

## Evaluación de un protocolo de superovulación para transferencia de embriones en ovejas Criollas de la Montaña de Guerrero

Evaluation of a superovulation protocol for embryo transfer in Creole ewes from the Guerrero Mountain

Martínez-Rojero Rubén\* [rubendarior1@prodigy.net.mx](mailto:rubendarior1@prodigy.net.mx), Mejía-Villanueva Octavio [omejia@unam.mx](mailto:omejia@unam.mx), Zarco-Quintero Luis [lazq@servidor.unam](mailto:lazq@servidor.unam), Mastache-Lagunas Agustín [gama32@starmedia.com](mailto:gama32@starmedia.com), Reyna-Santamaría Lorenzo [santamaria53@yahoo.com.mx](mailto:santamaria53@yahoo.com.mx)

Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. México. Autor responsable y de correspondencia: Martínez-Rojero Rubén. Av. Vicente Guerrero No. 81 primer piso, Centro, Iguala; Guerrero, México. CP 40000.

### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la respuesta de ovejas Criollas de la Montaña del estado de Guerrero a un protocolo de Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones (OMTE), se llevó a cabo la presente investigación en el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO), ubicado en Cocula, Gro., a 18° 15' 26" latitud norte. Se utilizaron seis ovejas Criollas como donadoras y 18 Pelibuey como receptoras. Las Receptoras recibieron por 11 d un dispositivo intravaginal con Progesterona, más una inyección intramuscular de 200 UI de eCG al momento de removerlo. Las donadoras recibieron un protocolo de superovulación que consistió en la administración intramuscular 200 mg de FSH-P en dosis decrecientes, iniciando 4 d antes de retirar el dispositivo. La recolección de embriones se llevó a cabo el día 6 después del último apareamiento. Se utilizó estadística descriptiva. La tasa de superovulación, el número de cuerpos lúteos y de embriones transferibles recolectados en las borregas donadoras fue de 50 %,  $4.3 \pm 5.2$ ,  $2.2 \pm 2.5$ , respectivamente, mientras que la tasa de fertilidad registrada en las hembras receptoras fue de 50 %. La respuesta de las donadoras al protocolo hormonal evaluado para superovulación es baja y variable, mientras que la tasa de fertilidad registrada en las receptoras es moderada.

**Palabras clave:** Superovulación, transferencia, embriones, ovejas Criollas.

### ABSTRACT

In order to evaluate the response of Creole ewes from the Mountain of Guerrero state to a Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) protocol, a study was carried out at the Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO), located in Cocula, Gro., at 18° 15' 26" North Latitude. Six Creole ewes were utilized as donors and 18 Pelibuey sheep as recipients. Receivers had for 11 d an intravaginal device containing progesterone, plus an intramuscular injection of 200 IU of eCG when the device was removed. Donors received a superovulation protocol that consisted of the intramuscular administration of 200 mg of FHS-P in decreased doses that started 4 d before the device removal. Embryo collection was carried out 6 days after the last mating. Descriptive statistics were used. Superovulation rate, number of corpora lutea and of transferable embryos collected from donor ewes were 50 %,  $4.3 \pm 5.2$ ,  $2.2 \pm 2.5$ , respectively, whereas that the fertility rate registered in the recipient sheep was 50%: The response of donors to hormonal protocol evaluated for superovulation was low and variable, while in the recipient the fertility rate was moderated.

**Key words.** Superovulation, transfer, embryos, Creole ewes.

## INTRODUCCIÓN

En el México prehispánico no existían especies domésticas para el trabajo ni para producir alimentos de origen animal, por lo que los conquistadores trajeron equinos, rumiantes y cerdos; y en el caso de los ovinos, las primeras razas que llegaron a México eran de tipo lanar, como fueron: Merino, Churras y Lachas (Medrano, 2000). En la región de la Montaña del estado de Guerrero aún se encuentran en varios municipios indígenas, pequeños rebaños de ovinos Criollos lanados, principalmente de color negro y blanco; cuyos machos generalmente presentan policerismo (más de dos cuernos) y son conocidos como borregos “Obispo”, “Diablo” o de “Cuatro Cuernos”. Estos ovinos prácticamente se han mantenido aislados desde que fueron introducidos por los españoles durante la conquista, sin mezclarse con otras razas que llegaron posteriormente (Martínez, 2016). No sería remoto, por tanto, que ante la falta de estudios serios, consistentes y sistemáticos para caracterizarlo, en cierto momento este genotipo pudiera desaparecer.

Debido a lo anterior, a partir de 2016 el CSAEGRO se ha abocado a realizar estudios *ex situ* de un rebaño de ovinos “Obispo”, comenzando por su caracterización faneróptica (Martínez *et al.*, 2016a), morfológica (Martínez *et al.*, 2016b) y zoométrica (Martínez *et al.*, 2016c) y que se ha continuado con la evaluación de su comportamiento productivo y reproductivo; considerando que la preservación de razas localmente adaptadas es una prioridad de los programas de biodiversidad (Quiroz *et al.*, 2007).

En este sentido la FAO (2007), señala que la implementación de técnicas de biotecnología de la reproducción, como congelación de semen y de embriones es fundamental para la persistencia del germoplasma de los animales Criollos y Autóctonos, que representan un recurso por su adaptación al medio y que constituyen un reservorio genético que puede ser de interés para la ovinocultura nacional. La implementación de la OMTE podría incrementar el potencial reproductivo de la oveja Criolla y permitiría conservar por tiempo indefinido su germoplasma en criopreservación en dependencias como el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG-INIFAP), que se ha establecido como una institución estratégica para el resguardo, investigación y manejo del germoplasma en México (Urbán-Duarte *et al.*, 2016).

Sin embargo, la eficiencia de un programa de OMTE depende de la recolección de un gran número de embriones viables por oveja donadora en respuesta a cada tratamiento superovulatorio exitoso (Bruno-Galarraga *et al.*, 2014). Considerando lo anterior, en este estudio se planteó el objetivo de evaluar la respuesta de ovejas

Criollas de la montaña de Guerrero a un protocolo de OMTE, que ha utilizado de manera rutinaria en diferentes razas de ovinos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó de agosto del 2016 a enero del 2017 en el CSAEGRO, ubicado en Cocula, Guerrero, México. a 18° 15' 26" latitud norte y 99° 39' 26" longitud oeste, con una precipitación pluvial media anual de 750 mm, a 640 msnm y clima AW<sub>0</sub>(w)(i)g (García, 1987). Se utilizaron seis ovejas Criollas como donadoras y 18 ovejas Pelibuey como receptoras (proporción de tres receptoras por donadora); además de dos machos Criollos que previamente fueron sometidos a una evaluación de su calidad seminal.

Los animales sexualmente maduros, estaban clínicamente sanos, en buena condición corporal y se encontraban ciclando normalmente al momento de iniciar el estudio. Se seleccionaron como donadoras hembras que tenían tres años de edad y con al menos tres meses de haber parido, y con un peso y una alzada a la cruz sobre el promedio del rebaño. El rebaño que fue desparasitado, se manejó en un sistema semintensivo con las hembras separadas de los machos, manteniéndose en pastoreo durante la mañana y parte de la tarde (08:00 a 14:00 h) en potreros con grama nativa. Por el resto de día y durante la noche, las ovejas permanecieron en estabulación dentro de corrales techados, en donde recibieron ensilado de maíz y 300 g/animal/día de concentrado comercial (12% PC y 3500 Kcal ED).

Las ovejas receptoras recibieron por 11 d (08:00 h) un dispositivo intravaginal con Progesterona (CIDR<sup>®</sup>; 330 Sheep & Goat Insert) más 200 UI de eCG (Folligón<sup>®</sup>) vía intramuscular al momento de retirar el dispositivo, para posteriormente ser sometidas a detección de estros durante 15 minutos tres veces al día (08:00 h, 14:00 y 20:00 h), durante las siguientes 48 h después de la remoción del CIDR, utilizando machos receladores provistos de un mandil. Las donadoras recibieron un protocolo de superovulación que ha sido utilizado en ovejas de diferentes razas para programas de OMTE (Herrera *et al.*, 2008; Urbán-Duarte *et al.*, 2016). Éste consistió en la aplicación de un CIDR en el mismo día que en las receptoras, más la administración intramuscular de 10 ml (200 mg) de FSH-P (Folltropin<sup>®</sup>) en dosis decrecientes a partir de noveno día después de haber sido insertado el dispositivo vaginal, el cual fue retirado de las hembras el día 11 (08:00 h) para someterlas a detecciones de estros por 48 h y servidas por sementales Criollos, el mayor número de veces posible mientras presentaron celo. Se consideró la monta a las 24 horas de haber sido retirado el CIDR, como el día cero del ciclo.

La recolección de embriones se llevó a cabo el día 6 después del último día de los apareamientos, por medio de laparoscopia medio-ventral, utilizando una pinza de Babcock. La calidad de los cuerpos lúteos se evaluó en base a su tamaño y su color, para determinar si eran normales o si se encontraban en regresión prematura, y aquellas ovejas que presentaron tres cuerpos lúteos o menos no se consideraron superovuladas; y en estos casos los cuernos uterinos no fueron lavados. Una vez que se determinó qué hembra respondió a la superovulación, se procedió a lavar cada cuerno uterino por separado a uno de los cuernos uterinos, mediante una punción con un catéter intravenoso (14G x 5½). A través de otro angiocatéter intravenoso (18G x 1½) que fue insertado en la punta del cuerno uterino; se administraron 60 ml del medio de lavado Complete Flush (Vigro®) que se recolectó con la sonda de Foley en un filtro concentrador EmCon. Este mismo procedimiento se repitió en el otro cuerno uterino. Después de haber sido recolectados los embriones fueron mantenidos a temperatura ambiente, protegidos de la luz en cajas de Petri cuadriculadas, conservados y lavados mediante el paso consecutivo de una caja de Petri a otra en solución Holding (Singro®) y se clasificaron utilizando un microscopio estereoscópico, de acuerdo a su calidad morfológica en condiciones de: excelentes, buenos, regulares o malos; transfiriéndose únicamente los clasificados como excelentes y buenos en estado de mórula o de blastocisto (Bruno-Galarraga *et al.*, 2014). La transferencia de los embriones se realizó en fresco, colocando un embrión en uno de los cuernos uterinos de las receptoras, con el apoyo de un laparoscopio y una pinza Babcock.

Las variables medidas fueron: las tasas de presentación de estros y de superovulación, así como el número de cuerpos lúteos y de embriones transferibles en las donadoras y la tasa de fertilidad en ovejas receptoras. Se utilizó estadística descriptiva.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 100% de las ovejas donadoras presentaron estro, pero la tasa de superovulación, el número de cuerpos lúteos y el número de embriones transferibles recolectados en respuesta al protocolo de superovulación al que fueron sometidas, fue de 50.0%,  $4.3 \pm 5.2$ ,  $2.2 \pm 2.5$  y 50.0%, respectivamente. La tasa de preñez registrada en las hembras receptoras fue de 50%.

La tasa de presentación del estro del 100% encontrado en este estudio en las donadoras, es similar al encontrado por Urbán-Duarte *et al.* (2016) en la borrega Chiapas; sin embargo, la tasa de superovulación de 50.0%, es menor a la informada para esta variable por Aké-López *et al.* (2003), quienes encontraron que un 70% de ovejas Pelibuey respondió satisfactoriamente al tratamiento superovulatorio con FSH. Al respecto, varios autores advierten que siempre se debe tener presente que un porcentaje de hembras no responderá al tratamiento hormonal de superovulación múltiple (Cognie, 1994; Bruno-Galarraga *et al.*, 2014).

Los valores registrados en este estudio para el número de cuerpos lúteos ( $4.3 \pm 5.2$ ; rango 0 a 12) y para el número de embriones transferibles ( $2.2 \pm 2.5$ ; rango 0 a 5.0), muestran que existió variación entre individuos en la respuesta para la superovulación; lo que es congruente con lo informado en la literatura consultada. Bruno-Galarraga *et al.* (2014) apuntan que desde un inicio las investigaciones en OMTE han estado orientadas consistentemente al estudio en la reducción de la alta variabilidad reproductiva, especialmente en lo que se refiere a la respuesta individual a los tratamientos evaluados para la ovulación múltiple, fertilización y a factores embrionarios en las donadoras y maternos en las ovejas receptoras. Estos autores mencionan que los diversos protocolos hormonales utilizados para inducir la ovulación múltiple, no han podido disminuir la amplia variabilidad que se presenta en el número de ovulaciones entre animales, debido a factores genéticos, nutricionales o estacionales; y consideran que el factor intrínseco de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple. La variabilidad individual a la respuesta hormonal en la oveja está condicionada por el estado fisiológico del ovario y por el número de pequeños folículos (1 a 2 mm) en el momento de comenzar el tratamiento hormonal con FSH.

Sobre la base de estudios realizados mediante ecografía o endoscopía ovárica, se ha evidenciado el efecto negativo de la presencia de folículos mayores a 6 mm de diámetro, y la ventaja de la presencia de folículos de 2 a 3 mm de diámetro; y se debe tener presente la alta variabilidad individual en la respuesta ovulatoria múltiple, que está correlacionada positivamente ( $r = 0.7$ ) con el número de folículos presentes al momento de iniciar el tratamiento hormonal (González-Bulnes *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2010; Bruno-Galarraga *et al.*, 2014).

En este estudio en particular y aunque se trataba de ovejas Criollas ciclando, se desconocía la cantidad de folículos presentes en el ovario, así como el tamaño de los mismos al momento en el que se iniciaron los tratamientos hormonales de superovulación.

Como se mencionó previamente, el genotipo de la oveja es otro factor que puede explicar la variación en la eficiencia de un programa de OMTE, presentándose en las razas más prolíficas una mayor respuesta a la ovulación múltiple, en el número de embriones transferibles y en la cantidad de crías nacidas (Cognie, 1999; Urbán-Duarte *et al.*, 2016). Se ha observado en el rebaño de ovejas Criollas de la montaña de Guerrero manejado en el CSAEGRO, que las hembras invariablemente tienen una sola cría por parto, por lo que se asume que su índice de prolificidad es bajo, y por lo tanto, esto pudiera haber tenido una repercusión directa en el bajo número de cuerpos lúteos y de embriones recolectados en este estudio, en respuesta al tratamiento hormonal. Urbán-Duarte *et al.* (2016) en la oveja Criolla Chiapas, registraron un número de cuerpos lúteos de  $13.16 \pm 1.8$ , promedio que es mayor al encontrado en el presente estudio, pero con un número similar de  $2.0 \pm 0.9$  de embriones transferibles. Valores

más altos para la respuesta ovulatoria, también han sido informados por otros autores. Bruno-Galarraga *et al.* (2014) en ovejas Merino superovuladas con FSHp obtuvieron  $9.7 \pm 2.8$  cuerpos lúteos y  $4.6 \pm 1.3$  embriones transferibles. Por su parte, Aké-López *et al.* (2003) observaron  $8.28 \pm 7.28$  cuerpos lúteos y  $6.28 \pm 4.79$  embriones transferibles y Herrera *et al.* (2008) en ovejas Pelibuey encontraron que el número de cuerpos lúteos y de embriones colectados fue de  $10.73 \pm 1.42$  y de  $3.09 \pm 1.36$ , respectivamente. Estos valores, aunque son superiores a los registrados en este ensayo, hecho en las ovejas "Obispo"; también presentaron variabilidad individual.

Finalmente, la tasa de fertilidad de 50 % registrada en este estudio en las ovejas receptoras, es cercana a la informada por Aké-López *et al.* (2003), quienes encontraron una tasa de 58% en ovejas Pelibuey; y mencionan que la mayoría de los porcentajes de preñez que se han obtenido en condiciones de campo, con frecuencia están por debajo del 50 %.

### CONCLUSIÓN

El porcentaje de ovejas Criollas que responde al protocolo hormonal evaluado es moderado, con valores para el número de cuerpos lúteos y de embriones transferibles menores a los informados en la literatura, exhibiendo un alto grado de variación entre individuos. La tasa de fertilidad en las receptoras es moderada, pero se encuentra dentro de lo esperado.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Sectorial para la Educación SEP-CONACYT. Los resultados presentados en este artículo forman parte del Proyecto No 176388 convocatoria CB-2012-01, titulado "**Caracterización Morfo-estructural, Reproductiva y Genética del Borrego de Cuatro Cuernos de la Montaña de Guerrero**" que es financiado por el Fondo

### LITERATURA CITADA

AKÉ-LÓPEZ JR, Heredia AM, Alfaro GM, Centurión CF, Rojas RO. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de oveja Pelibuey. *Vet. Méx.* 2003; 34: 225-233.

BRUNO-GALARRAGA MM, Cueto M, Gibbons AE, Pereyra-Bonnet F, Catalano R, González-Bulnes. Repeatability od superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research.* 2014 <http://dx.doi.org/10.106/j.smallrumres.2014.04.002>.

COGNIE Y. State of the art inthe sheep-goats embryo transfer. *Theriogenology.* 1999; 51: 171-188.

FAO. The state of the world's animal genetic resources for food and agricultura. Ed. Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling, Roma, Italy. 2007; 511 p

GARCÍA ME. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para adaptarlo a las Condiciones de la República Mexicana, Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. 1973.

GONZALEZ-BULNES A, Baird DT, Campbell K, Cocero MJ, García-García RM, Inskoop EK, López-Sebastián A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souza CJH, Veiga-López A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004; 16: 421–435.

HERRERA C, Aké LR, Ku VJC, Williams GL, Quintal FJK. Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos polinsaturados. *Téc. Pecu. Méx.* 2008; 46: 107-117.

MARTÍNEZ RRD. El borrego “Obispo” de la Montaña de Guerrero. *Elementos.* 2016; 103: 35-39.

MARTÍNEZ-ROJERO RD, Ulloa-Arvizu R, Reyna SL, Mastache LAA, Zarco QLA. Estudio faneróptico de ovinos Criollos de la Montaña de Guerrero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas.* 2016a; 3 (Supl., 2): 30-33.

MARTÍNEZ-ROJERO RD, Mastache LAA, Ulloa-Arvizu R, Reyna-Santamaría L, Zarco-Quintero LA, Mejía-Villanueva VO. Caracterización morfológica de dos variedades de ovinos Criollos de la Montaña de Guerrero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas.* 2016b; 3 (Supl., 2): 34-36.

MARTÍNEZ-ROJERO RD, Ulloa-Arvizu R, Mastache LAA, Zarco QLA, Mejía VVO, Reyna SL. Caracterización zoométrica de un rebaño de ovinos Criollos (“Obispo”) de la Montaña de Guerrero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas.* 2016c; 3 (Supl., 2): 37-39.

MEDRANO JA. Recursos animales locales del centro de México. *Arch. Zootec.* 2000; 49: 385-390.

MENCHACA A, Vilarino M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010; 22: 113–118.

QUIROZ J, Martínez A, Landi V, Zaragoza LM, Perezgrovas RG, Vega JP. Relación genética de la raza ovina de Chiapas con algunas razas ovinas españolas. *Archivos de Zootecnia.* 2007; 56: 441-447.

URBÁN-DUARTE D, Méndez-Gómez AC, Álvarez-Gallardo H, Pérez-Reynoso S, Gordillo-Páez L, Pedraza-Villagómez JP, De la Torre-Sánchez JF. *Revista Mexicana de Agroecosistemas.* 2016; 3 (Supl., 2): 119-122.