos resultados coinciden con Bari *et al.* (2001) quienes determinaron que con tratamientos anuales no hubo cambios en la tasa media de ovulación o en la duración del embrión. También coincide con lo reportado por Cordeiro *et al.* (2003), donde la respuesta ovulatoria se mantuvo constante en tratamientos de superovulación con intervalos de 90 días. Se nota que el lapso entre tratamientos repetidos ejerce un efecto significativo en la respuesta ovárica. Esta variabilidad en los resultados en tratamientos superovulatorios repetidos pueden ser atribuibles a la secuencia temporal y dinámica de desarrollo de los folículos, que se extiende

desde la reserva folicular hasta el proceso de ovulación, un período que abarca aproximadamente 40 días en el caso de las ovejas.

El efecto positivo de los protocolos de disminución de dosis de FSH en ovejas también fue descrito por Menchaca *et al.* (2009), obteniendo una mayor respuesta ovárica y producción de embriones. Ribeiro *et al.* (2022) compararon dos dosis de pFSH (133 y 200 mg), encontrando un aumento significativo del número de estructuras recuperadas (4.8 ± 1.1 vs. 7.5 ± 1.7) y de embriones viables (2.29 ± 0.67 vs. 6.47 ± 1.60 , respectivamente). En el presente estudio se observó un mayor número de embriones en comparación con los reportados en la literatura, con dosis decrecientes de 200 mg de pFSH para G2 y G3, posiblemente debido a que en el presente estudio las dosis decrecientes se aplicaron en el curso de cuatro días.

Entre las estrategias de apoyo utilizadas estuvo la aplicación de Flunixin Meglumine, que es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo y un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, y favorece la prolongación de la vida útil del cuerpo lúteo (Bergstein-Galan *et al.*, 2020). Por otro lado, el dispositivo CIDR se reemplazó en el día 7 para mejorar el estímulo de la progesterona. En este sentido, Bari *et al.* (2001) determinaron el efecto de la cantidad de progestágeno (30 vs. 45 mg) encontrando un aumento de la calidad embrionaria al utilizar altas dosis de progestágenos. Además, Taira *et al.* (2022) establecieron que la suplementación con 0.33 g de progestágeno durante la primera onda folicular del ciclo estral mejoraba la viabilidad embrionaria.

CONCLUSIONES

El protocolo de pFSH modificado y estrategias de soporte usados en este trabajo pueden ser una buena herramienta para tratamientos de superovulación repetidos en diferentes años en ovejas Merino Australiano,

ya que permitió obtener una alta cantidad y repetibilidad para el número total de embriones recuperados y transferibles en tres y cuatro años sucesivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Tecnovis Ltd. por el apoyo técnico, a Agrícola Tinajacura por la ejecución y financiamiento del programa de transferencia de embriones y a la Universidad Santo Tomás por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

LITERATURA CITADA

1. **Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray A, Merrell B. 2001.** The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in ewe. *Theriogenology* 56: 147-155. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00550-7
2. **Bartlewski PM, Seaton P, Oliveira MEF, Kridli RT, Murawski M, Schwarz T. 2016.** Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in ewe: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology* 86: 130-143. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.024
3. **Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Kozcki LE, Bortoleto CT, Siquiera Lara NS, Aschenbrenner GA. 2020.** Effect of flunixin meglumine and hGC at commercial programs for multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in ewe. *Arch Vet Sci* 25: 56-66. doi: 10.5380/avs.v25i1.70477
4. **Bruno-Galarraga MM, Cueto M, Gibbons AE, Pereyra-Bonnet F, Catalano R, Gonzalez-Bulnes, A. 2014.** Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Rumin Res* 120: 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.04.002>
5. **Cordeiro MF, Lima-Verde JB, Lopes-Júnior ES, Teixeira DIA, Farias LN, Salle HO, Simplicio AA, et al. 2003.** Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Rumin Res* 49: 19-23. doi: 10.1016/S0921-4488(03)-00059-2
6. **Dias JH, Vergani GB, Gonçalves JD, Oliveira TA, Penitente-Filho JM, Pereira VSA, et al. 2023.** Different doses of pFSH are effective to promote follicular growth, superovulatory response, and embryo yield in White Dorper ewes. *Small Rumin Res* 220: 106914. doi: 10.1016/j.smallrumres.2023.106914
7. **Emanuelli P, Milla F, Duarte E, Torrealba J, Garrido-Ruiz C, Colmenares M, Orellana-Díaz O, López S. 2016.** Diagnóstico de la desertificación en Chile y sus efectos en el desarrollo sustentable. Documento Técnico 03. Corporación Nacional Forestal de Chile (CONAF).
8. **Forcada F, Amer-Meziane MA, Abecia JA, Maurel MC, Cebrián-Pérez JA, Muño-Blanco T, Casao, A. 2011.** Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in ewe. *Theriogenology* 75: 769-776. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.10.019
9. **Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A. 2000.** Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54: 1055-1064. doi: 10.1016/S0093-691X(00)-00414-3
10. **Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Dalen JE. 2001.** Heparin and low-molecular-weight heparin mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 119: 64S-94S.

11. **Karazahin T, Alkan H, Satilmis F, Dursun S, Erdem H. 2021.** Effect of flunixin meglumine treatment during and after embryo transfer on the pregnancy rate in cattle. *Reprod Domest Anim* 56: 1555-1561. doi: 10.1111/rda.14019
12. **Khan SU, Jamal MA, Su Y, Wei HJ, Qing Y, Cheng W. 2020.** Towards improving the outcomes of multiple ovulation and embryo transfer in sheep, with particular focus on donor superovulation. *Vet Sci* 9: 117. doi: 10.3390/vetsci9030117
13. **King CAF, Osborn D, Grupen, CG. 2022.** Multiple ovulation and embryo transfer in sheep: effects of embryo developmental stage and quality on viability *in vivo* under farm conditions. *Aust Vet J* 100: 451-458. doi: 10.1111/avj.13174
14. **Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, De Castro T, Rubianes E. 2009.** New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 22: 113-118. doi: 10.1071/RD09222
15. **Pinto PHN, Balaro MFA, de Almeida Saraiva HFR, Brair VL, Alfradique VAP, Côrtes LR, et al. 2020.** Successive *in vivo* embryo production in Santa Inês sheep. *Anim Prod Sci* 60: 497-502. doi: 10.1071/AN18740
16. **Ramón-Ugalde JP, Folch J, Cocero MJ, Piña-Aguilar RE, Alabart JL. 2008.** Embryo recovery from the oviduct in superovulated ewes: a method to improve MOET systems. *Czech J Anim Sci* 53: 145. doi: 10.17221/374-CJAS
17. **Ribeiro ACS, Taira AR, Santos VC, Batista RITP, Balaro MFA, Schmidt APP, Brandão FZ. 2022.** Porcine FSH dose affects the efficiency of *in vivo* embryo production in Santa Inês sheep. *Anim Reprod* 19: e22094
18. **Robertson I, Nelson RE. 2010.** Certification and identification of embryos. In: *Manual of The International Embryo Transfer Society*. 4th ed. Champaign, USA: IETS. p 86-105.
19. **Taira A, Batista RITP, Santos JDR, Pinto PHN, Balaro MFA, do Espírito Santo CG, Brandão FZ. 2022.** Progestogen supplementation during superovulation leads to higher embryo viability and TGFB1 gene expression in sheep. *Anim Reprod Sci* 238: 106938. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106938