

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

INCIDENCIA DE LOS PROTOCOLOS SIMPLIFICADOS
DE SUPEROVULACIÓN Y DE LA PRESENCIA DE LA
MELATONINA EN LOS MEDIOS *IN VITRO* SOBRE LA
PRODUCCIÓN Y VIABILIDAD DE EMBRIONES
OVINOS

Tesis de Máster
Valencia, Octubre 2009

Mehdi Ait Amer Meziane

Director:

Fernando Forcada Miranda

Codirector:

José Alfonso Abecia Martínez

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mis tutores Doctores Fernando Forcada Miranda y Alfonso Abecia Martínez por aceptarme e incorporarme en su grupo de investigación, y por toda la ayuda y los conocimientos adquiridos durante mi estancia.
- ✓ Al INIA (Proyecto RZ2008-00002), por llevar adelante la financiación de este trabajo.
- ✓ A la Unidad de Producción Animal de la Escuela Universitaria de Ingenierías Agrarias de Soria y a la Excma. Diputación Provincial de Soria por su colaboración con la Unidad de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza en el proyecto INIA RZ2008-00002 y en la presente Tesis Máster. Los Dres. Begoña Asenjo, José Luis Calvo, José ángel Miguel y Jesús Ciria han sido importantes en la concepción y desarrollo de todo el trabajo experimental.
- ✓ A la Unidad de Gonadotrofinas de la estación de Fisiología de la Reproducción de Mamíferos Domésticos del INRA (Nouzilly, France). Especialmente a los doctores Marie Christine Maurel y Thomas Boulo.
- ✓ Al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza por haberme otorgado la beca para concretizar este máster.
- ✓ Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Agrario de Argelia por haberme dado la oportunidad de terminar mis estudios. Y un especial agradecimiento al director del Centro Nacional de Inseminación Artificial y Mejora Genética de Argel.
- ✓ A la Doctora Adriana Casao Gascón y futuros doctores argentinos Andrés Buffoni y María Isabel Vázquez por toda la ayuda, la disponibilidad y consejos que me aportaron en este máster.
- ✓ A mis compañeros del máster y a los que conocí aquí en España.
- ✓ En especial a mis padres y mis hermanos por su apoyo, motivación, paciencia y su ánimo. Gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	V
RESUMÉ	IX
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
I. CICLO SEXUAL Y FOLICULOGÉNESIS.....	7
1. Ciclo sexual.....	7
2. Folliculogénesis	7
2.1. Reclutamiento.....	8
2.2. Folículos con respuesta a las gonadotropinas.....	8
2.3. Folículos dependientes de gonadotropinas	9
2.4. Folículos ovulatorios:	9
2.5. Ondas de desarrollo folicular.	10
II. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VIVO</i>	13
1. Tratamiento de Sincronización:.....	13
1.1. Tratamientos con progestágenos:	13
1.2. Tratamientos con prostaglandinas:	15
2. Estimulación ovárica:	16
2.1. La Gonadotropina Coriónica Equina (eCG):	17
2.2. La Hormona Folículo Estimulante (FSH):	19
3. Simplificación de los tratamientos de superovulación:	22
3.1. Aplicación única de FSH.....	22
3.2. Aplicación conjunta de FSH+eCG	24
4. Fecundación de las hembras:	26
5. Recuperación de embriones:	28
6. Posibilidades de mejora de la eficacia de las técnicas MOET	30
III. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> :	30
1. Obtención de oocitos:	31
1.1. Oocitos de donantes vivas:.....	31
1.2. Ovarios de hembras de matadero	33
2. Maduración <i>in vitro</i>	35
2.1. Medios de maduración.....	37
3. Fecundación <i>in vitro</i>	41
3.1. Selección de espermatozoides y capacitación:	42
3.2. Capacitación y sustancias capacitantes:	43
3.3. Anomalías de la FIV:	44
4. Cultivo embrionario <i>in vitro</i>	45
5. Uso de la melatonina en los procedimientos de producción <i>in vitro</i> :.....	47

EXPERIMENTO I	51
I. MATERIALES Y METODOS.....	51
1. Material animal:.....	51
2. Sincronización y superovulación:.....	52
3. Recuperación de embriones:	53
4. La vitrificación:	58
5. Descongelación:	60
6. Evaluación de la viabilidad <i>in vitro</i> :	61
7. Análisis de Progesterona:	64
8. Análisis de los anticuerpos anti-eCG:	64
9. Parámetros estudiados y análisis estadístico:	65
II. RESULTADOS	67
1. Respuesta a la superovulación y producción de embriones:	67
2. Efectos del momento del ciclo sexual y de la ciclicidad sobre la respuesta a la superovulación y la producción embrionaria:.....	68
3. Efecto de la respuesta inmunológica de los anticuerpos anti-eCG sobre la respuesta a la superovulación y la producción embrionaria:.....	69
4. Viabilidad y calidad de los embriones post descongelación:.....	70
III. DISCUSIÓN.....	77
IV. CONCLUSIONES	84
EXPERIMENTO II	87
I. MATERIALES Y METODOS.....	87
1. Material animal:.....	87
2. Reactivos y medios:.....	88
3. Extracción de oocitos:	89
4. Maduración <i>in vitro</i> :.....	91
5. Fecundación <i>in vitro</i> :.....	92
6. Cultivo <i>in vitro</i> :	93
7. Vitrificación y viabilidad tras la descongelación:	94
8. Parámetros estudiados:	94
9. Análisis estadístico:.....	95
II. RESULTADOS	96
1. Maduración, fecundación y blastocistos obtenidos tras 8 días de cultivo <i>in vitro</i> :	96
2. Viabilidad y calidad de los embriones post descongelación:.....	96
III. DISCUSIÓN.....	101
IV. CONCLUSIONES	106
CONCLUSIONES GENERALES	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1: 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 (adaptado de Forcada et al., 2000)	20
Tabla 2: Respuesta ovárica y producción embrionaria en ovejas Corriedale tratadas con 176 NIH-FSH-S1 unidades de oFSH administrada en una única inyección en un vehículo PVP (oFSH+PVP), en 4 dosis iguales o en 8 dosis iguales (adaptado de Simonetti et al. 2008)	24
Tabla 3: Respuesta ovárica y producción embrionaria en ovejas Corriedale tratadas con 176 (grupo T1) o con 132 (grupo T2) NIH-FSH-S1 unidades de oFSH con 500 UI de eCG administrada en una única inyección (adaptado de Simonetti et al. 2008)	26
Tabla 4: Estadios de desarrollo embrionario previo a la implantación en ganado ovino. Adaptado de Witenberger-Torres y Sevellec (1987).	28
Tabla 5: Respuesta ovárica y producción de embriones de ovejas Ojalada de Soria tras el primer, segundo o el tercer tratamiento con un protocolo de superovulación de 6 inyecciones decrecientes con un total de 280 UI de FSH (Grupo D) (medias± E. S.)	71
Tabla 6: Respuesta ovárica y producción de embriones de ovejas Ojalada de Soria tras el primer, segundo o el tercer tratamiento con un protocolo de superovulación simplificado con un total de 210 UI de FSH + 500 UI de eCG (Grupo S) (medias± E. S.)	72
Tabla 7: Efecto del estadio del ciclo previo al tratamiento hormonal sobre la producción embrionaria en ovejas Ojaladas de Soria tras tres recuperaciones consecutivas (medias± E. S.)	73
Tabla 8: Efecto de las concentraciones de anticuerpos anti-eCG sobre la producción embrionaria de ovejas ojaladas de Soria tras la primera, segunda y tercera recuperación. Los niveles de anticuerpos expresados con B = concentraciones bajas ≤ 3µg/ml y A = concentraciones altas > 3µg/ml (medias± E. S.).....	74
Tabla 9: Evaluación de la tasa reexpansión de los dos grupos tras la descongelación.....	76

Tabla 10: Números de células (\pm E. S.) por blastocisto obtenidas por tinción de HOECHST y del números de células con reacción al peróxido de hidrogeno evidenciadas por la tinción de DCHFDA en blastocistos producidos in vivo de ovejas Ojaladas Sorianas.....	76
Tabla 11: Maduración, división embrionaria a las 36 horas de la fecundación, y porcentaje de blastocitos obtenidos tras 8 días de cultivo de oocitos obtenidos de ovarios de ovejas de matadero, madurados y cultivados con distintas dosis de melatonina. Las diferentes letras (a, b) en superíndice en columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).	98
Tabla 12: Porcentaje de blastocistos producidos in vitro tras 6, 7 y 8 días de cultivo.....	99
Tabla 13: Evaluación de la tasa reexpansión de los 3 grupos de melatonina y el grupo control tras la descongelación.....	100
Tabla 14: Números de células (\pm E.S.) por blastocisto obtenidas por tinción de Hoechst y números de células con reacción al peróxido de hidrogeno por la tinción de DCHFDA en blastocistos producidos in vitro en los tres grupos de melatonina (10-6, 10-8 y 10-10 M) y en el grupo control.....	100

Figuras

Figura 1: Representación esquemática del crecimiento del oocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod et al., 1999)	10
Figura 2: Representación esquemática del desarrollo folicular y los perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja (Simonetti, 2008).....	12
Figura 3: Colocación del animal en la mesa de sujeción en decúbito dorsal.....	54
Figura 4: Exteriorización del útero y recuento de los cuerpos lúteos.....	55
Figura 5: Inserción de la sonda Foley para lavado (a nivel del ligamento intercornual).....	56
Figura 6: Ampolla de la sonda Foley inflada para la obstrucción de la luz uterina.....	56
Figura 7: Inserción de la sonda Foley para lavado (a nivel da la unión útero-tubárica).....	57
Figura 8: inyección del medio de lavado en la luz del cuerno uterino.....	57
Figura 9: Representación esquemática de una pajuela de vitrificación.	59
Figura 10: Blastocisto expandido como los utilizados en el presente experimento. A, antes de la vitrificación; B, justo tras la vitrificación y descongelación; C, completamente reexpandido tras el cultivo (adaptado de Leoni et al., 2007).	61
Figura 11: Blastocisto teñido con HOECHST (microscopio de fluorescencia).....	63
Figura 12: Blastocisto teñido con DCHFDA (microscopio de fluorescencia)	63
Figura 13: Evolución de las concentraciones plasmáticas de los anticuerpos anti-eCG a los largo de las recuperaciones	75
Figura 14: Obtención de oocitos por punción del ovario.....	89

Figura 15: Obtención de oocitos por Slicing del ovario.....	90
Figura 16: Clasificación de los oocitos (Buenos, Normales y Malos).	91
Figura 17: Representación de la selección espermática por Swim-Up. Figura (a): Antes del Swim-Up (Semen y medio SOF). Figura (b): 15 minutos después del inicio del Swim-Up (se ve claramente la fracción espermática seleccionada).	93

Abreviaturas

- μg = Microgramo
- μl = Microlitro
- ANOVA = Análisis de varianza
- BSA = Albumina serica bovina
- CL = Cuerpo luteo
- CO_2 = Dióxido de carbono
- COCs = Complejo cúmulo-Oocito
- DCHFDA = Dichlorodihydrofluorescein Diacetato
- DMSO = Dimetil sulfóxido
- E2 = Estradiol
- eCG = Gonadotrofina Corionica equina
- EGF = Factor de crecimiento epidérmico
- EGTA = Ácido tetra acético de etilenglicol
- ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- FCS = Suero fetal bovino
- FGA = acetato de fluorogestona
- FIV = Fecundacion *in vitro*
- FSH = Hormona folículoestimulante
- FSHp = Hormona folículoestimulante porcina
- GnRH = Hormona liberadora de gonadotrofinas
- GSH: Glutati3n reducido
- H_2O_2 = peróxido de hidrógeno
- IGF-I = Factor de crecimiento de tipo insulina tipo I

- LH = Hormona luteinizante
- LOPU = Laparoscopic Ovum Pick-Up
- M = Molar
- MAP = acetato de medroxiprogesterona
- mg = Miligramo
- min = Minuto
- MIV = Maduración *in vitro*
- ml = Mililitro
- mM = Milimolar
- MOET = Superovulacion y transferencia de embriones
- N₂ = Nitrogeno
- NaHCO₃ = Bicarbonato de sodio
- O₂ = Oxigeno
- PBS = Phosphate Buffered Saline
- PgF₂α = Prostaglandina F₂α
- PIV = Produccion *in vitro*
- PMSG = Gonadotrofina del suero de yegua gestante
- PVA = alcohol polivinilo
- RIA = Radioinmunoensayo
- SOF = fluido oviductal sintético
- TCM-199 = Tissue culture medium 199
- TPNa = Sodio fosfato monobásico
- UI = Unidades Internacionales
- vs. = Versus

RESUMENES

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar las posibilidades de mejorar la eficacia de los procedimientos de obtención de embriones ovinos *in vivo* e *in vitro*. Se realizaron 2 experimentos distintos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

En el primer experimento se evaluó la eficacia de un protocolo simplificado de superovulación (una única inyección de FSH+eCG) y de su aplicación repetida en la misma hembra sobre la producción y la viabilidad de los embriones, tomando como referencia los precedentes de un protocolo tradicional basado en inyecciones repetidas y decrecientes de FSH. El ensayo se desarrolló entre los meses de septiembre de 2008 y marzo de 2009. Se utilizaron 38 ovejas adultas ($7,87 \pm 0,34$ años de edad y con $5,77 \pm 0,28$ partos anteriores), de raza Ojalada Soriana. Los celos se sincronizaron en todas las ovejas con esponjas intravaginales con 30mg de FGA durante 14 días. La mitad de las ovejas ($n = 19$) recibieron un tratamiento superovulatorio simplificado (una inyección combinada de eCG+FSH-p (500 UI de eCG+ 210 UI de FSH-p) 24 horas antes de la retirada de la esponja), y la otra mitad ($n = 19$) un tratamiento de varias inyecciones de FSH-p (6 dosis decrecientes de FSH-p (280 UI) aplicadas cada 12 horas e iniciando el tratamiento 48 horas antes de la retirada de la esponja). Los embriones fueron recuperados el día 8 tras la retirada de la esponja mediante laparotomía y lavado uterino. Se evaluó la salida en celo, tasa de ovulación y el número y calidad de los embriones recuperados, que posteriormente fueron vitrificados para analizar luego la viabilidad *in vitro* de los mismos tras la descongelación (porcentajes de reexpansión y tinción celular). El mismo protocolo se repitió en otras dos ocasiones, con un intervalo de unos 45 días entre dos tratamientos consecutivos. Además, en el grupo simplificado se evaluó la relación existente entre el nivel de anticuerpos anti-eCG previos al tratamiento de superovulación y la producción embrionaria.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre los dos tratamientos de superovulación en cuanto a la tasa de ovulación y la producción de embriones viables y congelables. Así, en el conjunto de las 3 recuperaciones se obtuvieron un

total de 14,1 embriones viables y 12 congelables por oveja el grupo decreciente, frente a los 13,7 viables y 11,4 congelables en el grupo simplificado. No obstante, en el grupo simplificado se detectó una salida en celo significativamente anterior a la del grupo decreciente ($25,2 \pm 0,8$ vs $30,1 \pm 1,0$ horas; $P < 0,05$). Por su parte, en el análisis global se evidenció un efecto perjudicial del número de recuperación sobre la mayoría de los parámetros estudiados, desde la tasa de ovulación hasta el número de embriones recuperados, fecundados, viables y congelables ($P < 0,01$). Así, los citados parámetros fueron significativamente inferiores en la segunda y tercera recuperaciones. En conjunto, no se detectaron diferencias de viabilidad tras la descongelación entre los embriones procedentes de ambos tratamientos (60% de reexpansión y 228 células por blastocisto en el decreciente frente al 53% de reexpansión y 157 células en el simplificado).

Finalmente y por lo que a los niveles de anticuerpos anti-eCG previos al tratamiento simplificado se refiere, los resultados del presente experimento muestran claramente que unos niveles elevados de anticuerpos se asociaron con una reducción significativa de la tasa de fecundación en las tres recuperaciones, de manera que en la segunda y tercera dicha reducción afectó también a las tasas de viabilidad y de congelabilidad.

En conjunto, los resultados del primer experimento permiten concluir que el protocolo simplificado de superovulación propuesto parece ser una buena alternativa a los tratamientos de varias inyecciones de FSH en términos de embriones producidos y viabilidad de estos mismos tras la descongelación, aunque estudios subsiguientes parecen ser necesarios para evaluar la incidencia de los niveles de anticuerpos anti-eCG sobre la producción de embriones tras la aplicación repetida de tales protocolos simplificados

El objetivo del segundo experimento fue evaluar la eficacia de la presencia de melatonina en los medios sobre la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de embriones ovinos obtenidos de ovarios recogidos de ovejas de matadero, con la finalidad de determinar si la hormona pineal puede mejorar la producción de blastocistos *in vitro* y su viabilidad tras la descongelación. Para ello, se obtuvieron ovarios de ovejas de matadero como fuente de oocitos, que fueron divididos en

cuatro grupos, 3 de ellos puestos a madurar con diferentes concentraciones de melatonina (10^{-6} M, 10^{-8} M y 10^{-10} M), actuando el cuarto como grupo control. Una vez maduros, los oocitos fueron fecundados con semen fresco de morueco sometido a un proceso de *swim-up*, de forma que los medios de fecundación y de ulterior cultivo de los oocitos madurados con melatonina contenían a las mismas concentraciones. El cultivo de embriones se mantuvo durante 8 días, y los embriones se evaluaron los días 6, 7 y 8 para determinar su estadio de desarrollo. Los blastocistos obtenidos fueron vitrificados, de manera que posteriormente se evaluó su viabilidad post descongelación.

Los resultados obtenidos durante los procedimientos *in vitro* no mostraron diferencias significativas en la maduración (75.3%, 74.5%, 72.2% y 73.1% los grupos 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M melatonina y el grupo control, respectivamente) ni en la tasa de división (72.8%, 69.6%, 68.7% y 69.7% en los grupos 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M melatonina y el grupo control, respectivamente). Sin embargo, la melatonina en el medio de cultivo tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo embrionario, siendo en particular superior el porcentaje de blastocistos en el grupo 10^{-8} M con respecto al obtenido en el grupo control (54,1% vs. 44,6%; $P=0,07$). Los resultados de vitrificación mostraron que el grupo con la menor concentración de melatonina (10^{-10} M) de melatonina tuvo la mayor tasa de reexpansión, próxima al 30% y significativamente diferente de los otros grupos, tres veces superior a la obtenida en los otros dos grupos de melatonina el doble que la obtenida en el grupo control (29,2% vs. 9,4% 10,5% y 13,5% en los grupos 10^{-6} M, 10^{-8} M y el grupo control; $P<0,05$).

En conclusión, los resultados del segundo ensayo muestran que la adición de la melatonina a dosis bajas a los medios utilizados para la producción *in vitro* de embriones ovinos, puede mejorar el rendimiento en producción de blastocistos y muy especialmente la viabilidad embrionaria tras la descongelación en el caso de los medios con la menor concentración de melatonina.

ABSTRACT

The main objective of this study was to investigate the possibilities of improving the effectiveness of the procedures for obtaining ovine embryos both in vivo and in vitro. Two experiments were conducted at the facilities of the Experimental Farm of the University of Zaragoza.

In the first experiment, the effectiveness of a simplified superovulation protocol (a single FSH+eCG injection) and its repeated application in the same female was evaluated based on the production and viability of embryos, compared with the results obtained from traditional protocols based on repeated injections. This experiment was carried out between September 2008 and March 2009, using 38 adult Ojalada ewes (7.87 ± 0.34 years old and 5.77 ± 0.28 previous births). Synchronization of estrus was conducted with intravaginal sponges containing 30 mg of FGA for 14 days. Half of the ewes ($n = 19$) received the simplified superovulatory treatment (a combined injection of eCG and FSH-p (500 IU FSH-p + (210 IU)) and the remaining animals ($n = 19$), a decreasing treatment of FSH-p (6 decreasing doses of FSH-p (280 IU) administered every 12 hours starting 48 hours before sponge withdrawal). The embryos were recovered on day 8 after sponge removal by laparotomy and uterine flushing. Moment of estrous onset, ovulation rate, and number and viability of recovered embryos were recorded. Embryos were subsequently vitrified for analyze their in vitro viability after thawing later (re-expansion percentage and cellular staining). The same protocol was repeated twice, with an interval of 45 days between two consecutive treatments. Moreover, in the simplified group the relationship between level of anti-eCG antibodies pre-treatment and embryo production was evaluated

The results showed no difference between the two superovulation treatments regarding ovulation rate and production of viable and freezable embryos. Thus, in the 3 recoveries a total of 14.1 viable and 12 freezable embryos per ewe were obtained in the decreasing group, compared to 13.7 viable and 11.4 freezable embryos in the simplified group. However, in the simplified group estrous started significantly earlier

than the decreasing group (25.2 ± 0.8 vs. 30.1 ± 1.0 h respectively, $P < 0.05$). Meanwhile, the overall analysis showed a detrimental effect of recovery number on most of the studied parameters, from ovulation rate to the number of recovered, fertilized, viable and freezable embryos ($P < 0.01$). Thus, these parameters were significantly lower in the second and third recoveries. In overall, no differences of viability after thawing were shown in both treatments (60% re-expansion rate and 228 cells per blastocysts in the decreased group compared with 53% re-expansion and 157 cells in the simplified group).

Finally, concerning the antibody anti-eCG levels before the simplified treatment, results of this experiment showed clearly that high levels of antibodies were associated with a significant reduction of fertilization rate in the 3 recoveries, so that in the second and third recoveries this reduction affected also viability and freezability rates.

In general, the results of this first experiment allowed to conclude that the proposed superovulation simplified protocol seems to be a good alternative to treatments involving several FSH injections, in terms of embryo production and viability after thawing, although subsequent studies appear to be necessary to assess the impact of the levels of anti-eCG antibodies on embryo production after repeated application of those simplified protocols.

The second experiment aimed to assess the efficiency of the presence of melatonin in the maturation media, fertilization and in vitro culture of ovine embryos derived from sheep ovaries collected from the slaughterhouse, in order to determine whether it improves in vitro blastocysts production and their viability after thawing. For that, oocytes from sheep ovaries collected at the slaughterhouse were divided into four groups, three of them were matured with different melatonin concentrations (10^{-6} M, 10^{-8} M and 10^{-10} M) and the remaining served as control group. Once matured, the oocytes were fertilized with fresh ram semen washed by the swim-up technique, so that all media of fertilization and in vitro culture of matured oocytes had the same initial melatonin concentration. The embryo culture was maintained for 8 days, and the embryos were evaluated on the 6th, 7th and 8th

day to determine their development. After that, those blastocysts obtained were vitrified, so that the thawing viability was assessed later.

The results obtained during the in vitro procedures showed no significant differences in maturation rates (75,3%, 74,5%, 72,2% and 73,1% for groups 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M of melatonin and the control group, respectively) or division rate (72,8%, 69,6%, 68,7% and 69,7% in groups 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M of melatonin and the control group, respectively). However, melatonin in the media had a positive effect on embryonic development, this percentage being higher especially in the group 10^{-8} M compared to the control group (54.1% vs. 44.6% in control group, $P = 0,07$). Vitrification results showed that the group with the lowest melatonin concentration (10^{-10} M) had the highest re-expansion rate, close to 30% and significantly different from the other groups, three times larger than the two groups of melatonin and twice the control group (29,2% vs. 9,4% 10,5% and 13,5 M in groups 10^{-6} , 10^{-8} M of melatonin and the control group, respectively, $P < 0.05$).

In conclusion, the results of the second experiment showed that addition of low doses of melatonin to the culture media for in vitro ovine embryo production can improve blastocyst production performance and especially after thawing embryo viability in the case of lower concentration of melatonin media.

RESUMÉ

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier les possibilités d'amélioration de l'efficacité des procédures d'obtention d'embryons ovins *in vivo* et *in vitro*. Pour cela, deux expérimentations distinctes ont été menées au niveau des installations de la Faculté Vétérinaire de l'Université de Saragosse.

Dans la première expérimentation, il a été évalué l'efficacité de protocoles simplifiés de la superovulation (une seule injection de FSH + ECG) et de son application répétée sur la même femelle sur la production et la viabilité des embryons, en comparaison avec ceux issus de protocoles traditionnels basés sur des injections répétées et décroissantes de FSH. L'expérimentation a été réalisée entre les mois de Septembre 2008 et Mars 2009, en utilisant 38 brebis adultes de la race Ojalada ($7,87 \pm 0,34$ ans d'âge avec $5,77 \pm 0,28$ agnelages antérieurs). La synchronisation des chaleurs a été réalisée sur toutes les brebis avec des éponges intra-vaginales imprégnées avec 30 mg de FGA durant 14 jours. La moitié des brebis ($n = 19$) a reçu un traitement de superovulation simplifié (une injection combinée de eCG et FSH-p (500 UI d'eCG+ 210 UI d'FSH-p) 24 heures avant le retrait d'éponge, et l'autre moitié ($n = 19$) un traitement décroissant d'FSH-p (6 doses décroissantes de FSH-p (280 UI)) appliquées toutes les 12 heures en commençant 48 heures avant le retrait d'éponge. Les embryons ont été récupérés le 8^{ème} jour après le retrait d'éponge par laparotomie et lavage utérin. Il a été évalué le moment de l'apparition des chaleurs, le taux d'ovulation et le nombre et la qualité des embryons récupérés qui, par la suite, ont été vitrifiés pour analyser leur viabilité *in vitro* après décongélation (pourcentages de réexpansion et coloration cellulaire). Le même protocole a été répété deux autres fois avec un intervalle de 45 jours entre deux traitements successifs. En outre, dans le groupe simplifié, il a été évalué la relation entre le niveau d'anticorps anti-eCG avant traitement et la production embryonnaire.

Les résultats obtenus n'ont pas montré de différences entre les deux traitements de superovulation en termes de taux d'ovulation et de production d'embryons viables et congelables. Ainsi, de l'ensemble des 3 récupérations il a été

obtenu un total de 14,1 embryons viables et 12 congelables par brebis dans le groupe décroissant contre 13,7 viables et 11,4 congelables dans le groupe simplifié. Toutefois, dans le groupe simplifié il a été observé une précocité significative dans l'apparition des chaleurs comparée au groupe décroissant ($25,2 \pm 0,8$ vs $30,1 \pm 1,0$ h dans le groupe décroissant, $P < 0,05$). Pour sa part, l'analyse globale a mis en évidence un effet préjudiciable du nombre de récupérations sur la majorité des paramètres étudiés depuis le taux d'ovulation jusqu'au nombre d'embryons récupérés, fécondés, viables et congelables ($P < 0,01$). Ainsi, les paramètres cités ont été significativement inférieurs dans les deuxième et troisième récupérations. Dans l'ensemble, il n'a pas été observé de différences de viabilité post décongélation entre les embryons issus des deux traitements (60% de réexpansion y 228 cellules par blastocyte dans le groupe décroissant contre 53% de reexpansion y 157 cellules dans le groupe simplifié).

Finalement, en ce qui concerne les niveaux plasmatiques d'anticorps anti-eCG, les résultats de ce travail ont clairement montré que les niveaux élevés d'anticorps sont associés à une réduction significative du taux de fécondation dans les trois récupérations, de telle manière que dans les deuxième et troisième ladite réduction a aussi affecté les taux de viabilité et de congélabilité.

En conclusion, les résultats de la première expérimentation permettent de conclure que le protocole simplifié de superovulation proposé paraît être une bonne alternative aux traitements décroissants de plusieurs injections de FSH en termes d'embryons produits ainsi que la viabilité de ces derniers après la décongélation, cependant des études ultérieures semblent nécessaires pour évaluer l'impact des niveaux d'anticorps anti-eCG sur la production embryonnaire après l'application répétée de ces protocoles simplifiés.

La deuxième expérience avait pour objectif d'évaluer l'efficacité de la présence de la mélatonine dans les milieux sur la maturation, la fécondation et la culture *in vitro* des embryons ovins récupérés des ovaires de brebis d'abattoir, afin de déterminer si l'hormone pinéale peut améliorer la production de blastocytes *in vitro* et leur viabilité après décongélation. A cet effet, les ovocytes obtenus des ovaires de brebis d'abattoir ont été divisés en quatre groupes dont 3 ont été mis en maturation

avec différentes concentrations de mélatonine (10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M) et la quatrième a été utilisé comme groupe témoin. Une fois mûres, les ovocytes ont été fécondés avec de la semence fraîche de béliers lavée par *Swim-up*, de sorte que les milieux de fécondation et de culture ultérieure de ces ovocytes mûres avec la mélatonine contiennent les mêmes concentrations. Les embryons ont été maintenus en culture durant 8 jours et ont été évalués au 6^{ème}, 7^{ème} et 8^{ème} jour afin de déterminer leur état de développement. Les blastocytes ainsi obtenus ont été vitrifiés, pour une évaluation ultérieure de leur viabilité post décongélation.

Les résultats obtenus lors de procédures *in vitro* n'ont pas montré de différences significatives dans la maturation (75.3%, 74.5%, 72.2% et 73.1% pour les groupes de 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M de mélatonine et le groupe témoin, respectivement), ni dans le taux de division (72.8%, 69.6%, 68.7% et 69.7% en 10^{-6} groupes, 10^{-8} , 10^{-10} M mélatonine et le groupe témoin, respectivement). Toutefois, la présence de mélatonine dans le milieu de culture a eu un effet positif sur le développement embryonnaire avec en particulier un pourcentage plus élevé de blastocytes dans le groupe de 10^{-8} M par rapport au groupe témoin (54,1% vs 44,6%, $P=0,07$). Les résultats de la vitrification ont montré que le groupe avec la plus faible concentration de mélatonine (10^{-10} M) a eu le taux plus élevé de réexpansion avoisinant 30% et significativement différent des autres groupes, trois fois plus élevé que ceux obtenus dans les deux autres groupes de mélatonine et le double de celui du groupe témoin (29,2% vs. 9,4% 10,5% et 13,5% pour les groupes de mélatonine 10^{-6} et 10^{-8} et le témoin respectivement; $P < 0,05$).

En conclusion, les résultats de la deuxième expérimentation montrent que l'addition de la mélatonine à faibles doses aux milieux de production *in vitro* d'embryons ovins, peut améliorer le rendement de production de blastocytes et particulièrement la viabilité embryonnaire post décongélation dans le cas des milieux à plus faibles concentrations de mélatonine.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Existen múltiples motivos en el ámbito de la producción animal para trabajar en la mejora de la producción y calidad de los embriones ovinos. Éstos se pueden obtener mediante protocolos *in vivo* o *in vitro*. En el primer caso, se pretende la recuperación de los embriones directamente de la hembra en el estadio adecuado. A la hora de obtener embriones de hembras valiosas, se trata de 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 de embriones *in vivo* va asociada siempre a la superovulación, intentando obtener una elevada tasa ovulatoria para maximizar el número de embriones recuperados, que posteriormente serán conservados y transferidos. Todas estas técnicas fueron agrupadas bajo el término MOET (Multiple ovulation and embryo transfer) por Nicholas y Smith (1983), de manera que su aplicación pretende desarrollar los siguientes objetivos:

- ✓ Mejora genética: Las técnicas MOET permiten mejorar la tasa reproductiva de las hembras donantes, lo que supone un aumento de la presión de selección ya sea por el incremento del número de descendientes por hembra o por una reducción del número de madres seleccionadas por generación para dar lugar a la generación siguiente de reproductoras. Del mismo modo, las técnicas MOET también permiten acortar el intervalo generacional cuando las donantes son hembras jóvenes.
- ✓ Introducción y difusión rápida de especies, razas o genotipos de interés: Es evidente que los costes de transporte, los requerimientos de cuarentena y los potenciales riesgos sanitarios son muy inferiores cuando se trabaja con embriones que directamente con animales vivos.
- ✓ Bioseguridad: En sus estadios iniciales de desarrollo, los embriones representan una barrera para la transmisión de agentes patógenos debido a

su zona pelúcida. Aunque algunos patógenos puedan quedar adheridos a ella, los sucesivos lavados a los que son sometidos los embriones tras su recuperación y los antibióticos habitualmente añadidos a los medios de manejo y de cultivo, hacen extremadamente difícil el riesgo de transmisión. Finalmente, los protocolos establecidos por los organismos nacionales e internacionales para el trabajo con embriones permiten garantizar la sanidad de todo el proceso.

- ✓ Conservación indefinida de especies, razas o individuos y mantenimiento de la diversidad genética: Es el objetivo fundamental perseguido en el presente estudio. Así, la conservación indefinida de embriones congelados permite preservar el material genético de una raza o agrupación ovina para su reactivación posterior o para el mantenimiento de la diversidad genética, algo fundamental en genotipos de reducido efectivo.
- ✓ Apoyo a otras técnicas reproductivas que suponen la manipulación de los propios embriones y a la propia investigación en fisiología de la reproducción.

Por su parte, la producción *in vitro* de embriones puede ser una alternativa para aplicar los continuos avances en el conocimiento de la biotecnología de la reproducción, en la producción y desarrollo embrionario desde el oocito, recuperado a su vez *in vivo* o a partir de ovarios de matadero. No hay que olvidar además que las técnicas *in vitro* permiten aumentar la capacidad de generar embriones a partir de hembras seleccionadas cuando las técnicas MOET no pueden ser desarrolladas en la práctica.

Es evidente que ambas técnicas tienen sus limitaciones. En el caso de los protocolos MOET, y particularizando en la especie ovina, destaca la necesidad de la vía quirúrgica para la recuperación embrionaria, lo que limita el número de procedimientos a desarrollar en una oveja. Además, hay que considerar la gran variabilidad de resultados obtenidos para protocolos de superovulación similares así como la influencia de la estación en la respuesta de las hembras a los tratamientos. También es evidente el elevado coste de mano de obra que requiere la aplicación de la mayoría de los tratamientos de superovulación habitualmente utilizados, que

consisten en 6-8 inyecciones de FSH a intervalos de 12 horas. Esto eleva notablemente el coste de cada embrión obtenido, puede propiciar la acumulación de errores en la dosificación y en suma limita la aplicación de las técnicas MOET a centros de investigación. De este modo, en los últimos años estamos asistiendo a un interés creciente del uso de protocolos simplificados de superovulación, que permitan la aplicación de la dosis de hormona necesaria en una única inyección. El optimizar dichos protocolos en nuestras razas ovinas puede permitir que las técnicas MOET puedan ser aplicadas en centros técnicos y por tanto sean más eficientes y útiles para desarrollar los objetivos que persiguen.

Por lo que a la producción *in vitro* de embriones se refiere, es evidente que la mejora del rendimiento de la técnica es el gran caballo de batalla. Recientes resultados obtenidos por nuestro equipo de investigación han mostrado que la suplementación con melatonina a los medios puede mejorar la eficacia de los procesos de maduración y de fecundación *in vitro* de oocitos ovinos, aunque el efecto de la hormona pineal sobre la calidad y viabilidad de los blastocistos producidos *in vitro* queda por dilucidar.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo ha sido intentar mejorar la eficacia de los procedimientos de obtención de embriones ovinos *in vivo* e *in vitro*:

- ✓ En el primer caso, se pretende evaluar la eficacia de los protocolos simplificados de superovulación y de su aplicación repetida en la misma hembra sobre la producción y la a viabilidad de los embriones, todo ello frente a los procedentes de protocolos tradicionales basados en inyecciones repetidas. Para ello, se ha trabajado con ovejas de raza Ojalada en base a un proyecto de investigación que pretende optimizar la producción y conservación de sus embriones.
- ✓ En el segundo caso, se pretende evaluar la eficacia de la presencia de melatonina en los medios sobre la maduración y la fecundación *in vitro* de los oocitos, y por tanto sobre la producción y viabilidad de los blastocistos obtenidos tras en cultivo *in vitro* subsiguiente.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. CICLO SEXUAL Y FOLICULOGÉNESIS

1. Ciclo sexual

La oveja es un rumiante poliéstrico estacional que posee un patrón reproductivo regido por dos ciclos: un ciclo anual determinado por una época reproductiva y una época de anoestro, y un ciclo estral de una duración media de 16 a 17 días durante el cual se suceden dos fases: la fase luteal de duración de 12 a 14 días y de una fase folicular de unos 3 a 4 días. La regulación del ciclo estral está controlada por el eje hipotálamo-hipofisario que interactúa con los ovarios y el útero a través de la secreción de diferentes hormonas.

La fase luteal se caracteriza por la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo ovulatorio en un proceso conocido como la luteinización. Responsable principalmente de la secreción de la progesterona, esta última actúa sobre el establecimiento y el mantenimiento de la gestación. En ausencia de estructura embrionaria, la prostaglandina (PG) F₂α secretada por el útero induce la regresión del cuerpo lúteo (fenómeno conocido como la luteolisis) provocando un descenso de la concentración plasmática de progesterona que a su vez disminuye la inhibición del eje hipotálamo-hipofisario ejercida por la progesterona activando así el ciclo. En consecuencia, varios folículos primarios cuyo diámetro es de 2 a 3 mm entran entonces en fase de de crecimiento o foliculogénesis.

2. Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los folículos ováricos, pasando por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produzca la ovulación o bien la atresia, relacionada con la muerte celular programada o apoptosis tanto de las células somáticas del folículo como del propio

oocito. Este proceso se inicia tempranamente durante la vida embrionaria, de modo que al nacer, la cordera, al igual que la mayoría de las hembras de las especies domesticas, cuenta con una reserva o *pool* de oocitos que han detenido su crecimiento. Estos conforman los folículos primordiales, cuyo número oscila entre 40.000 y 300.000 por oveja (Scaramuzzi et al., 1993). Se trata de estructuras sin red capilar y sin apenas atresia.

2.1. Reclutamiento

De forma continua y ya desde antes de la aparición de la pubertad, se genera un reclutamiento inicial de los folículos primordiales cuando algunos factores inhibitorios que los mantenían estáticos en su actividad dejan de estar presentes (Fortune, 2002). A medida que progresan en su desarrollo se genera un cambio estructural en las células de la granulosa y se forma la teca interna para ser folículos primarios. Es importante señalar que, una vez que el folículo abandona el pool primordial e inicia su crecimiento, no vuelve a retornar al estadio quiescente, de manera que o bien alcanza las fases finales de desarrollo o bien se atresia.

En la fase de reclutamiento tiene lugar un aumento del tamaño del oocito y una proliferación de las células de la granulosa, que se disponen en capas concéntricas a su alrededor (Hirshfield, 1991). Estos folículos tienen un diámetro entre 0,03 y 0,1 mm. Son folículos preantrales por no haberse conformado el antro, de manera que en esta etapa la foliculogénesis es independiente de las gonadotrofinas y su estímulo depende de otros factores (Fortune, 2002).

2.2. Folículos con respuesta a las gonadotrofinas

A medida que van progresando en su desarrollo, los folículos se van haciendo sensibles a las gonadotrofinas, de manera que se adquieren receptores para LH y FSH en células de la teca y la granulosa respectivamente; en consecuencia tienen capacidad para sintetizar progesterona y andrógenos, aunque las cantidades de estradiol no son detectables hasta que el folículo no alcanza los 0,5 mm de diámetro.

También se forma el antro y el folículo sigue creciendo hasta alcanzar 1-2,5 mm de diámetro. Esta etapa de desarrollo folicular dependiente de gonadotrofinas tiene lugar de forma cíclica y organizada en forma de ondas foliculares (Montgomery et al., 2001). En conjunto, una oveja viene a tener unos 25 folículos con respuesta a las gonadotrofinas.

2.3. Folículos dependientes de gonadotrofinas

Se trata de estructuras que para superar los 2,5 mm de diámetro dependen mucho tanto de la FSH (necesaria para la aromatización o producción de estrógenos) como de la LH (implicada en la producción de andrógenos, sustrato para la síntesis de estrógenos). Por tanto, son muy eficientes en la producción de estradiol, especialmente conforme progresan en su desarrollo y aumentan el número de receptores a ambas gonadotrofinas, sobre todo a la LH en las células de la granulosa (Scaramuzzi et al., 1993). Su número está entre 1 y 8 por ovario, y se trata de folículos cuyo destino (ovulación o atresia) está íntimamente ligado a la evolución de las gonadotrofinas a lo largo del ciclo sexual.

2.4. Folículos ovulatorios:

Los folículos ovulatorios requieren unas concentraciones de FSH reducidas como consecuencia de su alta producción de estradiol e inhibina (Scaramuzzi et al., 1993). Tales concentraciones impiden el desarrollo de los folículos dependientes de gonadotrofinas que vienen por detrás, con lo que el folículo que va a ovular ejerce un efecto de dominancia que puede alterar la respuesta a los tratamientos de superovulación (González-Bulnes et al., 2004). En la

Figura 1 se representan las diferentes fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del oocito según Mermillod *et al.* (1999)

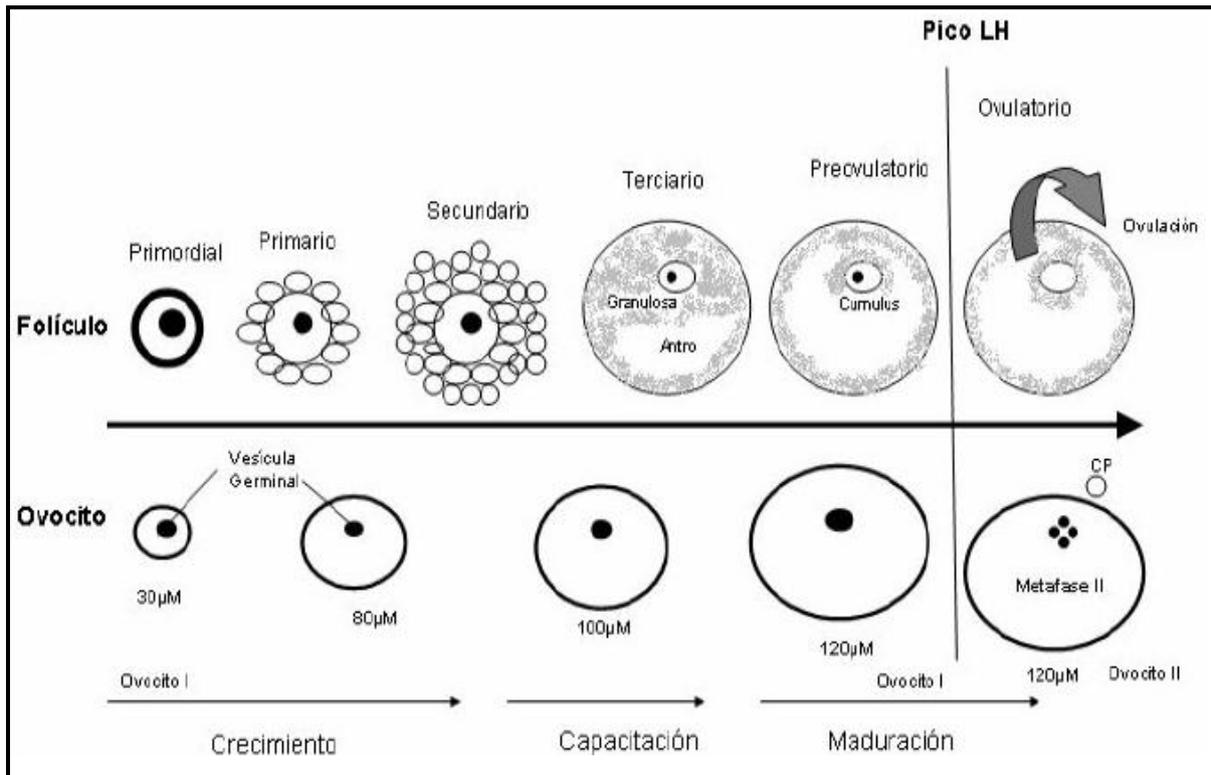


Figura 1: Representación esquemática del crecimiento del oocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod et al., 1999)

2.5. Ondas de desarrollo folicular.

En las ovejas se han descrito entre 2 y 4 ondas foliculares durante un ciclo sexual (Evans et al., 2000), de manera que cada onda está constituida por tres etapas:

- Reclutamiento:

Es el inicio de la onda folicular. En esta etapa un grupo de folículos antrales (de 2 mm de diámetro) responden a los incrementos de FSH (Driancourt et al., 1993). El folículo cuenta con receptores LH en las células de la teca y receptores FSH en las células de la granulosa y ambos grupos de células generan estrógenos, que junto a la FSH aumentan la producción de líquido folicular en la medida que el antro va creciendo.

- Selección:

El folículo dominante crece de forma acelerada asumiendo que este folículo es seleccionado para ovular y los demás folículos subordinados crecen pero a menor velocidad hasta detener su desarrollo e iniciar la atresia. El folículo seleccionado tiene la mayor cantidad de receptores de LH (en teca y granulosa) y FSH, por lo que posee los mayores niveles intrafoliculares de estradiol, sobre todo al alcanzar 4 mm de diámetro (Driancourt, 2001), de manera que los demás folículos del grupo completan su regresión hasta la atresia.

- Dominancia:

El mecanismo principal que regula la dominancia folicular es una reducción notable de los niveles de FSH debido a la acción combinada de la inhibina y el E2 producidos por el futuro folículo dominante que actúan por retroalimentación negativa sobre la hipófisis (Gibbons et al., 1997). La aparición de receptores de LH en la células de la granulosa permite superar las consecuencias de la supresión de FSH provocada por la secreción de estradiol por lo que el número de dichos receptores aumenta a la par que los niveles de E2 de forma tal que esta producción acelerada actúa a nivel central para estimular el pico de LH. El folículo dominante finalmente se atresia u ovula dependiendo de la existencia o no de cuerpo lúteo. De existir cuerpo lúteo, la P4 actúa inhibiendo los pulsos de LH, de modo que los folículos dominantes no terminan su maduración y sufren atresia.

La magnitud de la dominancia se mide por la diferencia de tamaño entre el folículo dominante y el folículo subordinado más grande, que en general es de únicamente 2 a 3 mm de diámetro en la oveja, con lo que en esta especie la dominancia no sería excesiva (Driancourt, 2001). Tras la luteolisis al ir aumentando la secreción de LH, la dominancia se hace más evidente (González-Bulnes et al., 2004).

Como consecuencia de la ovulación cesa la síntesis de E2, posteriormente a esto tiene lugar un pico secundario de FSH, el cual estimula la emergencia de una nueva onda folicular (Simonetti, 2008).

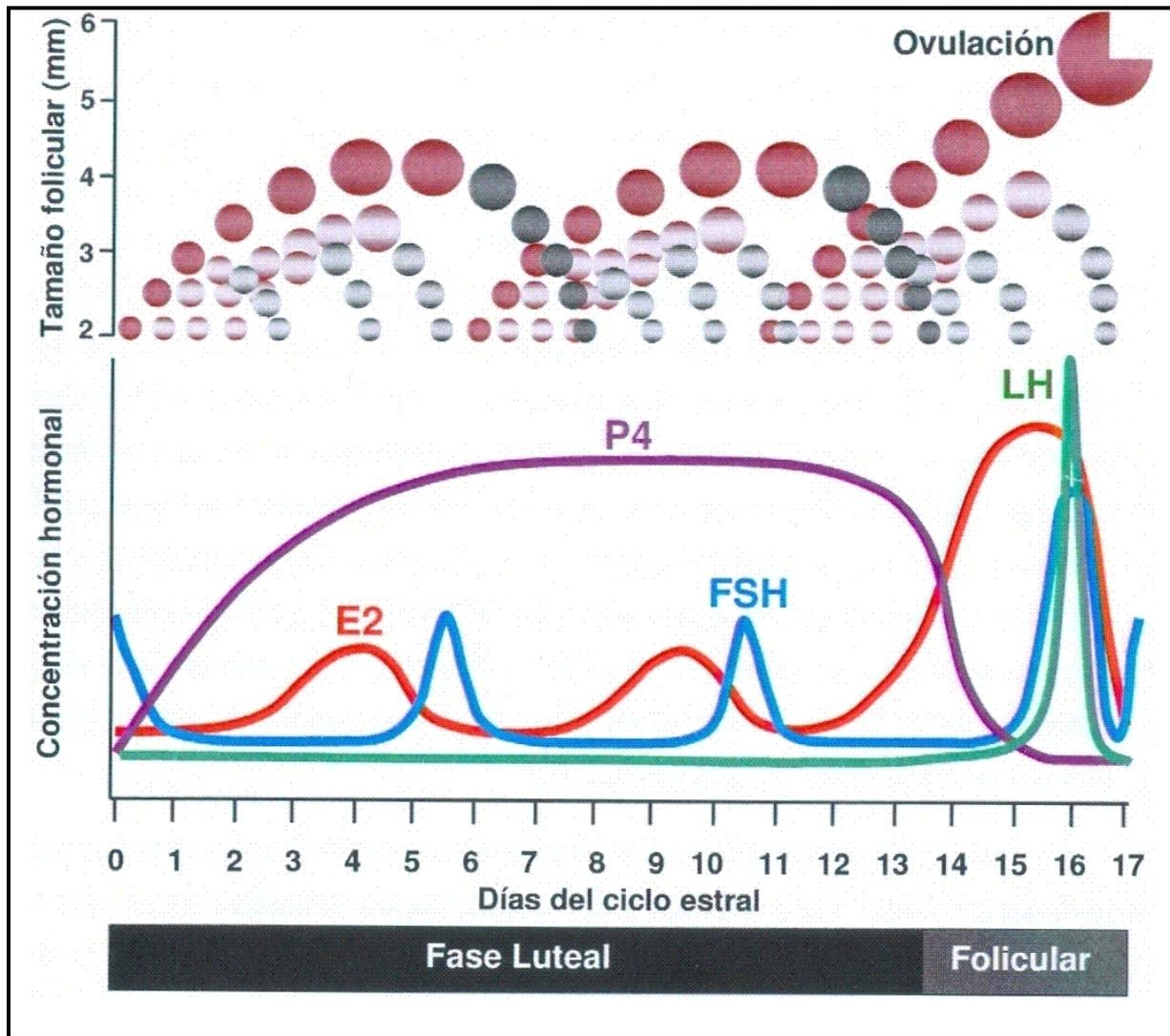


Figura 2: Representación esquemática del desarrollo folicular y los perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja (Simonetti, 2008).

En la **Figura 2** se puede observar el crecimiento y atresia durante 3 ondas de desarrollo folicular. Como se puede observar, la LH se mantiene basal durante casi todo el ciclo, alcanzando niveles altos en el momento del pico preovulatorio. La FSH es producida en ondas en concordancia con las ondas foliculares y su nivel más alto se produce junto al pico preovulatorio de LH. El estradiol presenta elevaciones periódicas que coinciden con el crecimiento del folículo mayor de cada onda y su nivel máximo ocurre en la onda ovulatoria. La progesterona se mantiene basal durante todo el desarrollo folicular, aumentando en la fase luteal y cayendo en forma abrupta en la luteolisis.

II. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*

Las técnicas en las que se basa la producción de embriones *in vivo* en los pequeños rumiantes se conocen desde hace tiempo, y lo cierto es que han evolucionado poco en los últimos años, en particular en relación a su eficacia y a su aplicación práctica.

La producción de un número de embriones suficientemente elevado supone la estimulación hormonal de los acontecimientos endocrinos que regulan el ciclo sexual de la oveja con la finalidad de inducir el celo y estimular el crecimiento y la ovulación de la población de folículos en un momento determinado. Todo ello supone un tratamiento de sincronización-ovulación y otro de sobreestimulación ovárica.

1. Tratamiento de Sincronización:

La sincronización se basa principalmente en la manipulación de la fase luteal del ciclo. Las estrategias de sincronización pueden ser empleadas bien para inducir o para prolongar esta fase mediante la administración de progesterona exógena, o bien para acortarla prematuramente induciendo la luteolisis y subsiguiente fase folicular utilizando las prostaglandinas (Wildeus, 2000). Por tanto y según la hormona utilizada, se pueden distinguir los tratamientos con progestágenos (los más difundidos en ovinos) y los tratamientos con prostaglandinas.

1.1. Tratamientos con progestágenos:

El fundamento de este método es producir en los animales un efecto similar al ejercido en el ciclo sexual por la progesterona, es decir, una inducción o prolongación de la fase luteal y una inhibición de la acción de las gonadotrofinas y por lo tanto de las etapas finales de maduración de los folículos. A ser retirada la fuente de progestágeno se anula dicha inhibición. En consecuencia, en la práctica las ovejas se sincronizan en un estado similar de su ciclo estral, entrando la mayoría de ellas en celo (Raso et al., 2004).

El tratamiento tradicional de sincronización en pequeños rumiantes tanto en estación sexual como durante el anoestro estacional ha supuesto la aplicación de esponjas de poliuretano impregnadas con progestágenos. Los niveles de progestágenos, aunque bajos, son de igual eficacia que la progesterona natural. Actualmente existen dos tipos de esponjas, las impregnadas de acetato de fluorogestona (FGA) y las que contienen acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Wildeus, 2000).

La colocación de la esponja por vía intravaginal tiene por objetivo simular la acción del cuerpo lúteo en la regulación del ciclo estral. La esponja permanece durante 12 a 14 días en el tracto reproductivo (tiempo equivalente a la fase luteal natural), de manera que los niveles elevados del progestágeno liberado actúan a nivel del eje hipotálamo hipofisario inhibiendo la secreción pulsátil del GnRH y por tanto suprimiendo la secreción de gonadotrofinas e inhibiendo el crecimiento folicular y la ovulación.

Al retirar la esponja se produce una disminución brusca de los niveles plasmáticos de progesterona eliminando el bloqueo sobre el eje hipotálamo hipofisario favoreciendo la reanudación de los acontecimientos endocrinos que inducen el celo y la ovulación (Cognie, 1992).

Un aspecto a destacar de la sincronización con esponjas vaginales es que en el momento de su colocación se desconoce el momento del ciclo estral en el que se encuentra la oveja. Además, los niveles de progestágenos, altos tras la aplicación de la esponja, se reducen notablemente conforme pasan los días, con lo que en la fase final del tratamiento son demasiado bajos como para inhibir la liberación de LH, produciendo un inadecuado desarrollo folicular con persistencia de folículos envejecidos (Viñoles et al., 1999) cuya ovulación ha sido asociada en ocasiones con una menor fertilidad (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles et al., 2001). Si bien es cierto que la actual normativa comunitaria ha promovido el desarrollo de esponjas vaginales que tienen una liberación más constante del progestágeno (FGA), también lo es que la aplicación de un segundo dispositivo a los 7 días de la inserción del primero puede reducir los problemas anteriores (Thompson et al., 1990), con lo que en los protocolos de superovulación actuales se sustituye la esponja vaginal en la

mitad del tratamiento de sincronización, asegurando de este modo unos niveles de progestágenos altos y relativamente constantes (González-Bulnes et al., 2004).

1.2. Tratamientos con prostaglandinas:

El uso de la PGF₂α o de sus análogos como método de sincronización en ovinos se consideró una posibilidad tras el estudio de McCracken (1972), que describió la PGF₂α como la hormona luteolítica en ovinos.

La PGF₂α es secretada por el endometrio estimulado por el estradiol ovárico a partir de los días 13-14 del ciclo estral de la oveja (siendo el día 0 el día de la ovulación) y las altas concentraciones de los días 15 y 16 son responsables de la luteolisis. En ausencia de embrión, la pPGF₂α provoca la ruptura del cuerpo lúteo y por tanto una caída de los niveles de progesterona, eliminando contróla la inhibición de la misma sobre el eje hipotálamo hipofisario y por tanto la reanudación de la fase folicular (Baril et al., 1993).

Este método se basa en la destrucción del cuerpo lúteo y con esto la disminución de la secreción natural de progesterona y un consecuente desarrollo sincronizado de la fase folicular, con lo cual, la mayoría de las ovejas salen en celo de manera sincronizada. Para que exista acción de las prostaglandinas o de sus análogos, debe existir un cuerpo lúteo activo. Por lo tanto, no serán susceptible a este tratamiento las ovejas que recientemente han ovulado y tienen un cuerpo lúteo poco desarrollado o las que se encuentran normalmente en fase folicular (Raso et al., 2004).

En la sincronización del ciclo a nivel comercial se aplica la prostaglandina en dos inyecciones separadas por 9-12 días. No obstante, en los últimos años también se utilizan prostaglandinas asociada a protocolos de superovulación. Así, González-Bulnes et al. (2004) obtienen unos buenos resultados de producción y viabilidad embrionaria inyectando cloprostenol a las 72 horas antes de la retirada de la esponja, justo al inicio del tratamiento de superovulación con FSH, al objeto de uniformizar la población folicular. Estos autores también han mostrado que los mejores resultados de embriones viables se obtienen cuando el tratamiento

progestativo de sincronización se inicia en el inicio de la fase luteal, con lo que utilizan prostaglandinas para sincronizar el celo en tales condiciones.

2. Estimulación ovárica:

El tratamiento de superovulación consiste en inducir una tasa ovulatoria por encima de la normal estimulando los ovarios mediante la aplicación de gonadotrofinas exógenas.

Los principios de la superovulación en ovino y caprino son iguales que en bovino y Consisten en la administración de una gonadotrofina folículo estimulante al final de la fase luteal del ciclo (días 11 a 13) o alrededor del día 1 o 2 antes del final de los tratamientos de sincronización (Ishwar y Memon, 1996). Esto consigue el reclutamiento de folículos pequeños, de manera que se acelera el desarrollo folicular y paralelamente también disminuye el tamaño de los folículos preovulatorios (Driancourt, 1987, 2001).

La fase preovulatoria del ciclo estral en ovejas es caracterizada por la selección de uno u varios folículos dominantes y la atresia de los folículos subordinados por acción de la inhibina y del estradiol secretados por el folículo dominante actuando sobre el eje hipotálamo hipofisario disminuyendo así la concentración plasmática de FSH (Driancourt et al., 1985). Por ello, para llevar a cabo un tratamiento de superovulación, hay que vencer los mecanismos inhibidores establecidos por el/los folículos dominantes aportando altas cantidades de FSH exógena.

Durante la fase folicular temprana se ha observado que el crecimiento de los pequeños folículos antrales esta directamente correlacionado con las concentraciones altas de FSH en el plasma periférico (Cahill et al., 1985; McNatty et al., 1985). Además, la administración de preparaciones de gonadotrofinas exógenas que contienen extractos hipofisarios con actividad similar a la FSH durante el periodo de concentraciones bajas de FSH endógeno, puede vencer los mecanismos inhibidores ejercidos por el folículo dominante e inducir el crecimiento de múltiples folículos preovulatorios (Rubianes et al., 1997).

La superovulación en ovinos ha sido realizada mediante la utilización de varias fuentes hormonales. Entre las hormonas más comúnmente empleadas se hallan la eCG (Gonadotrofina Coriónica Equina, también denominada PMSG) y la FSH (Hormona Folículo Estimulante).

Es importante que la dosis de las hormonas utilizadas sea la adecuada, pues si es excesiva el número de folículos ovulados se reduce notablemente tanto con eCG (Mutiga y Baker, 1982; Gonzalez-Reyna et al., 1999) como con FSH (Smith, 1984; D'Alessandro et al., 1996), además de que los riesgos de regresión prematura de los cuerpos lúteos formados aumentan (Ryan et al., 1991; D'Alessandro et al., 1996).

2.1. La Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG):

Descubierta por Cole y Hart en el año 1930. La eCG es una hormona glucoproteica (Christakos y Bahl, 1979), producida naturalmente por las copas endometriales de la yegua entre los días 40 y 120 de gestación (Allen y Moor, 1972). Esta utilizada para la inducción de crecimiento folicular y ovulación en particular durante el anoestro en ganado ovino, asociándose con la inseminación artificial en varias especies. En ovinos, la eCG presenta una elevada vida media (más de 21 horas) debida principalmente a su alto contenido en ácido sálico que la protege de la degradación hepática y por tanto retrasa notablemente su eliminación de la circulación sanguínea (McIntosh et al., 1975). Es por ello que se aplica en una única inyección, lo que facilita enormemente las cosas a nivel comercial. De hecho, fue la primera hormona utilizada para inducir superovulación en la especie ovina, en una única inyección de entre 1000 y 2000 UI 24 ó 48 horas antes de la retirada de la esponja.

A pesar de que ha sido ampliamente utilizada en programas de superovulación, la eCG, presenta varios efectos negativos debido a su prolongada presencia en la circulación provocando:

- Una baja eficiencia de recuperación embrionaria asociada al mayor número de folículos presentes a la hora del lavado, y al número bajo de oocitos fertilizados (Chagas e Silva et al., 2003).
- La formación de un gran número de folículos anovulatorios que persisten tras la ovulación (Jabbour y Evans, 1991; Martemucci et al., 1995)
- Altos niveles periovulatorios de estradiol asociados a la presencia de los anteriores folículos anovulatorios y que puede interferir con el transporte de los oocitos en el oviducto (Jabbour y Evans, 1991)
- Altos niveles periovulatorios de progesterona asociados a las ovulaciones tempranas (a veces antes de la retirada de la esponja), que puede perjudicar el transporte de espermatozoides y oocitos (Cameron et al., 1988).
- En algunos animales, la formación de anticuerpos anti eCG tras inyecciones repetidas de eCG que puede interferir con los subsiguientes tratamientos en ovino (Bodin et al., 1997) y en caprinos (Herve et al., 2004). De acuerdo con Maurel et al (2003) y en relación a dosis comerciales de eCG, un 20% de las ovejas desarrollan niveles altos de anticuerpos en respuesta a los sucesivos tratamientos con eCG. Esta respuesta puede producir un retraso del celo, del pico de LH y por tanto de la ovulación tras cada tratamiento, lo que puede afectar negativamente los resultados tras la inseminación artificial. No obstante, no hay referencias relativas a los niveles de anticuerpos anti eCG inducidos por tratamientos repetidos de la hormona en programas de superovulación, así como a sus consecuencias sobre la recuperación de embriones.

No obstante y a pesar de de todas sus desventajas, la eCG sigue siendo ampliamente utilizada a nivel comercial asociada a inseminación e incluso en los programas MOET debido especialmente a su bajo coste y a su sencilla utilización, además de su permanente disponibilidad.

2.2. La Hormona Folículo Estimulante (FSH):

Es una hormona glicoproteica producida en las células gonadotrofas de la adenohipofisis. Actualmente las preparaciones comercializadas de FSH son de origen ovino u porcino y en realidad se tratan de los extractos hipofisarios parcialmente purificados con una elevada actividad FSH y con una cantidad variable de LH. .

Por lo que al contenido de LH en los extractos hipofisarios que se han comercializado con los años se refiere, el Pluset (FSH porcina) posee cantidades iguales de FSH y LH, mientras que en el Folltropin-V (FSH porcina) se ha extraído el 80% de la LH, con lo que su relación FSH:LH queda en 49:1 (Henderson et al., 1990). Finalmente, el Ovagen (FSH ovina) parece ser el producto más purificado, con poca contaminación LH y una relación FSH:LH de 1090:1. En general, parece claro que un alto contenido de LH se asocia con una reducción de la respuesta ovulatoria (Chupin et al., 1987; Torrès et al., 1987), con lo que la tendencia en el tiempo ha sido utilizar productos cada vez más purificados.

En virtud de los problemas encontrados al emplear la eCG, la alternativa de superovular empleando la FSH ha sido una opción utilizada durante décadas en los programas MOET. La utilización de la FSH se asocia con una menor variabilidad en la tasa de recuperación y una menor cantidad de folículos anovulatorios (Chagas e Silva et al., 2003). Además, su aplicación repetida en sucesivos tratamientos superovulatorios anuales (Bari et al., 2001) o incluso cada 2 meses sobre la misma hembra (Forcada et al., 2000) (**Tabla 1**), no parece reducir significativamente el rendimiento en la producción de embriones de los programas MOET.

Tabla 1: 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 (adaptado de Forcada et al., 2000)

Numero de tratamientos	1	2	3
Ovejas en celo	84/113	63/73	22/25
Ovejas superovuladas (CL funcional)	70/84	52/63	19/22
Tasa de Ovulación	11,4 ^c	11,6 ^c	8,5 ^d
Recuperados/oveja	7,3 ^{c,d}	8,0 ^c	5,4 ^d
Fecundados/oveja	5,8	6,2	4,0
Viabiles/oveja	5,0	5,4	3,5
Congelables/oveja	4,1 ^c	4,5 ^C	2,4 ^{D,d}

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

Dado que la FSH tiene una vida media corta de únicamente 3 a 5 horas (Laster, 1972; Demoustier et al., 1988), requiere que sea administrada de manera repetida para mantener altos sus niveles en plasma y por tanto para asegurar su eficacia en los programas MOET. Así, se inyecta cada 12 horas en protocolos de 6 a 8 inyecciones, aunque también se han descrito protocolos de 4 inyecciones. De este modo, la eficacia de la aplicación de la FSH cada 12 horas ha sido superior a la obtenida con una administración menos frecuente, cada 24 horas (Thompson et al., 1990).

Por lo que al modo de aplicación de FSH se refiere, tradicionalmente se ha adoptado el protocolo de dosis decrecientes, fundamentalmente porque en las preparaciones con un elevado contenido de LH, que fueron las disponibles en primer lugar, la eficacia del mismo fue superior a la obtenida con un protocolo de dosis constantes (Torrès et al., 1987). La aparición de sucesivos preparados de extractos hipofisarios apenas contaminados con LH se asoció con la posibilidad de utilizar de nuevo los protocolos de dosis constantes, más cómodos en la práctica y con menos riesgos de errores en la dosificación. De hecho y por ejemplo, el propio laboratorio que proporcionaba el preparado Ovagen (Immuno-Chemical Products Bio, Nueva

Zelanda) sugería la adopción de un protocolo de dosis iguales, que algunos autores han mostrado que se asocia con resultados muy satisfactorios (Bettencourt et al., 2008) y consistentes en el tiempo, como los registros de 8 años en el programa MOET desarrollado sobre ovejas Scottish Backface (Bari et al., 2001). No obstante, esta consistencia no ha sido contrastada por otros autores, que han mostrado que el protocolo de dosis constantes ofrece resultados variables y por tanto poco predecibles (Gonzalez-Bulnes et al., 2002a; Berlinguer et al., 2004). De este modo u en conjunto, González-Bulnes et al. (2004) parecen demostrar una cierta superioridad de los protocolos de dosis decrecientes de FSH respecto a los de dosis constantes, señalando que los primeros estarían más próximos a los cambios de secreción hipofisaria que tienen lugar en la fase folicular del ciclo sexual natural.

No obstante y aunque en los programas MOET parece más extendida la utilización de protocolos con dosis decrecientes de FSH, lo cierto es que cuando lo que se pretende es recuperar oocitos *in vivo* mediante OPU, se recomienda la adopción de protocolos de dosis constantes, que ofrecen mejores resultados en las ulteriores técnicas de producción de embriones *in vitro*, en particular en lo relativo al número de blastocistos obtenidos (Berlinguer et al., 2004). En concreto, se señala que las dos primeras dosis elevadas de FSH aplicadas en los regímenes decrecientes, parecen acelerar el desarrollo folicular y por tanto producen una falta de sincronización entre dicho crecimiento y el proceso de maduración citoplasmática del oocito (Blondin et al., 1996), lo que provoca que éste tenga una menor competencia a la hora de producir embriones *in vitro*.

Finalmente, hay que tener en cuenta que la respuesta a la superovulación con FSH, en términos de tasa de ovulación y del número y calidad de los embriones recuperados, se considera relacionada con el número de folículos pequeños (Gonzalez-Bulnes et al., 2000) y con la presencia de un gran folículo dominante, como también por la presencia/ausencia de cuerpo lúteo al comienzo de los tratamientos superovulatorios. En este sentido, los resultados son mejores cuando el tratamiento de superovulación se inicia en ausencia de folículo dominante (Rubianes et al., 1995) y en presencia de cuerpo lúteo (Gonzalez-Bulnes et al., 2002a).

3. Simplificación de los tratamientos de superovulación:

La eCG y la FSH han sido ampliamente empleadas en programas de superovulación y transferencia embrionaria. La eCG presenta un aspecto interesante que se relaciona con su bajo coste y su fácil utilización. También por su lenta eliminación del organismo, la eCG mantiene concentraciones sanguíneas altas durante un tiempo prolongado (McIntosh et al., 1975) y por lo tanto, la posibilidad de ser administrada en una única inyección es considerable. No obstante, tiene múltiples problemas cuando se suministra en dosis elevadas

Por su parte, la utilización de la FSH en reemplazo de la eCG se asociaría con una menor variabilidad en la respuesta superovulatoria (Pintado et al., 1998), una mejor tasa de ovulación (Armstrong et al., 1983) y una mayor cantidad de embriones recuperados y una mejor calidad embrionaria (Wright et al., 1981). Sin embargo, su corta vida media requiere una administración frecuente para mantener concentraciones sanguíneas adecuadas y lograr una respuesta ovárica satisfactoria (Armstrong y Evans, 1983; Martemucci et al., 1988). Estos protocolos son muy onerosos en mano de obra, pueden dar lugar a errores de dosificación e incluso se estresantes para los propios animales. Por tanto, desde hace años se han ensayado distintos procedimientos simplificados de aplicación tanto de la FSH sola como de la combinación FSH-eCG.

3.1. Aplicación única de FSH

En general, la simplificación de los tratamientos con FSH se refiere fundamentalmente a su administración en una única inyección. Para ello, se puede utilizar un vehículo salino igual que en el caso de su aplicación en múltiples dosis. Tal protocolo ha ofrecido en general resultados poco satisfactorios en ovino tras una inyección intramuscular de la hormona, caracterizándose por ausencia de celo, baja tasa ovulatoria y fallo en la recuperación de embriones (Watanabe et al., 1998; Okada et al., 1999). Sin embargo, la inyección subcutánea puede mejorar algo los resultados, pues permite mantener elevados por más tiempo los niveles plasmáticos de FSH (Kelly et al., 1997). No obstante, la estimulación sigue siendo insuficiente, y

se manifiesta un alto porcentaje de regresión luteal temprana tras la ovulación (Riesenberg et al., 2001).

Otra posibilidad ha sido aplicar la FSH en una única inyección utilizando productos que liberen más lentamente la hormona y por tanto que permitan su presencia en plasma por más tiempo. Así, la inyección de FSH disuelta en propilenglicol permite que las concentraciones de FSH se mantengan elevadas durante 5 días induciendo un aumento de la tasa ovulatoria (López Sebastián et al., 1993; 1999).

Más frecuente en la bibliografía ha sido el uso de la polivinilpirrolidona (PVP) como diluyente, de manera que este polímero es bastante utilizado en la actualidad para la elaboración de fármacos de acción prolongada. Se asoció por primera vez con la FSH en vacas (Takedomi et al., 1995), donde se comprobó la elevada permanencia de la gonadotrofina en plasma, similar incluso a la inducida por protocolos de varias inyecciones. Desde entonces, distintos autores han encontrado una buena respuesta utilizando este protocolo en dicha especie. En la especie ovina, los resultados publicados señalan que la inyección de FSH disuelta en PVP ofrece una respuesta ovulatoria bastante aceptable en genotipos de reducido potencial ovulatorio, incluso similar a la recogida tras la aplicación de varias inyecciones de FSH (Dattena et al., 1994 -raza Sarda-; D'Alessandro et al., 2001 -raza Leccese-). Sin embargo, la respuesta parece ser peor en genotipos de mayor potencial ovulatorio, como la raza Romanov (Lajous et al., 1997). Más recientemente, Simonetti et al. (2008), en un estudio sobre ovejas Corriedale, han encontrado que aquellas ovejas tratadas con una inyección de FSH ovina+PVP mostraron una respuesta ovulatoria similar que la que tuvieron las hembras tratadas con un protocolo de FSH con 4 inyecciones, si bien dicha respuesta fue inferior a la ofrecida por el grupo que recibió un protocolo de 8 inyecciones (**Tabla 2**)

Tabla 2: *Respuesta ovárica y producción embrionaria en ovejas Corriedale tratadas con 176 NIH-FSH-S1 unidades de oFSH administrada en una única inyección en un vehículo PVP (oFSH+PVP), en 4 dosis iguales o en 8 dosis iguales (adaptado de Simonetti et al. 2008)*

Tratamiento	oFSH+PVP	oFSH (4 dosis)	oFSH (8 dosis)
Ovejas en celo (%)	13/13 (100)	12/12 (100)	17/17 (100)
Inicio celo, horas	40,6±3,5	40,0±2,0	30,4±1,7
Ovuladas con CL normal (%)	12/13 (92,3)	12/12 (100)	17/17 (100)
Tasa de ovulación	4,7±1,0	6,2±1,1	10,7±0,9
Estructuras recuperadas	3,2±1,1	3,1±1,1	7,8±0,8
Tasa de recuperación (%)	39/57 (68,4)	37/75 (49,3)	132/182 (72,5)
Embriones fecundados	2,9±1,0	1,4±0,4	7,3±1,0
Tasa de fecundación (%)	35/39 (89,7)	17/37 (45,9)	124/132 (93,9)
Embriones viables	2,5±0,9	1,2±0,4	5,5±0,8
Tasa de viabilidad (%)	30/39 (76,9)	15/37 (40,5)	94/132 (71,2)

Sin embargo, el tratamiento con PVP no adelantó el celo ni el pico de LH y no alteró las tasas de recuperación y de viabilidad embrionaria, lo que muestra que fue capaz de mantener concentraciones elevadas de FSH durante el tiempo necesario.

3.2. Aplicación conjunta de FSH+eCG

El objetivo fundamental de asociar en una única inyección la FSH con la eCG (en dosis de 200 a 800 UI) ha sido conseguir que la mayor vida media de esta última consiga mantener durante un tiempo adecuado la estimulación folicular iniciada por la FSH, todo ello sin producir los efectos perjudiciales que se han descrito cuando se aplica únicamente la eCG para superovular a dosis elevadas, por encima de las 1000 UI.

Este protocolo de una única inyección de FSH+eCG fue inicialmente testado en la raza Merino por Maxwell y Wilson (1989), y bastante utilizado desde entonces en distintas razas con resultados variables, tanto de elevada estacionalidad sexual

como la Southdown y la Suffolk (Fukui et al., 1998; Okada et al., 1999; 2000) como en razas mediterráneas y de reducida estacionalidad reproductiva como la propia Merino (Jabbour y Evans, 1991; Ryan et al., 1991), la Sarda (Ledda et al., 1992; Leoni et al., 2001; Dattena et al., 1994), la Rasa Aragonesa (Ledda et al., 1992) o la Corriedale (Yamada et al., 1996; Simonetti et al., 2008). En general, los resultados parecen ser adecuados en la raza Merino o en los genotipos que derivan de ella como la Corriedale, así como en la raza Sarda. Sin embargo, en las razas más estacionales y en la Rasa Aragonesa se han visto algunos problemas asociados con el tratamiento. Entre ellos, parece muy llamativa la hiperestimulación ovárica, que hace que se reduzca notablemente las tasas de recuperación (excesivo tamaño de los ovarios que dificulta la recogida de los oocitos por la fimbria) y de fecundación (elevados niveles de estradiol antes del pico de LH e incluso después gracias a los folículos persistentes). También se han señalado, especialmente en genotipos de elevada estacionalidad reproductiva, unas tasas elevadas de regresión luteal de hasta el 70% (Fukui et al., 1998). Quizás el mayor problema de muchos de los estudios, al comparar con los protocolos tradicionales de varias inyecciones de FSH, es que la dosis total de FSH sea la misma en éstos que en los protocolos simplificados de FSH+eCG. En este sentido, Simonetti et al. (2008) han demostrado recientemente una notable mejora de los resultados (embriones viables recuperados por oveja) cuando la cantidad inyectada de FSH se reduce un 30% en el protocolo simplificado. Dicha reducción puede menguar algo la tasa de ovulación, pero mejora sustancialmente las tasas de fecundación y de viabilidad, y consecuentemente el rendimiento final (Simonetti et al., 2008) (**Tabla 3**).

Tabla 3: *Respuesta ovárica y producción embrionaria en ovejas Corriedale tratadas con 176 (grupo T1) o con 132 (grupo T2) NIH-FSH-S1 unidades de oFSH con 500 UI de eCG administrada en una única inyección (adaptado de Simonetti et al. 2008)*

Tratamiento	oFSH+eCG (T1)	oFSH+eCG (T2)
Ovejas en celo (%)	15/16 (93,8)	14/14 (100)
Inicio celo, horas	22,0±1,4	20,1±1,0
Ovuladas con CL normal (%)	15/15 (100)	13/14 (92,8)
Tasa de ovulación	13,7±1,7	10,3±1,3
Estructuras recuperadas	7,9±1,2	5,8±0,7
Tasa de recuperación (%)	118/206 (57,3)	76/134 (56,7)
Embriones fecundados	4,3±1,1	4,8±0,8
Tasa de fecundación (%)	64/118 (54,2)	62/76 (81,6)
Embriones viables	3,3±1,0	4,0±0,8
Tasa de viabilidad (%)	50/118 (42,4)	52/76 (68,4)

Queda por dilucidar, sin embargo, si la aplicación repetida de este protocolo simplificado puede tener efectos negativos en base a los anticuerpos que la propia oveja pueda sintetizar frente a la eCG.

4. Fecundación de las hembras:

Tanto el momento de inicio del celo como el de la ovulación son muy importantes a la hora de valorar el éxito en la fecundación de ovejas superovuladas. En general, el celo aparece más temprano en las ovejas superovuladas que en aquellas que han recibido el clásico tratamiento de inducción y sincronización del celo con esponjas y 400-500 UI de eCG, si bien dicho momento varía con el tipo de tratamiento de superovulación recibido. Así y en general, los tratamientos simplificados FSH+eCG son los que parecen inducir una salida en celo más temprana, entre 20 y 26 horas tras la retirada de la esponja vaginal, seguidos de los protocolos de varias inyecciones con FSH porcina (22-28 horas) y finalmente de aquellos que suponen varias inyecciones de FSH ovina (30-36 horas). Del mismo

modo, la ovulación se produce a las 44-54 horas tras la retirada de la esponja en los 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 parece estar más sincronizado entre individuos cuando el tratamiento se realiza en la estación reproductiva que cuando tiene lugar en el periodo de anoestro. Asimismo, las diferencias señaladas entre tratamientos son importantes tanto a la hora de considerar el momento más oportuno para la inseminación artificial como a la hora de precisar la edad de los embriones que vamos a recuperar con posterioridad.

Por lo que a la fecundación se refiere, en un programa MOET el objetivo fundamental es conseguir la mayor fertilidad posible, es decir, que la práctica totalidad de los oocitos producidos queden fecundados. Para ello, la monta natural es la mejor opción, siempre que sea controlada y con un reducido número de ovejas por morueco, y se pueden alcanzar porcentajes de fecundación del 90% con tratamientos de superovulación adecuados. No obstante, en muchas ocasiones se hace necesario utilizar la inseminación artificial en programas de mejora genética. 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 fecundación se reduce hasta niveles del 10%. Dado que el uso de semen congelado resulta fundamental en este tipo de técnicas, cuando se asocia superovulación con inseminación artificial se recomienda encarecidamente abordar la inseminación intrauterina por laparoscopia, que permite garantizar unas buenas tasas de fecundación en ovejas superovuladas, entre el 50 y el 70% (Armstrong y Evans, 1983; Berbion et al., 1992), porcentajes que podrían llegar al 80-90% con semen fresco (Robinson et al., 1989; Scudamore et al., 1991). Con la técnica de inseminación intrauterina hay que precisar notablemente el momento de la inseminación en función del tratamiento de superovulación utilizado, que va a determinar el momento de inicio del celo y de la ovulación. Del mismo modo, nuestro equipo ha demostrado que una selección de los espermatozoides a utilizar puede mejorar la fecundación incluso reduciendo el número de espermatozoides por dosis (Grasa et al., 2004).

5. Recuperación de embriones:

La recuperación de embriones *in vivo* se realiza mediante lavado del tracto genital, oviducto o útero en función de la edad del embrión (Wintenberger-Torres y Sevellec, 1987) (**Tabla 4**)

Tabla 4: *Estadios de desarrollo embrionario previo a la implantación en ganado ovino. Adaptado de Witenberger-Torres y Sevellec (1987).*

ESTADIO ANTES Y DESPUÉS DE LA OVULACIÓN	TIEMPO TRAS INICIO CELO
INICIO DEL CELO	0 HORAS
ESTANCIA EN EL OVIDUCTO	
Ovulación	24-30 horas
Primera división (2 blastómeros)	56 horas
Estadio de 4 blastómeros	60 horas
Estadio de 8 blastómeros	72 horas
ESTANCIA EN EL ÚTERO	
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

Aunque los embriones pueden ser recuperados del oviducto y ser cultivados *in vitro* algunos días hasta el estadio deseado, la recuperación se realiza del útero en la mayoría de los casos y entre los días 5 y 7 tras el celo. Hay que señalar que las características anatómicas del cuello uterino en la especie ovina hacen poco

viable la recuperación vía vaginal. Aunque algunos autores han intentado poner a punto técnicas que permitieran llevarla a cabo, lo cierto es que los porcentajes de recuperación han sido notablemente bajos, en torno al 36-37% (Soonen et al., 1991; Flores-Foxworth et al., 1992). Es por ello que la laparotomía es la técnica generalizada para abordar el oviducto o el útero y realizar el correspondiente lavado. En el primer caso el lavado es relativamente simple y la tasa de recuperación elevada, del 90-100% 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%. Es bastante frecuente la recuperación de embriones a día 7 tras el celo en un estadio de blastocisto expandido, sobre todo cuando se pretende realizar congelación mediante vitrificación, pues este estadio de desarrollo el que asegura unas mayores tasas de supervivencia tras la conservación mediante esta técnica (Naitana et al., 1997).

Ante los inconvenientes que presenta la recuperación de embriones mediante laparotomía, sobre todo relacionados con la presencia de adherencias que dificultan recuperaciones posteriores sobre la misma hembra (Torrès y Sevellec, 1987), algunos autores han propuesto la vía laparoscópica como alternativa, desarrollada en ovinos por McKelvey et al. (1986). Supone realizar tres punciones en la cavidad abdominal. La primera permite introducir el laparoscopio, la segunda una sonda de tres vías (entrada PBS, Salida PBS e insuflación del balón) y la tercera, una pinza de manipulación no traumática.

Esta técnica requiere un buen entrenamiento y su coste es elevado debido a la necesidad de disponer de un endoscopio. Su mayor ventaja es que induce la aparición de menos adherencias y por tanto permite mantener el porcentaje de recuperación en sucesivas intervenciones (Gibbons y Cueto, 1995). No obstante, su mayor inconveniente es que los porcentajes de recuperación no son adecuados, estando casi siempre por debajo del 50%.

6. Posibilidades de mejora de la eficacia de las técnicas MOET

Cuando el objetivo fundamental de las técnicas MOET es el mantenimiento de la diversidad genética y en concreto el conservar razas o agrupaciones de interés local en peligro de extinción, es evidente que hay que conseguir desarrollar dos aspectos fundamentales:

- ✓ Transferir la técnica a centros de transferencia de tecnología, que están directamente en contacto con el sector, lo que supone una simplificación de la misma sin pérdida de eficacia. Es aquí donde entra en juego la optimización de protocolos simplificados de superovulación como el propuesto en el presente estudio.
- ✓ Intentar obtener el mayor número de embriones de hembras de alto valor genético y preferentemente al final de su vida productiva. En este sentido, la recuperación repetida de embriones de la misma oveja es una opción muy interesante en genotipos en peligro de extinción. En un experimento previo sobre ovejas Rasa Aragonesa, la aplicación de 3 tratamientos de superovulación sucesivos con FSH ovina y con un intervalo de 2 meses entre ellos, ha permitido obtener una media de 14 embriones viables por oveja (Forcada et al., 2000).

III. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*:

Se trata de una técnica que evita los inconvenientes del uso de hembras vivas para obtener embriones además de que permite la complementación con otras biotécnicas utilizadas en programas de mejora genética.

Los embriones se obtienen a partir de oocitos recuperados de ovarios provenientes de animales sacrificados en matadero o *in vivo* de hembras ovariectomizadas. Otra alternativa para la obtención de oocitos de animales vivos consiste en la aspiración transvaginal de los folículos ováricos con ayuda de la ultrasonografía y una bomba de vacío o mediante laparoscopia o laparotomía.

En todos los casos, los oocitos son madurados (MIV) y fecundados (FIV) en el laboratorio y cultivados en estufa en condiciones atmosféricas especiales durante un período de 7 a 8 días. Finalizado este período, los embriones se encuentran en condiciones de ser transferidos (embriones frescos) a una oveja receptora preparada para tal fin o de ser congelados y conservados hasta su transferencia en el momento apropiado.

El primer cordero nacido tras la aplicación de la tecnología FIV a partir de oocitos madurados *in vitro* fue obtenido por Cheng et al. (1986). Desde entonces, el progreso de la técnica de producción de embriones *in vitro* ha sido grande, pero todavía no puede competir con la eficacia y calidad de los embriones obtenidos en el estadio de desarrollo deseado directamente de hembras *in vivo*.

1. Obtención de oocitos:

1.1. Oocitos de donantes vivas:

- Aspiración guiada de ultrasonografía (Ovum Pick-Up):

La aspiración folicular transvaginal es una técnica mediante la cual los oocitos inmaduros son recuperados de los folículos de los ovarios de un animal vivo mediante aspiración guiada por ultrasonografía a través de la vagina.

La sonda ultrasonográfica para OPU ha sido construida con la finalidad de permitir la manipulación de la aguja desde el exterior del animal y que el transductor esté en contacto con los ovarios; de ese modo, el extremo de la aguja puede ser visualizado cuando penetra dentro de los folículos que serán aspirados. La aguja está conectada a la bomba de vacío por medio de una tubería plástica o de silicona, lo que permite que el contenido folicular sea vaciado directamente al filtro, que es similar al utilizado para la recolección de embriones. Este procedimiento se lleva a cabo una o dos veces a la semana y puede ser repetido durante varias semanas. (Galli y Lazzari, 1996).

Es importante resaltar que el uso de esta técnica es muy utilizado en bovinos pero no está restringida solo a esta especie y ha sido también aplicada en equinos y

búfalos, así como en ovinos (Ptak et al., 1999), además de representar una herramienta importante en la recuperación de especies en peligro de extinción.

- Aspiración por laparotomía

Consiste en obtener oocitos después de la exteriorización del ovario a través de una incisión en la pared abdominal (Stenbak et al., 2001). Es una técnica interesante en aquellas especies, como la ovina, en las que el acceso al ovario vía vaginal está notablemente dificultado por cuestiones anatómicas.

La desventaja de esta técnica es la aparición de cicatrices y adherencias en el lugar de la intervención y en el propio tracto reproductivo, lo que altera el rendimiento en recuperaciones sucesivas y que además puede tener efectos negativos a medio y largo plazo sobre la reproducción de la hembra. Así, algunos autores (Ptak et al., 1999) recomiendan aplicar pomadas con acetato de hidrocortisona para prevenir las adherencias.

Dichos autores han recuperado con esta técnica un total de 11,5 oocitos por oveja tras un tratamiento hormonal previo de 96 UI de FSH (Ovagen).

Finalmente, hay que señalar que esta técnica puede no ser aceptada desde el punto de vista de bienestar animal por lo invasiva que resulta, siendo sustituida por la técnica de LOPU (Laparoscopic ovum pick-up).

- Punción Folicular mediante Laparoscopia (LOPU).

Si bien la aspiración ovárica por laparoscopia sin estimulación hormonal ha sido descrita en pequeños rumiantes (Stangl et al., 1999), a fin de obtener una máxima respuesta es altamente recomendable preparar las donantes con un tratamiento hormonal que sincronice su ciclo estral y estimule el desarrollo folicular. Esto permite disponer en el momento de la aspiración de una gran cantidad de folículos sincronizados en un estadio de desarrollo adecuado (2-5mm de diámetro). El tratamiento de estimulación ovárica promueve el crecimiento de los folículos pequeños a folículos de tamaño mayor, lo que conlleva a un incremento en la tasa de recuperación que llega a estar situada entre 55,5 y 79,9% (Baldassarre et al., 1994; Ptak et al., 1999).

En ovejas Rasa Aragonesa adultas y con tratamientos entre 32 y 42 mg de FSHp, Hammami (2008) obtuvo entre 6 y 11 oocitos recuperados por oveja, mientras que Alberio et al. (2002) recuperaron $6,2 \pm 3,8$ oocitos/oveja/sesión, después de la estimulación ovárica con 4,4 mg (5 ml) de NIADDK-oFSH-17 (oFSH) en dosis decrecientes.

Estos procedimientos pueden repetirse 4 veces con intervalos de 7 días (Tervit et al., 1992) o 6 veces con 14 días de intervalo (Anel et al., 1997).

Teniendo en cuenta que la aspiración folicular guiada por laparoscopia es una técnica eficaz y repetible, el inconveniente que presente respecto a otras técnicas de recuperación de oocitos, es que aumenta la pérdida de células del cúmulo al momento de ser aspirado el oocito desde el folículo (Tibary et al., 2005). Esto depende tanto de los materiales utilizados para la aspiración, como el diámetro interno de la aguja y de la tubería o la presión de vacío que se genera (Rodríguez et al., 2006). Debido a la importancia de las células de cúmulo en los resultados de la maduración *in vitro*, se ha comprobado que, utilizando agujas de diámetro 16 G se obtiene una tasa de recuperación del 81,9 % (Baldassarre et al., 1994), mientras que utilizando agujas 23 G la tasa de recuperación es de $45,2\% \pm 17,1\%$ (Alberio et al., 2001).

Además del ganado ovino (Stangl et al., 1999), la técnica LOPU se ha aplicado también en cabras (Pierson et al., 2004), caballos (Brück et al., 1997), y llamas (Brogliatti et al., 2000).

1.2. Ovarios de hembras de matadero

Ha sido la opción más utilizada a la hora de obtener oocitos a gran escala y producir embriones *in vitro* a partir de los mismos (Wani et al., 1999; Wani, 2002). No obstante, en ganado ovino el principal problema es que la mayoría de los sacrificios corresponden a animales impúberes (corderas), mientras que el sacrificio de ovejas adultas es mucho más limitado. Esto hace que el rendimiento de la técnica no sea adecuado, pues la producción de embriones *in vitro* a partir de ovarios de corderas es muy inferior que cuando provienen de ovarios de ovejas adultas (Izquierdo et al.,

2002). No obstante, el obtener oocitos a partir de ovarios de hembras de alto valor genético una vez son sacrificadas es una opción realmente interesante.

Los ovarios se obtienen de mataderos y son transportados al laboratorio en un tiempo no superior a las 3 h una solución salina de PBS a 30-35°C (Pugh et al., 1991). Los oocitos son recolectados por las siguientes técnicas:

- Punción:

Los ovarios se colocan en una placa de Petri con 5 ml de medio de recolección de oocitos, de manera que los folículos de toda la superficie del ovario se pinchan con una aguja hipodérmica calibre 18.

- Corte en rodajas (slicing):

Los ovarios se colocan en placa de Petri con 5 ml del medio de recolección de oocitos, y se realizan incisiones a lo largo de toda la superficie del ovario mediante una hoja de bisturí, ayudando a separar los oocitos de los folículos mediante una aguja.

- Aspiración:

En las 3 técnicas las placas de Petri se dejan reposar durante 5 minutos para que los oocitos caigan al fondo de la placa, lo que facilita su recolección. Por último se examina cada placa de Petri mediante una lupa binocular para valorar el número total de oocitos recolectados y su morfología.

Según Wani et al. (2000) los oocitos se pueden clasificar en buenos, regulares y malos:

- Buenos: Oocitos completos con una gruesa capa de células del cúmulo celular y citoplasma uniforme.
- Regulares: Oocitos con una capa más delgada o incompleta de células del cúmulo y citoplasma uniforme.
- Malos: Oocitos con pocas o ninguna células del cúmulo, o citoplasma no homogéneo.

Es interesante señalar que la morfología del ovario en el momento en que se van a recuperar oocitos es un buen criterio a la hora de evaluar su respuesta en términos de la obtención del mayor número posible de oocitos con la mayor competencia para su desarrollo *in vitro*, y así lo señalan Gandolfi et al. (1997) en ganado bovino. Estos autores clasifican los ovarios en 3 categorías basándose en: A) presencia de un folículo > 10 mm de diámetro; B) presencia de más de 10 folículos de 2-5 mm de diámetro y ningún folículo > 10 mm; y C) presencia de < 10 folículos de 2-5 mm de diámetro y ningún folículo > 10 mm. Gandolfi et al. (1997) observaron que los complejos cúmulo-oocito aislados de ovarios de la categoría C mostraron tasas menores de maduración y de formación de blastocistos que aquéllos aislados de ovarios de las categorías A y B. Además, los blastocistos derivados de la categoría C presentaron menos células que aquellos derivados de las otras 2 categorías. El primer trabajo que se conoce sobre selección de oocitos basándose en sus características morfológicas es el publicado por Leibfried y First (1979) en ganado bovino. Numerosos autores han descrito que la presencia de un cúmulo intacto alrededor del oocito y una apariencia homogénea del ooplasma son indicadoras de oocitos con capacidad para madurar y desarrollarse (Leibfried y First, 1979; Younis et al., 1989; Gordon y Lu, 1990). Por otro lado, diferentes estudios demuestran que los oocitos denudados presentan una capacidad reducida para la maduración, fecundación y posterior desarrollo embrionario (Fukui y Sakuma, 1980; Shioya et al., 1988; Yang y Lu, 1990) en relación a su incapacidad de respuesta a las gonadotrofinas hipofisarias.

2. Maduración *in vitro*

Maduración es la etapa final de un largo proceso de diferenciación en el que el oocito adquiere su capacidad para ser fecundado. La maduración del oocito implica el reinicio de la meiosis y la progresión hacia el estadio de metafase II (maduración nuclear) y una serie de sucesos citoplasmáticos (morfológicos, funcionales y bioquímicos) necesarios para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática) (Eppig et al., 1994). Aproximadamente el 90% de los oocitos inmaduros puestos a cultivar, alcanzan la

metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 h de comenzar la maduración.

La maduración completa (nuclear y citoplasmática) del oocito se apoya sobre una interacción compleja de gonadotrofinas, esteroides y señales foliculares (Osborn y Moor, 1983; Thibault et al., 1987). El inicio de la meiosis se desencadena mediante el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) (Dieleman et al., 1983). *In vitro*, la maduración nuclear se induce espontáneamente cuando los oocitos se liberan del ambiente inhibitorio del folículo y se transfieren a un medio de cultivo adecuado (Thibault et al., 1987).

De esta manera, en ganado ovino los folículos de 2 a 6 mm de diámetro contienen oocitos aptos para la maduración nuclear *in vitro*, por lo que no existe una relación directa entre el tamaño del oocito y su maduración nuclear dentro de dichos límites (Shirazi y Sadeghi, 2007). También parece existir una relación entre el crecimiento del oocito y su capacidad de desarrollo (Otoi et al., 1997) de hecho, Thibault et al. (1987) describieron que el crecimiento del oocito lo capacita progresivamente para reanudar la meiosis, y que la competencia meiótica aparece cuando el oocito presenta un 80-90% de su tamaño máximo, con lo que hasta que no alcanza su máximo tamaño el oocito no es capaz de llegar a la metafase II y completar la maduración. La competencia meiótica de oocitos procedentes de folículos de diferentes tamaños se ha investigado en varias especies, y se ha demostrado que los oocitos adquieren la capacidad de realizar la maduración meiótica cerca del final de su fase de crecimiento, tras alcanzar un tamaño específico (en ratones: Sorensen y Wassarman, 1976; en humana: Durinzig et al., 1995; en perra: Hewitt y England, 1998). Por lo que a la maduración nuclear se refiere, hay que señalar que *in vivo*, los oocitos de la mayoría de los mamíferos se encuentran en diplotene de la profase de la meiosis, hasta que se produce la adecuada estimulación mediante factores de crecimiento y hormonales que desencadenan la progresión de estos oocitos al estadio M-II, fase en la que quedarán los oocitos de los rumiantes hasta que se produzca la fecundación (Mermillod, 2002). El potencial para la maduración nuclear se adquiere en concomitancia con el desarrollo del folículo, y se ha comprobado en el ovino que los

folículos 2 a 6 mm de diámetro contienen oocitos completamente aptos para la maduración nuclear *in vitro* (Shirazi y Sadeghi, 2007).

Respecto a la maduración citoplasmática, se trata de un conjunto de cambios que se produce al nivel del citoplasma y que incluyen tanto procesos fisiológicos como una serie compleja de modificaciones morfológicas, tales como la migración de gránulos corticales en la región periférica del ooplasma (revisado por Hyttel et al., 1997) y la expansión de las células del cúmulo. Se ha demostrado (Trounson, 1992) que a pesar de que los oocitos maduros a nivel nuclear pueden ser fecundados, estos pueden ser incompetentes para el desarrollo embrionario posterior si la maduración citoplasmática no se ha completado. No obstante, la maduración citoplasmática también influye en la preparación del oocito para ser fecundado con éxito (Mermillod et al., 1999).

2.1. Medios de maduración

Los parámetros biofísicos más importantes a controlar en los medios de producción *in vitro* de embriones son los siguientes:

- Osmolaridad: Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/kg favorecerían el desarrollo embrionario (Duque et al., 2003).
- pH: La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, obteniéndose los mejores resultados entre pH 7,2 y 7,6.
- CO₂ y O₂. La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración oocitaria y fecundación, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.

El medio de maduración más utilizado es el TCM-199. Este medio se complementa con una serie de suplementos que lo acercan a las condiciones

óptimas similares a las de maduración *in vivo*. Dentro de estos suplementos podemos citar:

- Gonadotrofinas y esteroides:

En general, se acepta que las gonadotrofinas juegan un papel principal en la estimulación del reinicio de la meiosis y en la expansión del cúmulo oóforo *in vivo* (Eppig, 1980). Sin embargo, es posible que otros factores hormonales también influyan asimismo sobre la maduración meiótica de los oocitos de mamíferos durante el período preovulatorio. Por ejemplo, el estradiol es uno de los factores que pueden estimular el desarrollo folicular y el crecimiento de las células de la granulosa *in vivo*, aunque no actúa como mitógeno para las células de la granulosa *in vitro*. Sin embargo, no es necesaria la adición de estradiol a los medios que ya contienen un fluido biológico como el fluido folicular (Guler et al., 2000). Por otra parte, la suplementación del medio de MIV con progesterona incrementa el porcentaje de espermatozoides penetrantes que forman pronúcleos masculinos (Mattioli et al., 1988). Además, se ha comprobado que la proteína acídica del fluido seminal bovino estimula la secreción de progesterona por parte de las células de la granulosa bovina *in vitro* (Einspanier et al., 1991). Teniendo en cuenta ambos datos, Funahashi y Day (1993) hipotetizaron que la producción de progesterona en las células somáticas alrededor de los oocitos porcinos debía estar estimulada por el fluido seminal y, en consecuencia, la tasa de formación del pronúcleo masculino debería mejorar.

Mattioli et al. (1988) mostraron que los esteroides (en particular la progesterona) secretados por las células foliculares eran responsables de la maduración citoplasmática oocitaria, mientras que Ding y Foxcroft (1992) sugirieron que otros factores foliculares estaban también implicados, ya que análisis detallados no mostraron correlaciones entre las concentraciones de esteroides secretadas por las células foliculares durante la maduración oocitaria y las tasas de formación del pronúcleo masculino. La adición de gonadotrofinas al medio de maduración no afectó la producción de estradiol por las células foliculares, pero sí elevó en gran proporción la de progesterona (Ding y Foxcroft, 1994), mientras que la adición de

células foliculares al cultivo es capaz de incrementar la secreción de estradiol pero sin modificar la producción de progesterona.

- Sueros:

El suero es una combinación compleja de componentes que incluye proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, elementos traza y factores de crecimiento. El suero actúa como una fuente de albúmina que equilibra la osmolaridad y elimina moléculas potencialmente perjudiciales e iones metálicos que pueden actuar como fuente de radicales libres de oxígeno. La suplementación de los medios de maduración con suero se ha utilizado de forma regular en los sistemas de maduración *in vitro* para proporcionar una fuente de proteínas y energía al oocito durante la maduración. Las formas de suero bovino empleadas con más frecuencia han sido el suero fetal bovino (FCS), el suero bovino de macho castrado (SS), el suero de vaca u oveja en estro (ECS ó OCS), suero de vaca en proestro y suero de vaca superovulada (revisado por Gordon, 1994). En conjunto, el papel del suero en el reinicio de la meiosis y en la maduración oocitaria ha sido demostrado en varias especies (ratón: Ducibella et al., 1990; bovino: Fukui et al., 1982; Younis et al., 1989).

- Factores de Crecimiento (EGF, IGF-I):

En estudios realizados en bovinos, se demostró que añadiendo al medio de maduración de oocitos tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), se consigue aumentar el porcentaje de maduración nuclear y se promueve la formación del pronúcleo masculino y la expansión de las células del cúmulo (Lonergan et al., 1996). Estos suplementos proporcionan un incremento en la tasa de maduración y una optimización en la formación de blastocistos (21% vs 13,4% en el control) obtenidos a partir de oocitos de ovejas tratadas con FSH (Guler et al., 2000).

- Fluido Folicular:

Durante la maduración *in vivo*, los oocitos están bañados en fluido folicular, que contiene hormonas esteroideas, gonadotrofinas y factores de crecimiento (Ainsworth et al., 1980). En la literatura, los estudios del efecto del fluido folicular

sobre la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro* son contradictorios. Algunos autores han mostrado que es inhibitorio, mientras que otros han evidenciado que es un activador de la maduración del oocito a nivel citoplasmático. En ovinos, la suplementación del medio MIV con fluido folicular, en proporción del 10 al 20% y con FSH, es capaz de mejorar el desarrollo embrionario (Cognie, 1999).

Parece demostrado que el fluido folicular contiene sustancias que mejoran la tasa de expansión del cúmulo la maduración nuclear y la fecundación y desarrollo embrionario (Yoshida et al., 1992). Estos resultados confirman los de Naito et al. (1988) en porcino en cuanto a la eficacia de la adición de fluido folicular al medio de MIV sobre la maduración nuclear, pero existen contradicciones en cuanto a su efectividad para promover la formación del pronúcleo masculino. Asimismo, en bovino se ha podido comprobar que el fluido folicular, añadido al medio de MIV, mejora el desarrollo embrionario de manera similar al suero (Carolan et al., 1996). Diversos estudios han intentado caracterizar la composición y examinar el efecto de la presencia del fluido folicular durante la maduración oocitaria sobre el posterior desarrollo embrionario (Lonergan et al., 1994; Romero-Arredondo y Seidel Jr, 1994; Carolan et al., 1996). El propio tamaño del folículo, un indicador del desarrollo folicular, puede modificar las propiedades beneficiosas o perjudiciales del fluido folicular en términos de capacidad de desarrollo del oocito. En pequeños rumiantes, la adición de fluido folicular al medio de maduración, en presencia de EGF o FSH, no aumentó la tasa de maduración nuclear pero estimuló la maduración citoplasmática, ya que mejoró las tasas de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* en ovino (Guler et al., 2000) y caprino (Cognie, 1999). Por su parte, Sun et al. (1994) observaron que el fluido folicular ovino o incluso humano mejoraba la maduración, fecundación y posterior desarrollo de los oocitos ovinos en relación al tratamiento con FCS. Del mismo modo y suplementando el medio de maduración con un 10% de fluido folicular obtenido a partir de folículos grandes de cabras tratadas con eCG, (Cognie, 1999) obtuvo un incremento en la producción de blastocistos de cabras adultas respecto al medio suplementado con fluido folicular proveniente de folículos grandes de cabras no tratadas (43% versus 32%). Además, este hallazgo se confirmó usando tres lotes diferentes de fluido folicular que contenían elevadas concentraciones de estradiol (2000 ng/ml), por lo que parece que se debe al efecto

positivo del estradiol (inducido gracias a un tratamiento hormonal, con eCG o FSH) sobre los parámetros *in vitro*.

- Cisteamina:

Es un tiol de bajo peso molecular que aumenta el contenido intracelular de GSH (glutati3n reducido), un potente antioxidante (Takahashi et al., 1993). As3, De Matos et al. (1995; 1996) demostraron que la adici3n de cisteamina al medio de maduraci3n produc3a un incremento del contenido de GSH en oocitos bovinos y una mejora en la tasa de desarrollo celular hasta blastocisto. Estos resultados eran consistentes con las hip3tesis de Issels et al. (1988), seg3n las cuales compuestos tioles de bajo peso molecular como la cisteamina, deb3an reducir la cistina a ciste3na cuando estaban presentes en el medio de maduraci3n, aumentando la s3ntesis de GSH. Sin embargo, en el estudio de De Matos et al. (1996) no se hall3 ning3n efecto aditivo al a3adir al medio de maduraci3n ciste3na y cisteamina conjuntamente. Estos autores concluyeron que el incremento en la s3ntesis de GSH provocado por la cisteamina proporcionaba a los oocitos madurados *in vitro* una cierta protecci3n hasta el estadio de blastocisto, incrementando la eficiencia de la producci3n de blastocistos a partir de oocitos inmaduros. Posteriormente, De Matos et al. (1997) demostraron que la adici3n de cisteamina al medio de maduraci3n produc3a un incremento en el nivel de GSH intracelular tanto en los complejos c3mulo-oocito como en oocitos desnudados. Sin embargo, este efecto mejoraba cuando los oocitos estaban rodeados por c3lulas del c3mulo, pues conten3an m3s GSH que los oocitos desnudados.

3. Fecundaci3n *in vitro*

La fecundaci3n *in vitro* (FIV) consiste en exponer los oocitos ya maduros a los espermatozoides capacitados para ser fecundados fuera del tracto genital femenino. Una vez madurados, los oocitos son sometidos a repetidos lavados a trav3s de un pipeteado con el fin de eliminar los c3mulos expandidos de alrededor de los oocitos y facilitar as3 la penetraci3n del espermatozoide. Estos oocitos se colocan en una placa de Petri y se los expone al semen ya evaluado, entre 15 a 18 h a 39°C, bajo humedad controlada y atm3sfera condicionada (5% de CO₂ en aire).

El porcentaje de fecundación suele estar sobre el 80%, y tras la fecundación se inicia la división, al menos hasta el estadio de 2 a 4 células (Mucci et al., 2006). El proceso de fecundación determina el final de la división meiótica que culmina con la exclusión del segundo corpúsculo polar, y se produce la formación de los dos pronúcleos, el masculino y el femenino, cada uno aportando la mitad de la dotación genética del futuro individuo. Otros rasgo utilizado como signo de éxito de la FIV son la presencia de 2 corpúsculos polares en el espacio perivitelino y la división y formación de 2 blastómeros, de igual forma y tamaño y sin fragmentación. En los trabajos de FIV, a las 48 de cocultivo de los gametos se suele valorar el número de divisiones celulares de los embriones, que pueden tener de 2 a 8 células, como un suceso que indica el ritmo de división normal (Harstone, 2000).

El semen debe estar seleccionado y capacitado para fecundar. La selección de espermatozoides se puede realizar por el método de migración ascendente (*swim-up*), o sometiendo a los espermatozoides a un gradiente de Percoll (45% / 90%) o bien mediante centrifugación por 20 minutos a 500-700g.

3.1. Selección de espermatozoides y capacitación:

- Selección de espermatozoides por Swim-up:

Como su nombre lo indica, esta técnica se refiere a “nadar hacia arriba”, y consiste en depositar la muestra de esperma en el fondo de un tubo de ensayo que contiene un medio de fecundación. Los mejores espermatozoides nadaran hacia arriba, mientras que el plasma y los espermatozoides muertos quedan en la parte inferior del tubo, por lo que se recoge el sobrenadante que será utilizados para fecundar los oocitos. Este proceso permite seleccionar espermatozoides libres de plasma seminal, con alta motilidad y viabilidad (García-López et al., 1996).

- Selección de espermatozoides por Percoll:

En el método Percoll, la separación de los espermatozoides viables se basa en el hecho de que el esperma con membranas intactas no pierde su contenido celular y, al ser más pesado, se asienta en el fondo del tubo tras la centrifugación,

por lo que los espermatozoides vivos se obtendrán del fondo del tubo y en la parte superior quedarán todas las células muertas (Tibary et al., 2005).

3.2. Capacitación y sustancias capacitantes:

La capacitación espermática la podemos definir como un proceso necesario e indispensable para que los espermatozoides sean capaces de fecundar al oocito. En la actualidad se sabe que la capacitación es un proceso de desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide con eliminación o alteración de sustancias absorbidas en la misma, la que va a ocasionar un incremento en el influjo de Ca^{2+} al interior del espermatozoide (Yanagimachi, 1988). La capacitación también va a preparar al espermatozoide para experimentar la reacción acrosómica y penetrar a través de la zona pelúcida del oocito.

Hay distintas sustancias que han demostrado que pueden inducir la capacitación:

- Albúmina sérica bovina:

Se considera un componente esencial de los medios de capacitación *in vitro*. La función que se le atribuye es la de eliminar el colesterol de la membrana plasmática (Visconti et al., 2002). La salida del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide parece iniciar una vía de transducción en el proceso de capacitación (Visconti y Kopf, 1998).

- Heparina:

La heparina ha demostrado mejorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides en el ganado ovino y caprino. La heparina promueve la capacitación de los espermatozoides por mecanismos aún no bien comprendidos, pero que parece ser que dependen de la adsorción de las proteínas seminales del eyaculado. Se cree que la heparina podría eliminar las sustancias no capacitantes que se adhirieron a la membrana plasmática de los espermatozoides como la calmodulina, que a su vez, facilitaría la entrada de calcio a la célula. Además, se

sabe que el calcio es necesario para permitir el efecto de la heparina sobre capacitación.

Se ha demostrado heparina que estimula la penetración de los espermatozoides de ovinos en los oocitos madurados bajo condiciones *in vitro*. La heparina que se utiliza actualmente en la FIV se obtiene como una sal de sodio, por lo general la mayoría de mucosa intestinal porcina y de otros tejidos de los animales domésticos. La inducción de capacitación de los espermatozoides por la heparina estaría parece estar relacionada con el contenido de sulfato de la molécula (Cox et al., 1995).

3.3. Anomalías de la FIV:

Los oocitos madurados *in vitro* de mamíferos presentan a menudo deficiencias en su citoplasma, manifestadas por una baja frecuencia de formación del pronúcleo masculino, una baja incidencia de la primera división tras la fecundación y una baja competencia de desarrollo hasta el estadio de blastocisto, todo ello en relación a los oocitos madurados *in vivo* (Rose y Bavister, 1992; Funahashi et al., 1994).

Las anomalías en la fecundación de los oocitos madurados y fecundados *in vitro* son debidas probablemente a insuficiencias en la maduración citoplasmática (Pavlok et al., 1988). Los eventos nucleares, la ruptura de la vesícula germinativa y formación del corpúsculo polar parecen ocurrir de manera normal, pero la fecundación, división y desarrollo embrionario temprano no son exitosos. Esta interrupción del desarrollo podría ser resultado de una maduración citoplasmática incompleta. Los oocitos maduran mejor *in vivo* que *in vitro*, lo cual podría sugerir que se requieren factores hormonales y/o foliculares adicionales para mejorar la maduración y obtener tasas de fecundación y desarrollo normales.

Se ha comprobado que la zona pelúcida de los oocitos madurados *in vitro* presenta deficiencias en lo que a la penetración por espermatozoides capacitados se refiere (De felici y Siracusa, 1982; Zhang et al., 1991). Incluso, aunque la capacidad de la zona pelúcida para ser penetrada puede adquirirse mediante cambios en las

condiciones de maduración, los oocitos madurados *in vitro* no adquieren la competencia total para la fecundación. No solamente es menor la formación del pronúcleo masculino comparado con los oocitos madurados *in vivo*, sino que la formación de ambos pronúcleos es asincrónica (Laurincik et al., 1994), por lo que se ha sugerido de estos resultados que los oocitos madurados *in vitro* carecen del factor de crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF) (Thibault, 1972). La penetración poliespérmica se ha asociado a una reacción cortical deficiente que causa un bloqueo ineficiente del sistema contra la poliespermia. Las causas de la poliespermia bajo condiciones *in vitro* han sido atribuidas a un retraso o una disfunción de la exocitosis de los gránulos corticales y a una distribución irregular de dichos gránulos (Cran y Cheng, 1986; Hyttel et al., 1986). Cran y Cheng (1986) también sugieren que, tras la FIV, no estaban disponibles los constituyentes vitales de los gránulos corticales, probablemente en una forma cimógena, por interacción con la zona pelúcida. La poliespermia es un problema frecuente en los oocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*, menos frecuente en los bovinos y poco frecuente en ovinos. En vaca, Hyttel et al. (1989) propusieron que la poliespermia podría ser debida a un retraso en la migración periférica de los gránulos durante la FIV o a una liberación reducida o retrasada de sustancias específicas de los gránulos corticales debido a unas condiciones de cultivo inapropiadas durante la FIV.

4. Cultivo embrionario *in vitro*

Constituye la última etapa de la producción *in vitro* de embriones, en la que los embriones obtenidos tras la maduración y fecundación *in vitro* de los oocitos se cultivan, también *in vitro*, hasta el estadio de blastocisto. El medio de cultivo más utilizado es el fluido oviductal sintético (SOF). En algunos casos se le puede agregar suero fetal bovino y/o albúmina sérica bovina como suplemento proteico y de factores de crecimiento. A las 24 h de la fecundación, los embriones se lavan repetidas veces en SOF con el fin de eliminar los espermatozoides y restos de células adheridas. La división celular y la presencia de los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino son signos del éxito de la FIV. Así, los embriones se

clasifican en divididos y no divididos y se colocan agrupados en pocillos con medio de maduración. El cultivo de embriones en volúmenes reducidos favorece significativamente el desarrollo a blastocisto y el número de células de los blastocistos por la interacción cooperativa entre los embriones, que liberarían factores de crecimiento que favorecerían su desarrollo (Gardner et al., 1994). A las 48 h tras la fecundación se suelen volver a evaluar los no divididos y si han tenido éxito, se pasan al pocillo de los divididos. En general, únicamente el 25-40% de los embriones ya fecundados alcanza el estadio de blastocisto detrás un periodo de cultivo de 6-7 días. Por tanto, el cultivo embrionario, que es el paso más prolongado dentro del proceso de producción *in vitro*, es el período en el que tiene lugar el mayor porcentaje de pérdidas del sistema (Mucci et al., 2006).

Los embriones se cultivan o bien en 5% de CO₂ y en cocultivo con células de la granulosa (Doherty et al., 1997), o en 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ en atmosfera saturada de humedad y temperatura de 38,5 a 39°C, durante 7 a 8 días, y con un pH de 7,2 a 7,4. En este sentido, distintos autores señalan un beneficio en la reducción de la concentración de O₂ para el desarrollo embrionario *in vitro* (Leoni et al., 2007).

Los parámetros que se deben controlar en los medios de cultivo son:

- Osmolaridad: Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/kg favorecerían el desarrollo embrionario (Duque et al., 2003).
- pH: La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados en un pH de 7,2 y 7,6.
- CO₂ y O₂: Los embriones ovinos necesitan una baja tensión de O₂ para su desarrollo, por los que se recomienda una atmósfera de 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ o un cocultivo con células somáticas para su desarrollo *in vitro*.
- Concentración de sales: El fluido oviductal bovino y ovino se caracteriza por bajos niveles de Na⁺ y altos niveles de K⁺, comparados con los niveles

plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como el magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos.

- El agua es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario (Marquant-Leguienne y Humblot, 1998).

5. Uso de la melatonina en los procedimientos de producción *in vitro*:

La melatonina es una hormona ampliamente utilizada en la reproducción ovina, debido a su capacidad de revertir los efectos del anoestro estacionario aumentando la tasa de ovulación, la función luteal y la viabilidad embrionaria (Abecia et al., 2008). La presencia de melatonina en el fluido folicular ovárico humano (Brzezinski et al., 1987) y de receptores de la misma en las células de la granulosa en diversas especies (Na et al., 2005; Kang et al., 2009) sugieren un efecto directo de esta hormona sobre la competencia del oocito.

Los estudios del efecto de la presencia de la melatonina en la producción *in vitro* en ovinos y otras especies son muy escasos. El efecto positivo de la adición de la melatonina en los procedimientos *in vitro* ha sido mencionado sobre todo en la especie humana (Park et al., 2006) y en ratones (Na et al., 2005; Ishizuka et al., 2000). En el primer caso, se ha visto que la adición de melatonina a los medios de producción de embriones *in vitro* tiene un efecto positivo sobre la maduración del oocito humano y sobre la fecundación de los oocitos maduros (Park et al., 2006). En ratones, la adición de melatonina a los medios estimula la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Ishizuka et al., 2000; Na et al., 2005). Incluso, Dimitriadis et al. (2005) mostraron un efecto positivo de la melatonina sobre la maduración de oocitos bovinos al ser añadida al medio. No obstante, el efecto positivo de la melatonina cuando se añade a los medios de maduración o fecundación parece ser dosis-dependiente. Así, Adriaens et al. (2006) mostraron que, si bien la toxicidad de la melatonina es relativamente baja, la maduración de

oocitos de ratón se ve notablemente penalizada por concentraciones de melatonina iguales o superiores a 10^{-3} M.

En ganado ovino apenas existen referencias relativas al uso de la melatonina en los procedimientos de producción de embriones *in vitro*. Recientemente, Casao et al. (2007) mostraron que la adición de melatonina 10^{-5} M. a los medios de maduración, fecundación y cultivo para la producción de embriones *in vitro* a partir de oocitos ovinos, no mejoró los porcentajes de maduración o fecundación, e incluso penalizó ligeramente el porcentaje de blastocistos obtenidos. Es posible que la dosis de melatonina utilizada tuviera algo que ver, pues menores concentraciones de la hormona pineal fueron capaces de mejorar las tasas de maduración y de división embrionaria temprana en ensayos posteriores (Casao et al., datos sin publicar).

EXPERIMENTO I

EXPERIMENTO I

EFFECTO DE LA SIMPLIFICACIÓN DE LOS PROTOCOLOS SIMPLIFICADOS DE SUPEROVULACION SOBRE LA VIABILIDAD DE EMBRIONES OVINOS

Tal y como ya se ha indicado con anterioridad, el objetivo de este experimento fue evaluar la viabilidad de un tratamiento simplificado de superovulación para la producción de embriones *in vitro* en ovejas de raza Ojalada Soriana. En concreto, dicho objetivo puede ser desglosado en dos:

- Evaluar la eficacia del tratamiento superovulatorio de una única inyección de FSH+eCG sobre la producción y viabilidad de embriones en relación al clásico tratamiento de 6 inyecciones de FSH.
- Analizar la eficiencia de la aplicación repetida de dicho tratamiento y su posible relación con los niveles de anticuerpos generados frente a la eCG

I. MATERIALES Y METODOS

1. Material animal:

En este experimento se utilizaron 38 ovejas adultas de de raza Ojalada Soriana, procedentes del rebaño experimental de la Excm. Diputación Provincial de Soria en San Esteban de Gormaz. Su edad media era de $7,87 \pm 0,34$, siendo su media de partos anteriores de $5,77 \pm 0,28$.

El experimento se desarrolló entre septiembre de 2008 y marzo de 2009 en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por la Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El manejo de los animales estuvo de acuerdo a la normativa española de Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos (RD 1201/05), que sigue la Directiva 86/609 de la Unión Europea con el mismo nombre.

Para facilitar el trabajo, los animales fueron divididos en 5 lotes de 7-8 ovejas; en cada lote se distinguieron 2 grupos según el protocolo de superovulación administrado, el simplificado (S) y el decreciente (D)

2. Sincronización y superovulación:

En todos los lotes se realizaron las mismas operaciones, se repitieron en tres tandas separadas entre sí por 7-8 semanas. El protocolo de sincronización fue el mismo para todos los animales independientemente del protocolo de superovulación recibido.

El cronograma fue el siguiente:

- Día -7: Extracción de sangre para medir los niveles de progesterona, que junto con la toma de la semana siguiente iban a servir para evaluar si las ovejas estaban cíclicas en el momento de la colocación de la esponja vaginal.
- Día 0: Segunda extracción de sangre para la determinación de los niveles de progesterona y colocación de esponjas vaginales conteniendo 30 mg de FGA (Sincropart®, CEVA Salud Animal). En el grupo que recibió el protocolo simplificado, la muestra de sangre también fue utilizada para determinar los niveles de anticuerpos de eCG previos al tratamiento de superovulación.
- Día 7: Cambio de las esponjas vaginales para mantener un nivel alto de progestágeno.
- Día 12: A partir de ese día comenzaron los tratamientos de superovulación (48 horas antes de la retirada de las esponjas).

Las ovejas del grupo S (n = 19) recibieron 6 ml (210 UI) de FSHp (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Irlanda) vía intramuscular conjuntamente con 500 UI de eCG (Sincropart™, CEVA Salud Animal, España). La FSH es un preparado a base de extracto hipofisario porcino. Cada vial de polvo liofilizado contiene FSH equivalente a 700 UI y se reconstituye en 20 ml de una solución de cloruro sódico bacteriostática al 0,9%.

Las ovejas del grupo D (n = 19) recibieron 8 ml (280 UI) de FSHp (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Irlanda) vía intramuscular administrados en un total de 6 inyecciones decrecientes (2ml, 1,5ml, 1,25ml, 1,25ml, 1ml, 1ml) cada 12 horas (a las 8:00 horas y a las 20:00 horas).

- Día 14: Retirada de la esponja vaginal a los dos grupos a las 8:00 horas.
- Día 15: A partir de ese día comenzó la detección de celos (8:00 horas, 24 horas a partir de la retirada de la esponja), que tuvo lugar cada 4 horas hasta las 36 horas y a partir de las 48 horas hasta las 60 horas. Se realizó monta natural con machos Ojalados procedentes del mismo rebaño que las ovejas del experimento. Los moruecos eran sustituidos cada 12 horas y estaban equipados con arnés marcador para ayudar en las tareas de detección de celo y de la efectividad de las montas.
- Día 21: Ayuno.
- Día 22 (Correspondiente al día 8 tras el inicio de los celos): Recuperación de embriones por laparotomía.

Entre 7 y 8 semanas después se volvió a repetir todo el proceso para realizar una segunda y luego una tercera tanda de extracción de embriones siguiendo el mismo protocolo, de manera que en las repeticiones cada oveja recibió el mismo tratamiento de superovulación que la primera.

3. Recuperación de embriones:

La recuperación de embriones se realizó mediante laparotomía, lavando el útero con PBS a través de una sonda Foley a los 8 días tras la retirada de las esponjas. Previamente, las ovejas se sedaron con una inyección intramuscular de

0,5 ml de Xilacina al 2% (Rompún, Bayer, España), y luego se anestesiaron por una inyección intravenosa de 8-10 ml de Tiopental Sódico (Tiobarbital, Braun, España) (20 mg/ml). Este protocolo permitió mantener la anestesia durante todo el tiempo de la recuperación.

Una vez anestesiado, el animal se colocó sobre una mesa de sujeción en decúbito dorsal (**Figura 3**) con una inclinación anteroposterior de 30 a 45 °. Se afeitó, se lavó cuidadosamente el campo operatorio y se desinfectó con yodo. Se realizó una incisión de 5-7 cm del abdomen a nivel de la línea blanca por delante de la ubre, para permitir la exteriorización de los ovarios y cuernos uterinos y contar los cuerpos lúteos para contrastar la respuesta ovulatoria. (**Figura 4**).



Figura 3: Colocación del animal en la mesa de sujeción en decúbito dorsal.



Figura 4: Exteriorización del útero y recuento de los cuerpos lúteos.

El lavado de cada cuerno se realizó separadamente. Se efectuó una punción en la base del cuerno, a nivel del ligamento intercornual, por la cual se introdujo un catéter Foley (**Figura 5**). Así, la luz uterina se obstruyó por el inflado de la ampolla situada en el extremo del catéter (**Figura 6**). En el extremo opuesto del cuerno, cerca de la unión útero-tubárica, se realizó una segunda punción (**Figura 7**), para introducir un catéter en la luz uterina por el cual se inyectó el medio de lavado (10 ml de PBS a 37°) (**Figura 8**), que se recuperó en el extremo opuesto del cuerno a través de la sonda Foley en una placa Petri. El PBS de lavado llevaba piruvato (0,3 mM) y penicilina-estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml respectivamente).



Figura 5: *Inserción de la sonda Foley para lavado (a nivel del ligamento intercornual).*

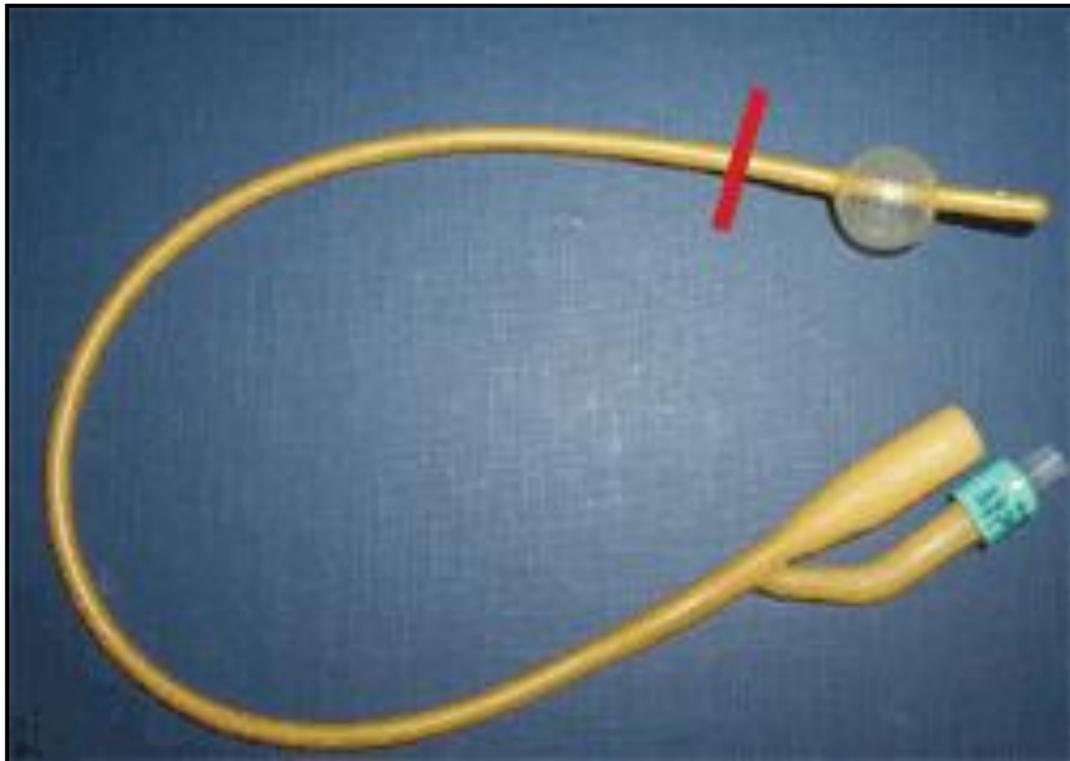


Figura 6: *Ampolla de la sonda Foley inflada para la obstrucción de la luz uterina.*



Figura 7: *Inserción de la sonda Foley para lavado (a nivel da la unión útero-tubárica).*

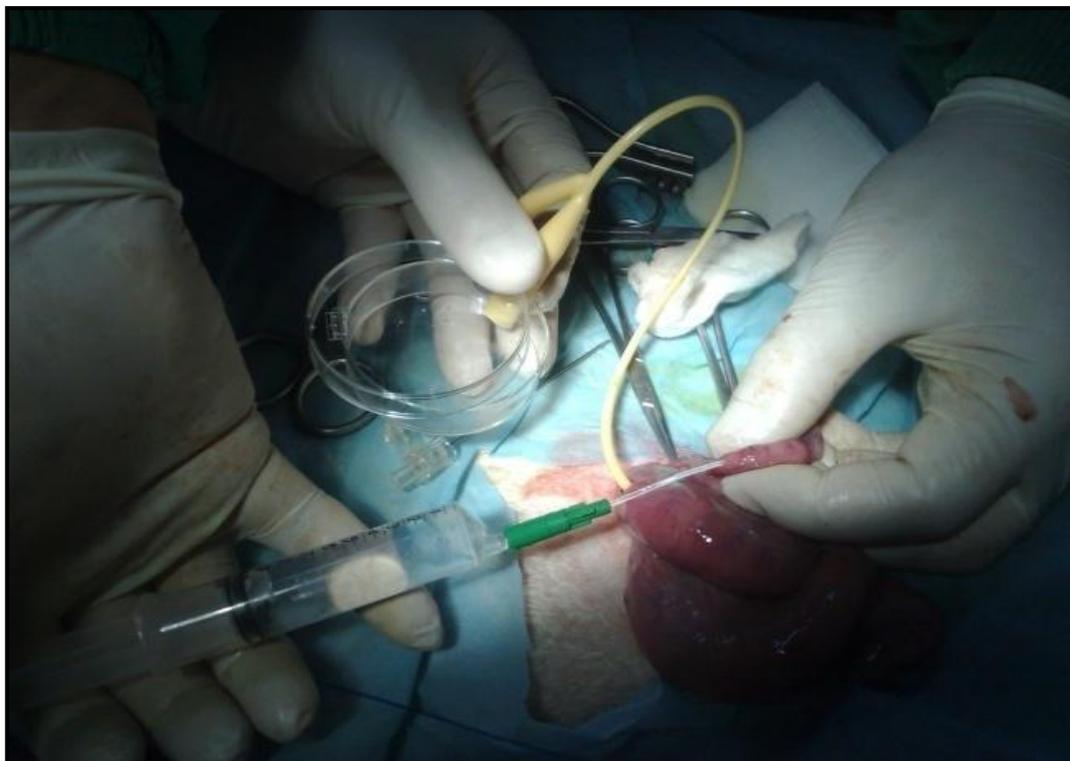


Figura 8: *inyección del medio de lavado en la luz del cuerno uterino.*

Una vez el lavado de los dos cuernos terminado, se reintrodujo el tracto en la cavidad abdominal, y se lavó con una solución de suero fisiológico con heparina al 2,5% para evitar las adherencias, aplicándose antibióticos en la zona para evitar las infecciones. Se suturó el peritoneo y la capa muscular con una sutura reabsorbible, y finalmente se cerró la piel con suturas y grapas. A los animales se les inyectó un antibiótico y un anti-inflamatorio vía intramuscular así como y prostaglandinas (2 ml; Dinolytic, Pfizer, España) vía intravulvar para inducir la regresión de los cuerpos lúteos existentes y evitar la implantación de los embriones no recuperados.

Los embriones se identificaron y evaluaron mediante una lupa binocular a 20 y 40 aumentos, de acuerdo a su estadio de desarrollo y a su morfología (Wintenberger-Torres y Sevellec, 1987), de manera que se consideraron como viables las mórulas compactas y los blastocistos jóvenes, expandidos y eclosionados (Forcada et al., 2006), siempre y cuando no tuvieran imperfecciones y mostraran una forma esférica y simétrica, de acuerdo con los criterios de valoración morfológica de Linder y Wright (1983). Por lo demás y dado que tanto los blastocistos (Széll y Windsor, 1994; Naitana et al., 1995; 1997) como las mórulas compactas (Martinez y Matkovic, 1998) mantienen una muy buena viabilidad tras la vitrificación, ambos estadios, excepto los blastocistos totalmente eclosionados, fueron considerados aptos para ser conservados mediante la citada técnica.

4. La vitrificación:

Los embriones fueron vitrificados de acuerdo con el protocolo de Naitana et al. (1997), de manera que todos los medios de vitrificación y descongelación fueron preparados con PBS de lavado suplementado con alcohol polivinilo (PVA) (50mg de PVA/50ml de PBS). La sustitución del suero fetal bovino (FCS) en los medios de congelación por una macromolécula inerte como el PVA obedece a reducir posibles problemas de contaminación y aquellos derivados del “Large Offspring Syndrome” que induce el FCS. Se ha visto que apenas existen diferencias de viabilidad embrionaria con dicha sustitución (Naitana et al., 1997). Los procedimientos de vitrificación fueron desarrollados a 37°C y en varias etapas de equilibrio con los diferentes crioprotectores:

- 1^{ra} Etapa: Los embriones congelables se colocaron en una placa con PBS suplementado con PVA durante 15 min para permitir el equilibrio y protección de la membrana del embrión.
- 2^{da} Etapa: Los embriones son transferidos a 100 μ l de una solución de glicerol 1,4 M, donde permanecen 5 minutos.
- 3^{ra} Etapa: Los embriones son transferidos a otros 100 μ l de otra solución con glicerol 1,4 M y etilenglicol 3,6 M durante otros 5 minutos.
- 4^{ta} Etapa: Los embriones son finalmente transferidos a la solución de vitrificación conteniendo glicerol 3,4 M y etilenglicol 4,6 M, donde deben permanecer no más de 30 segundos antes de ser congelados mientras se transfieren a una pajuela de 0,25 ml.

En la pajuela se cargan 2-3 embriones en su solución de vitrificación (25 μ l), separados por aire de las dos columnas de sacarosa 0,5 M (90 μ l cada una) que los protegerán en la descongelación (**Figura 9**).

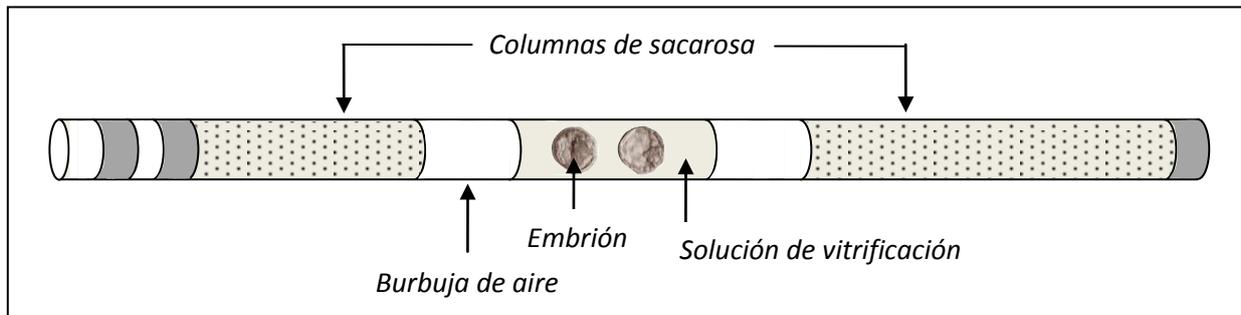


Figura 9: Representación esquemática de una pajuela de vitrificación.

Inmediatamente tras el sellado de la pajuela, se sumergió ésta en nitrógeno líquido, primero la mitad durante 20-30 segundos y luego el resto. Este protocolo permite prevenir las roturas de pajuelas causada por la rápida congelación. Las pajuelas se guardaron en el nitrógeno líquido hasta la descongelación.

5. Descongelación:

Para la descongelación a la temperatura biológica, las pajuelas se pasaron del nitrógeno líquido a un baño de agua a 35°C durante 10 segundos. Pasado este tiempo, el contenido de la pajuela se vertió en una placa Petri mezclando suavemente la solución de vitrificación con los embriones con la sacarosa durante no más de 30 segundos. Luego, se recuperaron los embriones y se transfirieron a una solución de sacarosa 0,25 M en PBS de lavado suplementada con 20% de FCS y a 37°C durante 3 minutos para permitir la eliminación del crioprotector. Tras una posterior permanencia de 10 min en una solución de PBS de lavado con 20% de FCS a 39° C para rehidratación y equilibrado (Naitana et al., 1997), los embriones fueron cultivados para permitir su reexpansión.

6. Evaluación de la viabilidad *in vitro*:

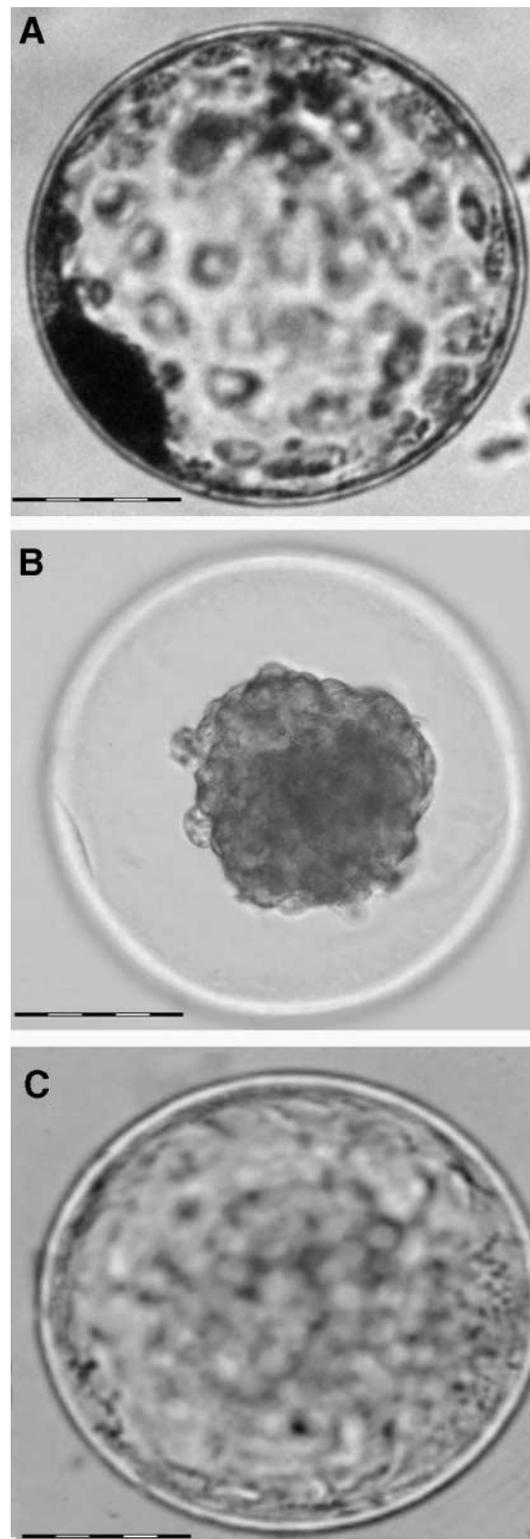


Figura 10: Blastocisto expandido como los utilizados en el presente experimento. A, antes de la vitrificación; B, justo tras la vitrificación y descongelación; C, completamente reexpandido tras el cultivo (adaptado de Leoni et al., 2007).

Tras la descongelación, los embriones se cultivaron en TCM199 complementado de 10% de FCS y L-glutamina 1mM en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 39°C. Se evaluaron los embriones cada 12 horas, y se consideraron como viables los que se reexpandieron y recuperaron el diámetro que tenían antes de la congelación (Leoni et al., 2007) (**Figura 10**), pues para determinar la viabilidad únicamente se descongelaron blastocistos.

Además de la reexpansión, la calidad de los blastocistos se determinó mediante una doble tinción de Hoechst 33342 (**Figura 11**) y dichlorodihidrofluorescein diacetato (DCFDA) (**Figura 12**). El Hoechst es un colorante fluorescente con afinidad al DNA, lo que permite contar el número de células de los embriones, mientras que el DCFDA nos permite determinar en nivel del daño oxidativo determinando la cantidad de H₂O₂ producida por los embriones. El nivel de daño oxidativo puede ser medido por la fluorescencia emitida por el 2', 7'-diclorofluoresceno diacetato (DCF). Esta fluorescencia se genera por la oxidación del 2', 7'-dichlorodihidrofluorescein (DCHF) por el H₂O₂. DCHF es un compuesto que tiene la capacidad de emitir fluorescencia cuando se oxida con H₂O₂ a 2', 7'-diclorofluoresceno diacetato (DCF), que a su vez está formado por la esterasa intracelular del 2', 7'-dichlorodihidrofluorescein diacetato (DCHFDA) (Nasr-Esfahani et al., 1990).

Tras el cultivo *in vitro*, los blastocistos se fijaron con glutaraldehído al 1,5% y luego se transfirieron a un medio con 10 µM de DCHFDA (dichlorodihidrofluorescein diacetate). Tras un cultivo de 20 minutos, los blastocistos se tiñeron con HOECHST 33342 (10 µg/ml) durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, los blastocistos se montaron en portaobjetos con medio de montaje CC-Mount (Sigma-Aldrich, Co, España), y se contaron las células en un microscopio de fluorescencia, tanto su número total como las positivas a DCFDA.

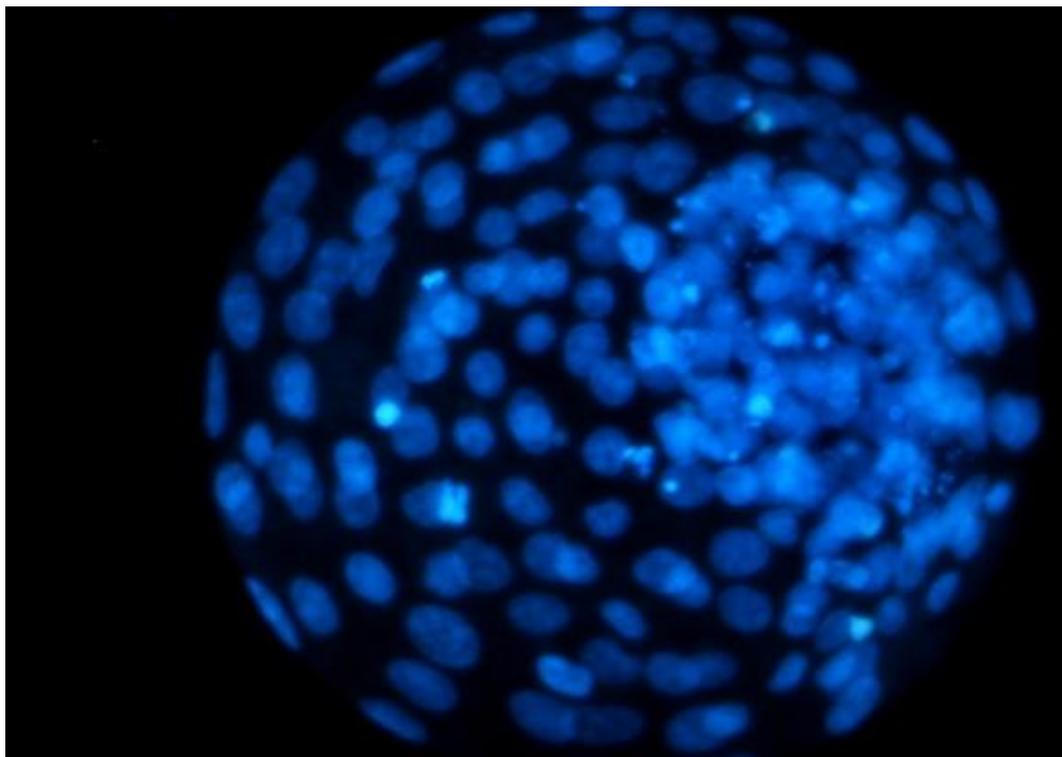


Figura 11: *Blastocisto teñido con HOECHST (microscopio de fluorescencia)*

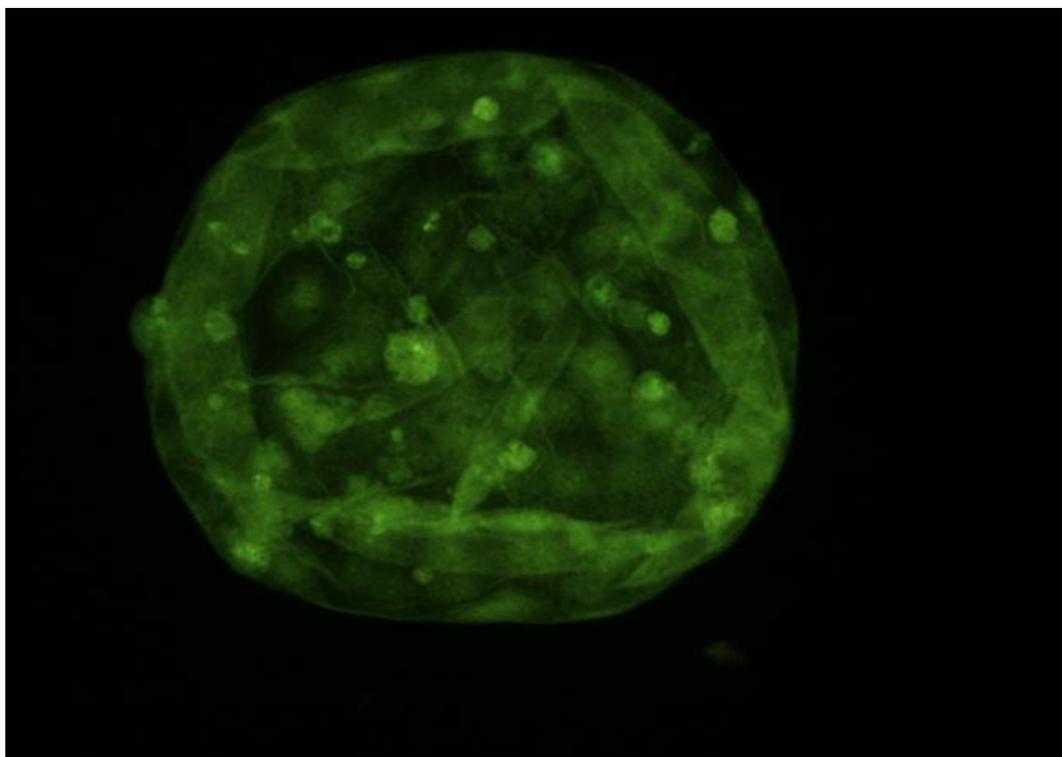


Figura 12: *Blastocisto teñido con DCHFDA (microscopio de fluorescencia)*

7. Análisis de Progesterona:

Se determinaron los niveles plasmáticos de progesterona mediante kits comerciales de RIA en fase sólida (Coat-A-Count TKPG, SIEMENS, USA) en un solo ensayo. Se basan en tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos anti progesterona de conejo. El marcador utilizado fue la progesterona marcada con I¹²⁵.

La sensibilidad del ensayo fue de 0,2 ng/ml y los coeficientes de variación intra-ensayo para los controles de concentraciones bajas (2 ng/ml), medias (10 ng/ml) y altas (40 ng/ml) fueron 7,91%, 2,69% y 10,28%, respectivamente.

Los animales se consideraron no cíclicos cuando sus niveles de progesterona eran inferiores a 1 ng/ml en cada una de las dos muestras que se obtuvieron de cada hembra antes de la colocación de las esponjas vaginales previa al tratamiento de superovulación. Se consideraban cíclicas cuando mostraron niveles plasmáticos de progesterona superiores a 1 ng/ml al menos en una de las dos muestras previas a cada tratamiento de superovulación.

8. Análisis de los anticuerpos anti-eCG:

Los niveles plasmáticos de los anticuerpos anti-eCG en plasma se determinaron mediante un test ELISA cuantitativo específico descrito por Roy et al. (1999b). Los análisis fueron realizados en la unidad de gonadotrofinas de la Estación de Fisiología de la Reproducción de los Mamíferos Domésticos del INRA de Nouzilly (Francia). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 7,1 y 11,5% respectivamente.

Se consideraron con títulos elevados las muestras con una concentración de anticuerpo anti-eCG superior a 3 µg/ml, y con títulos bajos las muestras con concentración inferior o igual a 3 µg/ml.

9. Parámetros estudiados y análisis estadístico:

La información recogida para cada oveja que salió en celo y mostró cuerpos lúteos normales, fue la siguiente:

- Hora de salida en celo tras la retirada de la esponja.
- Tasa de ovulación: número de cuerpos lúteos
- Número de estructuras recuperadas tras el lavado del útero
- Número de embriones fecundados
- Número de embriones viables: mórulas compactas y blastocistos, incluso los totalmente eclosionados.
- Número de embriones congelables: Mórulas compactas y blastocistos excepto los totalmente eclosionados.

Todos los valores anteriores fueron expresados como media \pm E.S. para cada grupo, y entre grupos y recuperaciones sucesivas dentro de cada grupo fueron comparados mediante análisis de varianza.

También se consideraron las tasas de recuperación (recuperados en relación a tasa de ovulación), de fecundación (fecundados en relación a recuperados), de viabilidad (viables en relación a recuperados) y de congelabilidad (congelables en relación a recuperados).

La evaluación de la viabilidad embrionaria tras la descongelación se realizó considerando la tasa de reexpansión, es decir, número de embriones reexpandidos en relación al total de embriones descongelados.

Todas las tasas fueron expresadas como porcentajes y comparadas entre grupos y entre recuperaciones sucesivas dentro de cada grupo mediante Chi-cuadrado.

El modelo general de análisis fue un ANOVA de dos vías 2 x 3, una de ellas (las 3 recuperaciones) de medidas repetidas, y por tanto se trata de un modelo sin interacción. Para incluir los porcentajes en el modelo y poder determinar si las diferentes tasas fueron influidas tanto por el tratamiento de superovulación como por el número de recuperación, dichos porcentajes individuales de cada oveja fueron

transformados en arco seno y posteriormente incluidos en el modelo general. El nivel de significación adoptado fue de $P < 0,05$).

Al igual que sucedió en otros experimentos previos de nuestro grupo con un diseño similar, hay que señalar que no todas las ovejas que iniciaron el ensayo tuvieron al final del mismo las tres recuperaciones de embriones. De este modo, un total de 13 hembras tuvieron que ser eliminadas a lo largo del experimento. En 9 de ellas el motivo fue la ineficacia del tratamiento con prostaglandinas tras la recuperación de embriones, lo que indujo que las ovejas quedaran gestantes y por tanto no pudieran recibir el siguiente tratamiento de superovulación. No obstante, en todas ellas se consideraron los resultados que mostraron en las recuperaciones previas. En otras 4 no fue posible realizar la recuperación por problemas de infección o de presencia de adherencias quirúrgicas, y por tanto sus resultados de recuperaciones previas fueron también considerados.

II. RESULTADOS

1. Respuesta a la superovulación y producción de embriones:

Los resultados de la respuesta a los tratamientos de superovulación y de la producción de embriones se exponen en las **Tabla 5** y **Tabla 6**. Por lo que a los porcentajes de ovejas en celo o de ovejas ovuladas con cuerpos lúteos normales se refiere, únicamente se detectaron diferencias significativas para el segundo parámetro en la primera recuperación, de manera que el tratamiento decreciente indujo un menor porcentaje de ovejas con ovulación de calidad adecuada que en el caso del tratamiento simplificado (67 vs 94%; $P < 0,05$). En el total del experimento hubo 12 fallos de ovulación, 10 en el caso del tratamiento decreciente (9 debidos a regresión prematura de cuerpos lúteos y 1 a la carencia de ovulación) y únicamente 2 en el simplificado, ambos correspondientes a ovejas que salieron en celo pero que no ovularon.

Respecto al análisis global realizado, ha que señalar en primer lugar que no se detectaron diferencias significativas entre los parámetros estadísticos estudiados en cuanto al tipo de tratamiento superovulatorio utilizado. Únicamente se observó un efecto global del tratamiento de superovulación sobre el momento en que aparecieron los celos en relación a la retirada de la esponja ($P < 0,05$), siendo dicho momento anterior en las ovejas que recibieron el tratamiento simplificado y posterior en las que fueron tratadas con el decreciente ($25,2 \pm 0,8$ vs $30,1 \pm 1,0$ horas respectivamente).

El análisis global nos reveló un efecto significativo del efecto número de recuperación sobre la mayoría de los parámetros analizados:

– La tasa de ovulación, que se vio significativamente perjudicada conforme avanzaba el número de recuperaciones ($P < 0,01$). El análisis concreto de los datos de las 3 recuperaciones dentro de cada tratamiento, muestra que la caída de la tasa de ovulación fue especialmente marcada en la tercera recuperación, donde el número de cuerpos lúteos fue significativamente inferior ($P < 0,05$) al obtenido en la primera recuperación en ambos tratamientos (8,8 vs 15,9 cuerpos lúteos en el tratamiento decreciente y 7,5 vs 14,5 cuerpos lúteos en el simplificado).

– El número de estructuras recuperadas, que disminuyó significativamente en las diferentes recuperaciones ($P < 0,01$); al igual que sucedió con la tasa de ovulación, dicha reducción fue mayor en la tercera recuperación, donde de nuevo el número de estructuras recuperadas fue significativamente inferior al obtenido en la primera recuperación ($P < 0,05$), tanto en el grupo decreciente (5,0 vs 10,7) como en el simplificado (4,7 vs 11,3).

– El número de embriones fecundados, viables y congelables, que se redujeron de manera muy significativa a partir de la primera recuperación ($P < 0,01$); también hubo un efecto significativo del número de recuperación sobre las tasas de fecundación, viabilidad y congelabilidad ($P < 0,05$). No obstante, todos los parámetros anteriores se mostraron muy similares entre la segunda y la tercera recuperación, en la que algunos de ellos mejoraron, sobre todo las tasas. En conjunto, se debe destacar nuevamente que el tratamiento simplificado no mermó en absoluto los rendimientos obtenidos tras la aplicación del tratamiento tradicional de 6 dosis decrecientes. Así y considerando los resultados globales de las tres recuperaciones, en el primer caso se obtuvieron un total de 13,7 embriones viables por oveja, frente a los 14,1 recuperados con el tratamiento decreciente.

2. Efectos del momento del ciclo sexual y de la ciclicidad sobre la respuesta a la superovulación y la producción embrionaria:

El efecto del estado del ciclo sexual en que se encontraban las ovejas en el momento de inicio del tratamiento hormonal o incluso por recuperación se expone en la **Tabla 7**. La información obtenida de los niveles plasmáticos de progesterona permitió distinguir entre ovejas que no estaban cíclicas, aquéllas cíclicas pero en fase folicular y las cíclicas en fase luteal. Dado que la mayoría de las ovejas se encontraban cíclicas y en fase luteal en el momento de colocación de las esponjas, en el análisis de los datos se agruparon los animales no cíclicos con los animales en fase folicular en un único grupo tal y como se hizo en estudios previos (Abecia et al., 2002b). Por otra parte hay que señalar que de los animales no cíclicos y los en fase luteal agrupados solo hubo un animal en anoestro en la primera recuperación y otro en la tercera recuperación al iniciar los tratamientos.

A este efecto, no se observaron diferencias entre los diferentes parámetros estudiados en cuanto al efecto del momento del ciclo sexual al inicio del tratamiento sobre la producción embrionaria. No obstante, parece que en las dos primeras recuperaciones los animales que estaban en fase luteal en el momento de la colocación de la esponja tuvieron una ligera superioridad en cuanto al número de estructuras recuperadas y de embriones fecundados, viables y congelables, sin que esta superioridad sea significativa. Este efecto se ejerce sobre todo a partir de un aumento de la tasa de ovulación. En general y considerando las 3 recuperaciones en conjunto, en los animales que estaban en fase luteal se recuperaron un total de 14,8 embriones viables, frente a los 11,6 en el caso de aquellas hembras que mostraron niveles basales de progesterona en el momento de la colocación de la esponja vaginal.

3. Efecto de la respuesta inmunológica de los anticuerpos anti-eCG sobre la respuesta a la superovulación y la producción embrionaria:

El efecto de la respuesta inmunológica de los anticuerpos anti-eCG sobre los parámetros reproductivos en el grupo que recibió el tratamiento simplificado se expone en la **Tabla 8**. Los niveles de anticuerpos anti-eCG se expresan como niveles previos bajos (a concentraciones inferiores o iguales a 3 µg/ml), y altos (a concentraciones superiores a 3 µg/ml) en función de los resultados obtenidos previamente en razas ovinas francesas (Roy et al., 1999a).

En las dos primeras recuperaciones no se observaron diferencias significativas entre los parámetros estudiados en cuanto a las concentraciones de los anticuerpos anti-eCG. También hay que considerar que únicamente 2 ovejas mostraron niveles altos de eCG en cada una de las dos primeras recuperaciones, con lo que es difícil extraer conclusiones de los resultados obtenidos. Sin embargo, en la tercera recuperación aumentó el número de ovejas con títulos altos y se evidenció claramente un efecto significativo de las concentraciones altas de anticuerpos anti-eCG sobre las tasas de fecundación, viabilidad y congelabilidad, y muy especialmente sobre la primera.

Hay que señalar en primer lugar las grandes diferencias en concentración media de anticuerpos que existen entre los grupos de ovejas que tuvieron concentraciones previas de eCG superiores o inferiores a 3 µg/ml, siendo dichos niveles 4-5 veces superiores en el primer caso. El porcentaje de animales que mostraron niveles altos de eCG previos a cada tratamiento de superovulación fue aumentando conforme se avanzaba en el número de recuperación, desde el 30% (primera) al 50% de los animales en la tercera recuperación. Del mismo modo, los niveles medios de anticuerpos aumentaron en las sucesivas recuperaciones (**Figura 13**). Aunque el número de animales de cada grupo es bajo y la variabilidad de los parámetros estudiados es elevada, lo cierto es que unos niveles elevados de anticuerpos anti eCG previos a la aplicación del tratamiento simplificado se asocian con una reducción significativa de la tasa de fecundación en las tres recuperaciones, de manera que en la segunda y tercera dicha reducción afecta también a las tasas de viabilidad y de congelabilidad (**Tabla 8**).

4. Viabilidad y calidad de los embriones post descongelación:

En cuanto a los resultados de descongelación se refiere, fueron descongelados 38 embriones del grupo S y 35 del grupo D, todos ellos al menos en estadio de blastocisto joven tal y como se ha señalado con anterioridad.

Las tasas de reexpansión y de eclosión fueron considerados como signo de viabilidad embrionaria post descongelación no presentaron ninguna diferencia estadística entre ambos grupos (**Tabla 9**).

De otra parte, como se explicó anteriormente, la calidad embrionaria fue evaluada mediante una doble tinción de HOESCHT y DCHFDA para analizar respectivamente el número de células por embrión y el nivel de daño celular. Los embriones evaluados de ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto al número de células por blastocisto y al nivel de oxidación celular (**Tabla 10**), indicando que la calidad, y por tanto la viabilidad de los mismos no fue diferente en función del tratamiento superovulatorio recibido.

Tabla 5: Respuesta ovárica y producción de embriones de ovejas Ojalada de Soria tras el primer, segundo o el tercer tratamiento con un protocolo de superovulación de 6 inyecciones decrecientes con un total de 280 UI de FSH (Grupo D) (medias \pm E. S.)

Tratamiento	Decreciente (FSH)		
	1	2	3
Recuperación			
Ovejas en celo (%)	18/19 (95)	15/16 (94)	13/13 (100)
Inicio celo, horas	29,3 \pm 1,6	29,3 \pm 1,5	32,3 \pm 2,7
Ovuladas con CL normal (%)	12/18 (67)	12/15 (80)	12/13 (92)
Tasa de ovulación	15,9 \pm 2,0 ^a	13,2 \pm 1,6 ^c	8,8 \pm 1,5 ^{b,d}
Estructuras recuperadas	10,7 \pm 1,7 ^a	9,0 \pm 1,5 ^a	5,0 \pm 0,9 ^b
Tasa de recuperación (%)	128/191 (67)	108/158 (68)	61/106 (58)
Embriones	9,2 \pm 1,9 ^a	4,3 \pm 1,4 ^b	2,6 \pm 0,9 ^b
Tasa de fecundación (%)	110/128 (86) ^a	52/108 (48) ^b	31/61 (51) ^b
Embriones viables	7,8 \pm 1,7 ^{c,a}	3,8 \pm 1,4 ^d	2,5 \pm 0,9 ^b
Tasa de viabilidad (%)	94/128 (73) ^a	46/108 (43) ^b	30/61 (49) ^b
Embriones congelables	6,4 \pm 1,5 ^{c,a}	3,1 \pm 1,0 ^d	2,5 \pm 0,9 ^b
Tasa de congelabilidad (%)	77/128 (60) ^a	37/108 (34) ^b	30/61 (49)

Letras distintas indican diferencias de $P < 0,1$ (c, d) y de $P < 0,05$ (a, b). Por lo que a los efectos globales se refiere, se explican en el texto.

Tabla 6: Respuesta ovárica y producción de embriones de ovejas Ojalada de Soria tras el primer, segundo o el tercer tratamiento con un protocolo de superovulación simplificado con un total de 210 UI de FSH + 500 UI de eCG (Grupo S) (medias \pm E. S.)

Tratamiento	Simplificado (FSH + eCG)			
	Recuperación	1	2	3
Ovejas en celo (%)		18/19 (95)	13/15 (87)	12/12 (100)
Inicio celo, horas		26,4 \pm 1,1 ^a	21,2 \pm 1,5 ^b	27,7 \pm 1,5 ^a
Ovuladas con CL normal (%)		17/18 (94)	12/13 (92)	12/12 (100)
Tasa de ovulación		14,5 \pm 2,1 ^a	10,6 \pm 2,3	7,5 \pm 1,5 ^b
Estructuras recuperadas		11,3 \pm 1,8 ^{c,a}	6,5 \pm 1,6 ^d	4,7 \pm 1,4 ^b
Tasa de recuperación (%)		193/246 (78)	78/127 (61)	56/90 (62)
Embriones		8,6 \pm 1,9 ^a	3,4 \pm 1,4 ^b	3,3 \pm 1,4 ^b
Tasa de fecundación (%)		147/193 (76) ^a	41/78 (53) ^b	40/56 (71) ^a
Embriones viables		7,7 \pm 1,6 ^a	3,1 \pm 1,3 ^b	2,9 \pm 1,4 ^b
Tasa de viabilidad (%)		131/193 (68) ^a	37/78 (47) ^b	35/56 (63)
Embriones congelables		6,6 \pm 1,6 ^{c,a}	2,6 \pm 1,1 ^d	2,2 \pm 1,2 ^b
Tasa de congelabilidad (%)		113/193 (59) ^a	31/78 (40) ^b	26/56 (46)

Letras distintas indican diferencias de $P < 0,1$ (c, d) y de $P < 0,05$ (a, b). Por lo que a los efectos globales se refiere, se explican en el texto.

Tabla 7: Efecto del estadio del ciclo previo al tratamiento hormonal sobre la producción embrionaria en ovejas Ojaladas de Soria tras tres recuperaciones consecutivas (medias± E. S.)

Recuperación	1		2		3	
	No Cic+Foili	Luteal	No Cic+Foili	Luteal	No Cic+Foili	Luteal
n	9	20	4	19	5	19
Tasa de ovulación	13,6±2,6	15,8±1,8	8,0±2,4	13±1,7	9,4±2,2	7,8±1,2
Estructuras recuperadas	10±2,2	11,6±1,5	6,8±2,1	8,4±1,3	5,8±1,4	4,6±1
Tasa de recuperación (%)	90/122 (74)	231/315 (73)	27/32 (84) ^a	159/246 (65) ^b	29/47 (62)	88/149 (59)
Embriones totales	7,8±2,1	9,4±1,7	2,3±1,9	4,4±1,1	2,8±1,8	3,0±1,0
Tasa de fecundación (%)	70/90 (76)	187/231 (81)	9/27(33)	84/159 (53)	14/29 (48)	57/88 (65)
Embriones viables	7,0±1,7	8,1±1,5	2,0±2,0	4,0±1,1	2,6±1,8	2,7±1,0
Tasa de viabilidad (%)	63/90 (70)	162/231 (70)	8/27 (30)	75/159 (47)	13/29 (45)	52/88 (59)
Embriones congelables	5,6±1,3	7,0±1,5	1,3±1,3	3,3±0,9	2,6±1,8	2,3±0,9
Tasa de congelabilidad (%)	50/90 (56)	140/231 (61)	5/27 (19) ^b	63/159 (40) ^a	13/29 (45)	43/88 (49)

Letras distintas indican diferencias de P < 0,05 (a, b)

Tabla 8: Efecto de las concentraciones de anticuerpos anti-eCG sobre la producción embrionaria de ovejas ojaladas de Soria tras la primera, segunda y tercera recuperación. Los niveles de anticuerpos expresados con B = concentraciones bajas $\leq 3\mu\text{g/ml}$ y A = concentraciones altas $> 3\mu\text{g/ml}$ (medias \pm E. S.)

Recuperación	1		2			3		
	B	A	B	A	B	A	B	A
n	12	5	7	5	6	6	6	6
Concentración eCG ($\mu\text{g/ml}$)	0,83 \pm 0,47 ^a	5,49 \pm 2,19 ^b	1,16 \pm 0,63a	5,08 \pm 1,28 ^b	1,44 \pm 0,33 ^a	6,90 \pm 1,76 ^b	1,44 \pm 0,33 ^a	6,90 \pm 1,76 ^b
Hora salida celos	26,15 \pm 1,25	27,20 \pm 2,33	22,29 \pm 1,71	21,60 \pm 2,40	29,33 \pm 2,23	26,00 \pm 2,0	29,33 \pm 2,23	26,00 \pm 2,0
Tasa de ovulación	16,92 \pm 2,50 ^c	8,60 \pm 3,17 ^d	8,86 \pm 2,61	13,00 \pm 4,39	7,33 \pm 2,43	7,67 \pm 2,08	7,33 \pm 2,43	7,67 \pm 2,08
Estructuras recuperadas	13,33 \pm 2,26 ^c	6,60 \pm 1,81 ^d	6,14 \pm 1,91	7,00 \pm 3,10	4,50 \pm 2,45	4,83 \pm 1,45	4,50 \pm 2,45	4,83 \pm 1,45
Tasa de recuperación (%)	160/203 (79)	33/43 (77)	43/62 (69)	35/65 (54)	27/44 (61)	29/46 (63)	27/44 (61)	29/46 (63)
Embriones totales	10,67 \pm 2,36 ^c	3,80 \pm 1,93 ^d	5,00 \pm 2,02	1,20 \pm 1,20	4,50 \pm 2,45	2,17 \pm 1,64	4,50 \pm 2,45	2,17 \pm 1,64
Tasa de fecundación (%)	128/160 (80) ^a	19/33 (58) ^b	35/43 (81) ^a	6/35 (17) ^b	27/27 (100) ^a	13/29 (45) ^b	27/27 (100) ^a	13/29 (45) ^b
Embriones viables	9,33 \pm 2,03	3,80 \pm 1,93	4,43 \pm 1,91	1,20 \pm 1,20	3,83 \pm 2,37	2,00 \pm 1,63	3,83 \pm 2,37	2,00 \pm 1,63
Tasa de viabilidad (%)	112/160 (70)	19/33 (58)	31/43 (72) ^a	6/35 (17) ^b	23/27 (85) ^a	12/29 (41) ^b	23/27 (85) ^a	12/29 (41) ^b
Embriones congelables	7,83 \pm 2,01	3,80 \pm 1,93	3,57 \pm 1,76	1,20 \pm 1,20	3,67 \pm 2,38	0,67 \pm 0,42	3,67 \pm 2,38	0,67 \pm 0,42
Tasa de congelabilidad (%)	94/160 (59)	19/33 (58)	25/43 (58) ^a	6/35 (17) ^b	22/27 (81) ^a	4/29 (14) ^b	22/27 (81) ^a	4/29 (14) ^b

Letras distintas indican diferencias de $P < 0,05$ (a,b)

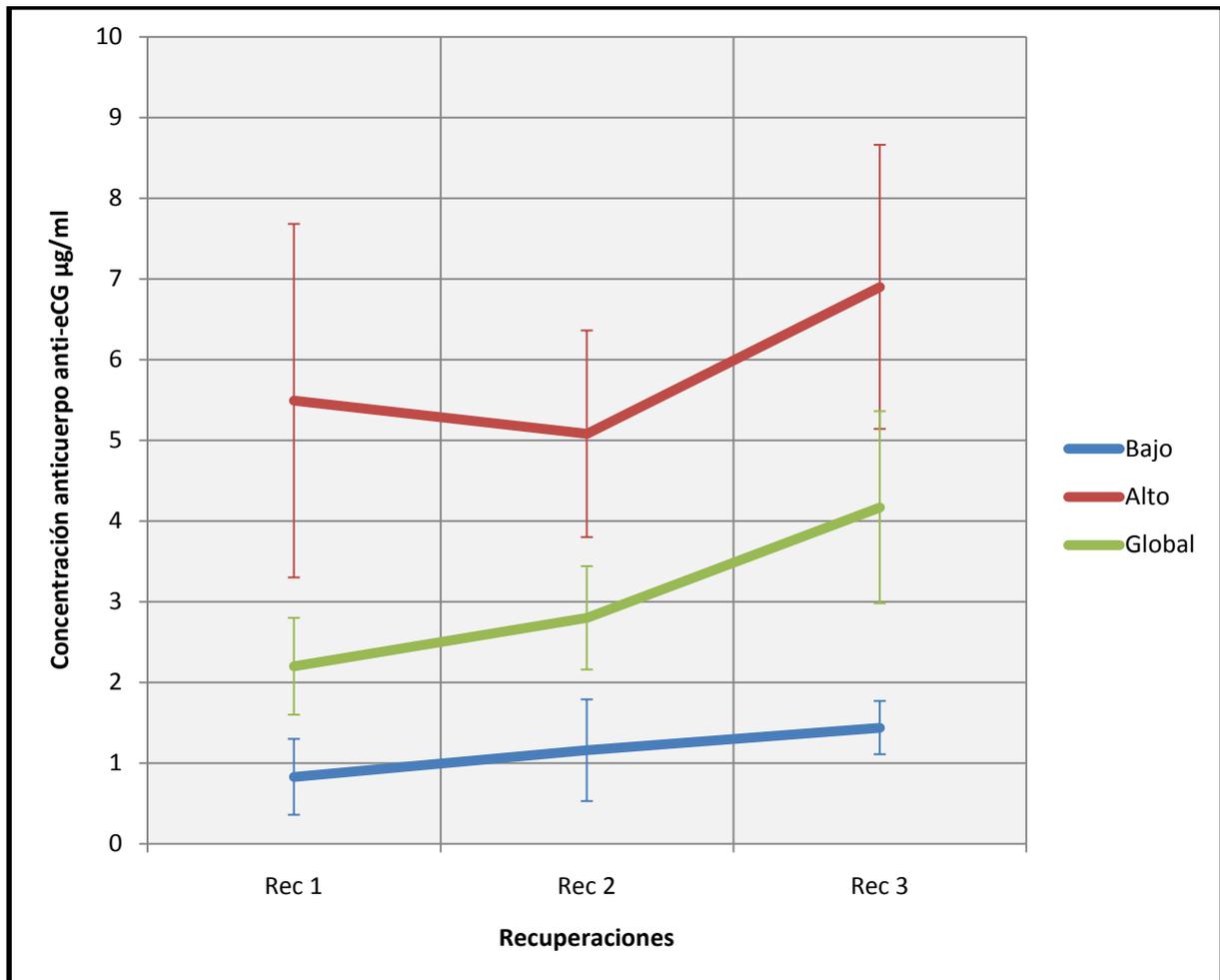


Figura 13: Evolución de las concentraciones plasmáticas de los anticuerpos anti-eCG a los largo de las recuperaciones

Tabla 9: *Evaluación de la tasa reexpansión de los dos grupos tras la descongelación.*

Grupo	Decreciente	Simplificado
Tasa de reexpansión (%)	21/35 (60)	20/38 (52,6)

Tabla 10: *Números de células (\pm E. S.) por blastocisto obtenidas por tinción de HOECHST y del números de células con reacción al peróxido de hidrogeno evidenciadas por la tinción de DCHFDA en blastocistos producidos in vivo de ovejas Ojaladas Sorianas.*

Grupo	Decreciente	Simplificado
n	10	12
HOECHST	228,2 \pm 49,7	157,4 \pm 33,4
DCHFDA	33,8 \pm 8,3	32,8 \pm 7,6

III. DISCUSIÓN

Generalmente, un tratamiento de superovulación se considera efectivo cuando los animales sometidos a dicho tratamiento presentan una superior tasa de ovulación a aquélla referida como normal para la raza bajo estudio. Ambos tratamientos analizados han cumplido dicho requisito con creces ofreciendo resultados no diferentes a los referidos en la literatura utilizando protocolos superovulatorios iguales. El grupo simplificado mostró muy buenos resultados en la primera recuperación, con un total de 7,8 embriones viables por oveja Ojalada, número por encima de los obtenidos por Leoni (2001) en raza Sarda (5,9), y Simonetti (2008) en la raza Corriedale (4,0). Este mismo grupo mostró también unas tasas de recuperación y de fecundación muy adecuadas, si bien otros autores han mostrado que la tasa de recuperación se ve notablemente perjudicada con la asociación de las dos hormonas en una única inyección (Leoni et al., 2001; Ledda et al., 1992; Simonetti et al., 2008). Sin embargo, la tasa de fecundación mejora significativamente cuando se reduce la dosis tanto de FSH como de eCG, a los niveles utilizados en el presente estudio, en el citado tratamiento simplificado (Leoni et al., 2001; Simonetti et al., 2008).

Por otra parte, hay que señalar que la producción de embriones viables obtenida con el grupo decreciente en la primera recuperación fue muy similar a la del grupo simplificado, y además no sensiblemente diferente a los resultados referidos en la literatura con protocolos de varias inyecciones de FSH ovina o porcina (Forcada et al., 2000; Leoni et al., 2001; González-Bulnes et al., 2004; Simonetti et al., 2008). En conjunto, estos resultados parecen confirmar la idoneidad del tratamiento simplificado cuando se aplica por primera vez en ovejas de raza Ojalada Soriana.

Quizás y en esta primera recuperación, habría que comentar la incidencia de cuerpos lúteos regresados en el momento de la recuperación de embriones, que fue notable, aunque no significativa, en el lote decreciente, donde un tercio de las ovejas (6 de 18) mostraron este comportamiento por únicamente un animal en el lote simplificado. Este comportamiento del lote decreciente, que se redujo en la segunda

recuperación (3 de 15 ovejas) y sobre todo en la tercera (1 de 13 hembras), supone una respuesta inadecuada a la superovulación, de manera que la oveja desarrolla una fase luteal de corta duración y en el momento de la recuperación embrionaria los ovarios muestran únicamente cuerpos albicans, no funcionales, y por tanto ausencia de embriones. La regresión luteal temprana ha sido referida por distintos autores asociada a tratamientos de superovulación (Ryan et al., 1991; Schiewe et al., 1991; Forcada et al., 2000; 2006), y parece tener como causa principal la falta de un soporte de progesterona previo al tratamiento de superovulación, con lo que su incidencia parece ser superior en periodo de anoestro (Ryan et al., 1991), aunque en el presente estudio las ovejas estaban cíclicas. También se ha señalado que la incidencia de esta alteración podría ser superior cuando se aplican tratamientos de estimulación muy simplificados, de manera que Riesenberget al. (2001) ya mostraron una alta incidencia de cuerpos lúteos anómalos en respuesta a una única inyección de FSH en solución salina sin cotratamiento con eCG. Sin embargo, una dosis reducida de eCG aplicada junto con la FSH puede ser importante para sostener la estimulación folicular inducida por ésta y evitar así las alteraciones referidas por los citados autores. De este modo y con el citado tratamiento simplificado combinado, ni en el caso de Simonetti et al. (2008) ni en el presente estudio se ha detectado una incidencia significativa de regresión luteal temprana.

El hecho de que sean las ovejas que recibieron el tratamiento decreciente las que mostraron en mayor medida una regresión luteal temprana en nuestro ensayo, nos lleva a pensar que se ha podido tratar de una respuesta de algunas hembras a las condiciones de estrés asociadas con dicho tratamiento (estabulación, múltiples inyecciones, etc.). De hecho, algunos autores han responsabilizado en parte al estrés asociado a situaciones experimentales como causa de fallos de luteinización (Forcada et al., 2000; Okada et al., 2000). En este sentido pues, el tratamiento simplificado propuesto en el presente trabajo parece tener una ventaja adicional al evitar estos problemas en ovejas ojaladas, aunque hay que tener muy presente que la regresión luteal temprana tiene una variación importante con la raza (Okada et al., 2000).

Por lo que a la segunda y tercera recuperación se refiere, los parámetros de producción embrionaria en el presente estudio se redujeron considerablemente y de manera significativa, si bien dicho efecto fue similar en ambos grupos de ovejas. Así, la tasa de ovulación se vio muy perjudicada por el número de recuperación en ambos tratamientos, y lo mismo sucedió en relación al número de embriones viables y congelables debido sobre todo a una notable y significativa reducción de la tasa de fecundación y por tanto del número de estructuras fecundadas. Otros autores han señalado que las adherencias posquirúrgicas que se van produciendo en recuperaciones sucesivas pueden afectar tanto al porcentaje de recuperación como incluso al transporte espermático (Torrès y Sevellec, 1987), lo que podría explicar la citada reducción de los porcentajes de fecundación en la segunda y la tercera recuperación del presente estudio tanto en el grupo simplificado como en el decreciente. No obstante, este efecto negativo de recuperaciones sucesivas no fue observado previamente por nuestro grupo de investigación en ovejas Rasa Aragonesa superovuladas con un tratamiento de múltiples inyecciones de FSH ovina y con un intervalo entre tratamientos similar al del presente estudio. Por tanto, éste es un aspecto que necesita seguir siendo investigado en ulteriores estudios.

En conjunto y al objeto de valorar adecuadamente la producción total de embriones de las ovejas ojaladas utilizadas en el presente estudio a lo largo de las tres recuperaciones sucesivas, en el grupo decreciente se obtuvieron un total de 14,1 embriones viables y 12 embriones congelables por oveja, frente a 13,7 embriones viables y 11,4 embriones congelables en el grupo simplificado. Estas cifras son muy similares a las obtenidas por Forcada et al. (2000) en ovejas Rasa Aragonesa también al final de su vida productiva y tras tres recuperaciones sucesivas, que dieron lugar a un total de 13,9 embriones viables y 11 embriones congelables por oveja tras ser sometidas a protocolos de superovulación con 8 dosis decrecientes de FSH ovina. Y muy por encima de los obtenidos por Torrès y Sevellec (1987) en ovejas Préalpes utilizando 3 protocolos consecutivos de 4 dosis decrecientes de FSH porcina, que no alcanzaron los 6 embriones viables totales por oveja.

De todos los estudiados, el único carácter de nuestro experimento que mostró ser significativamente diferente entre ambos tratamientos de superovulación fue la salida en celo, más temprana en el lote que recibió el protocolo simplificado de superovulación; en consecuencia, dicho tratamiento también parece adelantar tanto el pico preovulatorio de LH como la ovulación (Simonetti et al., 2008). De igual forma, Naqvi y Gulyani (1999) mostraron el adelantamiento en la presentación de los celos en ovejas sometidas al citado tratamiento combinado. Sin embargo, otros autores no observaron variaciones en la aparición del celo y del pico de LH entre ovejas superovuladas mediante FSH sola o combinada con eCG (Jabbour y Evans, 1991). Aunque el intervalo de aparición del celo y del pico preovulatorio de LH no parece estar relacionado con la respuesta ovulatoria (Veiga-Lopez et al., 2006), es importante tener en cuenta este hecho a la hora de programar las cubriciones o el momento de IA o incluso el momento adecuado para la recuperación de los embriones en un estadio de desarrollo determinado para su posterior transferencia o conservación. Por tanto, antes de recomendar un tratamiento simplificado de superovulación asociado a IA para obtener embriones de una determinada raza ovina, es preciso estudios previos para determinar el momento de inicio del celo y/o del pico de LH para así definir el momento idóneo de la inseminación.

Al objeto de identificar algunos factores que pudieran modificar la respuesta al tratamiento de superovulación, se evaluó el estadio del ciclo previo al mismo, en el momento de inicio del tratamiento de sincronización. De este modo e independientemente del tratamiento de superovulación recibido, se analizaron los resultados agrupando los animales en función de que mostraran niveles basales de progesterona (ovejas acíclicas o en fase folicular) o altos (indicativos de fase luteal) en el momento de colocación de la esponja vaginal. En conjunto, los niveles previos de progesterona no influyeron significativamente en los parámetros estudiados, aunque hay que señalar que el grupo de ovejas sin progesterona fue bastante más reducido que el de aquéllas que mostraron estar en fase luteal (9, 4 y 5 ovejas frente a 20, 19 y 19 ovejas en cada una de las tres recuperaciones), si bien los rendimientos globales parecen ser algo superiores en el segundo caso, con un total de 14,1 embriones viables por oveja en las tres recuperaciones frente a 11,6 embriones en el caso de las ovejas acíclicas o en fase folicular. Este efecto puede

ser debido al efecto inhibitor de la progesterona sobre los folículos dominantes en la fase luteal del ciclo estral en ovinos (Adams, 1999). Otros autores parecen mostrar resultados similares a los obtenidos en el presente estudio. Así, Abecia et al. (2002b), tras agrupar las ovejas en función de que estuvieran en fase luteal o no (fase folicular o acíclicas) en el momento del inicio del tratamiento tradicional de sincronización e inducción del celo, mostraron que el segundo grupo tuvo una tasa de fertilidad significativamente superior cuando la fecundación tuvo lugar a tiempo fijo, mediante IA; por el contrario, tales diferencias desaparecieron cuando la fecundación se realizó mediante monta natural. Por otra parte, González-Bulnes et al. (2002a) mostraron que la presencia de un cuerpo lúteo en el momento de la inserción de la esponja no afectaba a los resultados tras el tratamiento de superovulación; sin embargo, la viabilidad embrionaria sí pareció ser significativamente superior en presencia de cuerpo/s lúteo/s en el momento del inicio del tratamiento superovulatorio que en su ausencia. Estos mismos autores demostraron el efecto perjudicial de la presencia del folículo dominante sobre la producción embrionaria en el momento de la primera inyección de FSH (Gonzalez-Bulnes et al., 2002b), de manera que dicho efecto negativo es menor cuando existe cuerpo/s lúteo/s en el momento de inicio del tratamiento superovulatorio (González-Bulnes et al., 2004).

En relación al tratamiento simplificado, es particularmente interesante el análisis de la menor tasa de fecundación mostrada por las ovejas que presentaron elevados niveles de anticuerpos anti-eCG previos al tratamiento de superovulación frente a las que tenían niveles bajos de dichos anticuerpos. La producción de anticuerpos anti-eCG en respuesta a tratamientos previos (generalmente comerciales) de eCG ha sido referida por varios autores en ovinos (Bodin et al., 1997; Roy et al., 1999a) y en caprinos (Herve et al., 2004; Roy et al., 1999b), destacándose su efecto perjudicial sobre la función reproductiva. La disminución de la fertilidad en ovinos ha sido demostrada por la presencia de altas concentraciones de anticuerpos anti-eCG (Roy et al., 1999a). En general, la respuesta inmunitaria de las ovejas en relación al contacto con la eCG es menor que en las cabras (Roy et al., 1999b) y además existe un factor racial importante. Por otra parte, la producción de anticuerpos tras la inyección de eCG es máxima en torno a los días 10-15, siendo la

respuesta proporcional a la tasa de anticuerpos previa al tratamiento con eCG (Roy et al., 1999a). De este modo, la determinación del nivel de anticuerpos previos al contacto con la eCG es un buen indicador de la respuesta posterior, lo que avala la idoneidad del protocolo desarrollado en el presente estudio. La caída de los niveles de anticuerpos es muy rápida a partir del día 30 de la inyección de eCG.

Tras un análisis detallado incluso en condiciones de campo, Roy et al. (1999a) señalan que altos niveles de anticuerpos anti-eCG se asocian con una carencia o un retraso del celo y por tanto del pico preovulatorio de LH, lo que influye notablemente en la fertilidad tras la IA, siendo este efecto mucho menor cuando la fecundación se realiza mediante monta natural. Asimismo, estos autores señalan que no existe efecto alguno de los niveles de anticuerpos sobre la respuesta ovárica al tratamiento con eCG (tasa de ovulación). Nuestros resultados han mostrado una clara reducción de la tasa de fecundación en las ovejas con títulos elevados a pesar de que la misma se realizó mediante monta natural; además, no se detectó efecto alguno del nivel de anticuerpos sobre la salida en celo. Es evidente por tanto que los efectos de los niveles de anticuerpos anti-eCG en una situación de superovulación no son los mismos que en la base del tratamiento comercial de inducción y sincronización del celo aunque la cantidad aplicada de eCG sea similar, pues en el primer caso lleva asociada una importante dosis de FSH. En cualquier caso, merece la pena profundizar en el estudio de este aspecto, sobre todo si se confirman los buenos resultados del tratamiento simplificado en programas MOET y se comienza a generalizar su uso, con lo que habría que conocer en profundidad las relaciones entre niveles previos de anticuerpos y la respuesta tras el tratamiento con eCG asociado a la FSH, especialmente en relación a la producción de embriones tras fecundación mediante inseminación artificial.

Otro objetivo de nuestro estudio fue la evaluación de la viabilidad de los embriones producidos *in vivo* en función del tratamiento de superovulación utilizado, analizando dicha viabilidad *in vitro* tras la vitrificación y posterior descongelación y cultivo. A este fin, los resultados del cultivo de los embriones descongelados mostraron tasas de reexpansión muy adecuadas, sobre todo teniendo en cuenta que los embriones fueron vitrificados en presencia de PVA en lugar de FCS para evitar el

síndrome de elevado peso al nacimiento que induce este último tras la transferencia embrionaria. De hecho, el porcentaje de viabilidad de los embriones procedentes del grupo simplificado no fue diferente de los del grupo decreciente (53 vs 60% respectivamente), e incluso fue similar al referido en la literatura con el uso de PVA en embriones de similar estadio (Leoni et al., 2001; Naitana et al., 1997), lo que parece confirmar la idoneidad del protocolo de superovulación analizado (simplificado) en cuanto a la viabilidad de los embriones obtenidos se refiere.

Las observaciones realizadas tras el análisis de la tasa de reexpansión parecen verse confirmadas con los resultados de número total de células de los embriones descongelados, que fueron ligeramente superiores en el grupo decreciente (228 vs 157 células en el grupo simplificado). Estos resultados no parecen diferir de los mostrados por Leoni et al. (2001), que asimismo señalaron que los embriones producidos a partir de la combinación de las dos hormonas en una única inyección parecen mostrar un menor número de células que los producidos a partir del clásico tratamiento de superovulación con varias inyecciones de FSH. El número de células por embrión es uno de los factores que influyen en la tolerancia del embrión a la crioconservación, ya que la reexpansión de estos mismos tras la descongelación depende del número de células que sobreviven al proceso (Leoni et al., 2001). La resistencia de los embriones producidos a partir de una única fuente hormonal (FSH en protocolos decrecientes) podría ser un indicador potencial de la viabilidad embrionaria *in vivo*; sin embargo, son necesarios experimentos de transferencia para evaluar la viabilidad real de los embriones procedentes de tratamientos simplificados tras la crioconservación.

Por otra parte, hay que señalar que no hubo diferencias estadísticas entre ambos grupos en cuanto al número de células obtenido tras la tinción mediante HOECHST ni en cuanto al número de células con daño oxidativo (tinción DCHFDA), lo que parece indicar que la calidad, y por tanto la viabilidad de los embriones, no parece ser diferente en función del tratamiento superovulatorio recibido.

IV. CONCLUSIONES

En las condiciones en que se realizó el presente experimento podemos concluir lo siguiente:

- ✓ El tratamiento superovulatorio simplificado combinado (eCG+FSH) utilizado en el presente experimento permite obtener resultados muy satisfactorios en cuanto a la producción de embriones y viabilidad de estos mismos tras la vitrificación en ovejas de raza Ojalada Soriana, en todos los casos muy similares a los obtenidos con el protocolo de 6 inyecciones decrecientes de FSH. Así, en el conjunto de las 3 recuperaciones se obtuvieron un total de 13,7 y 14,1 embriones viables respectivamente.
- ✓ Se detectó un efecto significativo del número de recuperación ($P < 0,05$ a $P < 0,01$) sobre la práctica totalidad de los parámetros analizados, que se vieron notablemente perjudicados en la segunda y tercera recuperaciones independientemente del tratamiento de superovulación recibido.
- ✓ Un 30% de las ovejas que recibieron el tratamiento decreciente mostraron una fase luteal corta en la primera recuperación, frente a únicamente un 5% en el caso del tratamiento decreciente. El mayor estrés consecuencia del número de inyecciones pudo ser la causa, pues dicho problema se redujo drásticamente en las subsiguientes recuperaciones.
- ✓ El tratamiento simplificado adelantó significativamente la salida en celo, aspecto a tener muy en cuenta a la hora de realizar la fecundación mediante IA o de recuperar embriones en el estadio de desarrollo deseado.
- ✓ Unos niveles elevados de anticuerpos anti eCG previos a la aplicación del tratamiento simplificado, se asociaron con una reducción significativa de la tasa de fecundación en las tres recuperaciones, de manera que en la segunda y tercera dicha reducción afectó también a las tasas de viabilidad y de congelabilidad.
- ✓ El tratamiento de superovulación no modificó la viabilidad in vitro de los embriones tras la descongelación ni en el número de células de los mismos.

EXPERIMENTO II

EXPERIMENTO II

EFECTO DE LA PRESENCIA DE LA MELATONINA EN LOS MEDIOS MIV Y FIV SOBRE LA VIABILIDAD DE EMBRIONES EN OVINOS

En el segundo caso, se pretende evaluar la eficacia de la presencia de melatonina en los medios sobre la maduración y la fecundación *in vitro* de los oocitos, y por tanto sobre la producción y viabilidad de los blastocistos obtenidos tras el cultivo *in vitro* subsiguiente.

Tal y como se indicó previamente en la presente memoria, el objetivo de este experimento fue evaluar la eficacia de la presencia de melatonina en los medios sobre la maduración y la fecundación *in vitro* de oocitos obtenidos de ovarios de ovejas de matadero, y por tanto sobre su posterior desarrollo embrionario *in vitro*, con la finalidad de identificar el efecto de esta hormona sobre los procesos que condicionan la producción de embriones *in vitro* en la especie ovina.

I. MATERIALES Y METODOS

1. Material animal:

En este experimento se utilizaron ovarios obtenidos de ovejas adultas de desvieje sacrificadas en el matadero de Mercazaragoza, entre octubre y diciembre del 2008.

2. Reactivos y medios:

Excepto cuando se especifique lo contrario, todos los reactivos para la preparación de los medios se obtuvieron de Sigma-Aldrich Químicas, S.A., Madrid.

El medio de manejo estaba constituido por Hepes-TCM199 suplementado con 0,1% de PVA, 0,04% de NaHCO₃, 25UI/ml de Heparina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100UI/ml de penicilina G

El medio de maduración estaba compuesto por un medio TCM199 adicionado de 10% (vol/vol) de suero de ovejas en celo, 1 µg/ml de FSH y LH (HMG-Lepori, Angelini Farma-Lepori, España), 100 µM de Cisteamina, 0,3 mM de piruvato sódico, 100UI/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina.

El suero de oveja en celo se obtuvo de ovejas del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza cuyos celos se detectaron mediante machos vasectomizados equipados de arneses marcadores. La sangre se recogió en el segundo día del celo, en tubos de vidrio estéril, se dejó coagular a temperatura ambiente y se mantuvo toda la noche a 4-5°C para una completa separación. Al día siguiente se recuperó el suero, y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min para eliminar restos de células. Finalmente se fijó el complemento, se alicuotó y se congeló a -20°C hasta su utilización (Rao et al., 2002).

El medio de fecundación estaba compuesto por SOF (Tervit y Rowson, 1974; Tervit et al., 1972) sin glucosa, suplementado con un 2% (vol/vol) de suero de oveja en celo (Huneau et al., 1994; Li et al., 2006), 10 µg/ml de Heparina (Cox y Saravia, 1992) y 1 µg/ml de hipotaurina para la capacitación de los espermatozoides.

El medio de cultivo estaba constituido por SOF sin glucosa, suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales a concentraciones oviductales (Walker et al., 1996), 0,4% (vol/vol) de BSA para sustentar al cocultivo, L-glutamina 1 mM, 100 µg/ml de estreptomicina y 100UI/ml de penicilina G.

El medio bifase para la dilución del semen contenía sacarosa 0,25 M, Hepes 10 mM, Hidróxido potásico 2 mM, glucosa 5 mM, TPNa (sodio fosfato monobásico) 0,5 M y EGTA (ácido tetra acético de etilenglicol) 100 mM (Grasa et al., 2004).

3. Extracción de oocitos:

Los ovarios se recogieron del matadero y se transportaron al laboratorio, en un plazo mínimo de 45 min, en un medio de PBS con 100 UI/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina, a una temperatura entre 30 y 35°C.

Una vez en el laboratorio, los ovarios se limpiaron de los tejidos y vasos sanguíneos y se lavaron tres veces con PBS a 35°C.

La extracción de los oocitos se realizó según el protocolo de Wani et al. (2000), mediante una combinación de los métodos de punción y slicing (**Figura 14 y Figura 15**). Los ovarios se colocaron en una placa Petri cubiertos parcialmente con medio de manejo, y se partieron por la mitad. Se puncionaron los folículos visibles con una aguja 16G y luego se rayaba la superficie con una hoja de bisturí. Se eliminaron los restos de tejidos y el medio sobrante de la placa con una jeringa, se identificaron los oocitos bajo lupa y se transfirieron a otra placa con medio de manejo.



Figura 14: *Obtención de oocitos por punción del ovario.*



Figura 15: *Obtención de oocitos por Slicing del ovario.*

Los oocitos se clasificaron en tres grupos buenos, normales y malos, en función del número de capas de células de la granulosa y de las características de su citoplasma (Wani et al., 2000) (**Figura 16**):

- Buenos: oocitos con muchas capas completas de células de granulosa y citoplasma homogéneo.
- Normales: oocitos con pocas capas de células de granulosa o con capas incompletas, y citoplasma homogéneo.
- Malos: oocitos con capas incompletas o incluso sin células de la granulosa y citoplasma no homogéneo.

Los oocitos buenos y normales fueron destinados para madurar, y se lavaron dos veces con medio de manejo y una última vez en el medio de maduración.

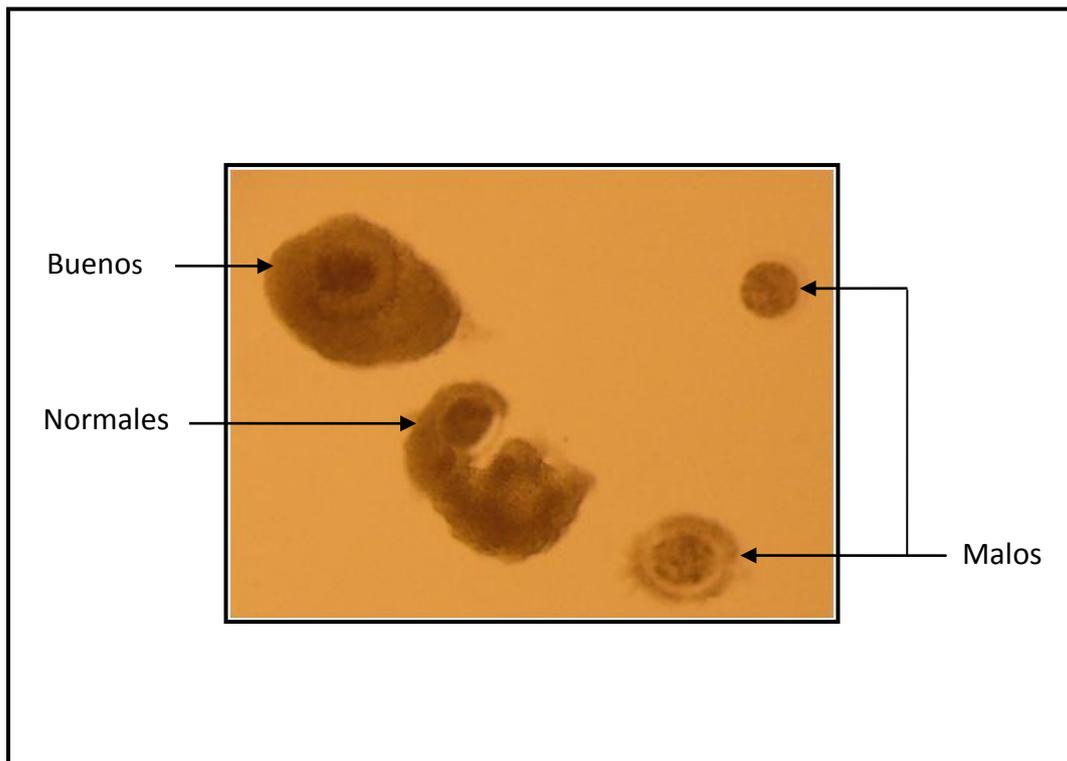


Figura 16: Clasificación de los oocitos (*Buenos, Normales y Malos*).

4. Maduración *in vitro*:

Tras el último lavado en el medio de maduración, los oocitos fueron divididos en 4 grupos aleatoriamente, de forma que tres grupos maduraron con melatonina a diferentes concentraciones (10^{-6} M, 10^{-8} M y 10^{-10} M), siendo el último grupo el control. Este orden de grupos se mantuvo durante todo el proceso.

Cada grupo de oocitos se colocó en un pocillo en la placa de maduración de 4 pocillos, con 500 μ l de medio de maduración y 30 – 40 oocitos por grupo, que se agruparon en el centro del pocillo. Se cubrieron los pocillos con una gota de aceite mineral y se incubaron en la estufa durante 24 horas a 39°C, en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂.

La melatonina utilizada en los medios se diluyó en el DMSO, pues no es soluble en medios salinos. Una vez disuelta, se realizó una dilución 1/10 en PBS,

de forma que una vez añadida al medio, la cantidad de DMSO final es 1‰ (Ishizuka et al., 2000)

5. Fecundación *in vitro*:

A las 22 – 24 horas del inicio de la maduración, las células de la granulosa se expandieron por la acción de la FSH. Se denudaron los oocitos pipeteándolos varias veces suavemente con una micropipeta en medio de manejo. Una vez denudados, los oocitos se lavaron dos veces en medio de fecundación (SOF de fecundación), y se colocaron en un solo pocillo de una placa de 4 pocillos con 350 µl de medio de fecundación, manteniéndose los mismos grupos experimentales que en la maduración, con melatonina 10^{-6} M, 10^{-8} M y 10^{-10} M y el grupo control.

Por otro lado, el mismo día de la fecundación se obtuvo semen fresco de moruecos de raza Rasa Aragonesa, en concreto del grupo de animales donantes alojados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El semen se evaluó y se diluyó 1/10 en un medio bifase y se mantuvo a 15°C hasta su uso ese mismo día.

En el momento de la fecundación, el semen disuelto se sometió a un procedimiento de selección espermática (Swim-up) (**Figura 17**) para seleccionar los espermatozoides viables (Brown y Radziewicz, 1998; Wang et al., 1998; Leoni et al., 2007). En ese procedimiento, en el fondo de un tubo de vidrio de 10 ml (BD Vacutainer, RU) conteniendo 1 ml de medio de fecundación estabilizado en la incubadora, se depositó 1 ml de semen con cuidado para evitar su mezcla con el medio anterior. Se dejaron ambos en incubación durante 15 minutos a 39°C y 5% CO₂ de forma que los espermatozoides con alta motilidad suben y sobrenadan el medio. Al final del procedimiento, se recuperan del sobrenadante y se añaden 100 µl de ellos en cada pocillo de la placa con los oocitos, a una concentración final aproximada de 10^6 espermatozoides/ml.

Los pocillos se cubrieron con aceite mineral y los gametos se incubaron durante 24 horas a 39°C y 5% de CO₂.

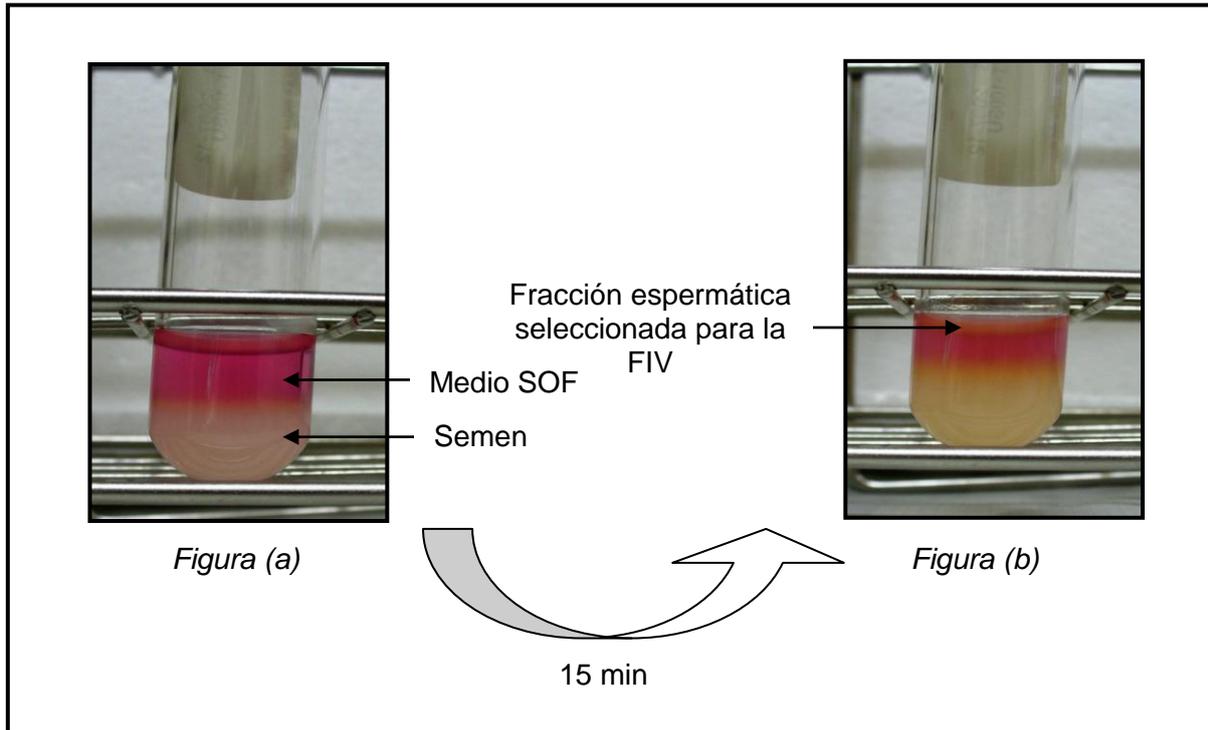


Figura 17: Representación de la selección espermática por Swim-Up. Figura (a): Antes del Swim-Up (Semen y medio SOF). Figura (b): 15 minutos después del inicio del Swim-Up (se ve claramente la fracción espermática seleccionada).

6. Cultivo *in vitro*:

A las 24 horas de la fecundación, los oocitos y embriones se sacaron de las placas de fecundación y se lavaron con medio de manejo para eliminar restos de espermatozoides. Luego se lavaron los oocitos y embriones dos veces en SOF de cultivo. Los embriones divididos se separaron del resto y se colocaron en placas de cultivo, y los no divididos se pusieron en otra placa para otra evaluación a las 36 horas de la fecundación, de forma que los embriones que se dividieron tras 36 horas se añadieron al resto de los divididos. Los oocitos no divididos se evaluaron de nuevo para determinar su estado de desarrollo: se consideraron maduros aquellos oocitos que expulsaron el corpúsculo polar, y como fecundados no divididos aquellos que expulsaron los dos corpúsculos polares.

Al igual que en la maduración y en la fecundación, durante el periodo de cultivo embrionario se mantuvieron los mismos grupos, tanto los experimentales con las mismas concentraciones de melatonina (10^{-6} M, 10^{-8} M y 10^{-10} M), como el grupo control.

Los embriones se agruparon en el centro de los pocillos para facilitar su desarrollo (Gardner et al., 1994; Gopichandran y Leese, 2006), y los pocillos se cubrieron con aceite mineral y se mantuvieron en la incubadora a 39°C, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ durante 8 días (contando como día 0 el momento de la fecundación *in vitro*); el estadio de desarrollo de los embriones fue evaluado a los 6, 7 y 8 días tras la fecundación.

El día 8 post fecundación se detuvo el cultivo, de manera que los embriones fueron evaluados, considerándose el número de blastocistos como estadio final de todo el proceso.

7. Vitrificación y viabilidad tras la descongelación:

Los procedimientos de vitrificación, descongelación y determinación de la viabilidad post descongelación, fueron idénticos a los descritos en el Experimento 1.

8. Parámetros estudiados:

En este apartado se definen los parámetros estudiados en este experimento:

- **Maduración y fecundación:**

- Oocitos maduros: Suma del número total de embriones divididos a las 36 horas, los oocitos fecundados y no divididos (dos corpúsculos polares) y los oocitos maduros y no fecundados (un corpúsculo polar).
- Oocitos fecundados: Suma del número total de embriones divididos a las 36 horas y los oocitos fecundados y no divididos.

- Porcentaje de maduración: (número total de oocitos maduros en relación al número total de oocitos puestos a madurar) X 100.
- Porcentaje de división a las 36 horas: (número total de embriones divididos a las 36 horas en relación al número total de oocitos puestos a madurar) X 100
- **Cultivo:**
 - Porcentaje de blastocistos: (número total de blastocistos obtenidos a día 8 de la fecundación en relación al número total de embriones cultivados) X 100
- **Viabilidad post descongelación:**
 - Tasa de reexpansión: (número total de blastocistos reexpandidos en relación al número total de blastocistos descongelados) X 100.

9. Análisis estadístico:

Los diferentes porcentajes obtenidos en este experimento fueron analizados con el programa SPSS (v. 14.0) mediante un análisis de Chi cuadrado.

II. RESULTADOS

1. Maduración, fecundación y blastocistos obtenidos tras 8 días de cultivo *in vitro*:

En la **Tabla 11** se exponen los resultados de maduración, división embrionaria a las 36 horas de la fecundación y del porcentaje de blastocitos obtenidos tras 8 días de cultivo, todo ello a partir de oocitos obtenidos de ovarios de ovejas de matadero madurados y cultivados con distintas concentraciones de melatonina o sin ella (grupo control).

La adición de melatonina a los medios de maduración y de fecundación no tuvo ningún efecto significativo sobre la maduración oocitaria y la división embrionaria a las 36 horas. En todo caso y aunque sin significación estadística, el porcentaje de embriones obtenido 36 horas después de la fecundación fue ligeramente superior en el grupo con 10^{-6} M.

No obstante, el efecto positivo de la melatonina parece apreciarse en la fase de cultivo, donde los grupos con la hormona pineal en el medio parecen mejorar los porcentajes de desarrollo en relación al testigo, especialmente en el grupo 10^{-8} M, con el que se obtuvo un porcentaje de blastocistos superior al del grupo ausente de melatonina ($P=0,07$). No hubo diferencias entre grupos en lo que a la velocidad de desarrollo durante la fase de cultivo se refiere (**Tabla 12**).

2. Viabilidad y calidad de los embriones post descongelación:

Los resultados de descongelación se obtuvieron tras haber descongelado 52 embriones del grupo control, 53 embriones del grupo 10^{-6} , 57 embriones del grupo 10^{-8} y 48 embriones del grupo 10^{-10} todos ellos en estadio de blastocisto. Tras la descongelación, los embriones se cultivaron en TCM199 complementado de 10% de FCS y L-glutamina 1mM en una atmosfera humidificada con 5% de CO_2 a $39^{\circ}C$.

El grupo con una concentración de melatonina 10^{-10} M fue el que ofreció una mayor tasa de viabilidad tras la descongelación, próxima al 30%, el triple de la

mostrada por los otros dos grupos experimentales y más del doble de la del grupo control, y significativamente diferente de todos ellos ($P < 0,05$) (**Tabla 13**).

Por otra parte, la tinción por HOECHST mostró ausencia de significación entre los diferentes grupos, aunque el grupo con una mayor concentración de melatonina en los medios (10^{-6} M) fue el que mostró un menor número medio de células por blastocisto tras la reexpansión ($118,6 \pm 47,4$) (**Tabla 14**). Tampoco se observaron diferencias significativas a nivel de daño celular, en parte probablemente debido a que se trata de un parámetro con una elevada variabilidad, si bien parece que el grupo control fue el que mostró menor número medio de células con daños oxidativos por blastocisto (**Tabla 14**).

Tabla 11: *Maduración, división embrionaria a las 36 horas de la fecundación, y porcentaje de blastocitos obtenidos tras 8 días de cultivo de oocitos obtenidos de ovarios de ovejas de matadero, madurados y cultivados con distintas dosis de melatonina. Las diferentes letras (a, b) en superíndice en columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).*

Grupo	Maduración	División 36 horas	Blastocistos totales
10⁻⁶ M	183/243 (75,3%)	177/243 (72,8%)	91/177 (51,4%)
10⁻⁸ M	184/247 (74,5%)	172/247 (69,6%)	93/172 (54,1%) ^a
10⁻¹⁰ M	182/252 (72,2%)	173/252 (68,7%)	90/173 (52,0%)
Control	193/264 (73,1%)	184/264 (69,7%)	82/184 (44,6%) ^b

Letras diferentes indican diferencias de $P = 0,07$ (a, b)

Tabla 12: *Porcentaje de blastocistos producidos in vitro tras 6, 7 y 8 días de cultivo.*

Grupo	Día 6	Día 7	Día 8
10⁻⁶ M	32/177 (18,1 %)	65/177 (36,7 %)	91/177 (51,4 %)
10⁻⁸ M	33/172 (19,2 %)	70/172 (40,7 %)	93/172 (54,1 %) ^a
10⁻¹⁰ M	30/173 (17,3 %)	64/173 (37,0 %)	90/173 (52,0 %)
Control	31/184 (16,8 %)	59/184 (32,1 %)	82/184 (44,6 %) ^b

Letras diferentes indican diferencias de P =0,07 (a, b)

Tabla 13: Evaluación de la tasa reexpansión de los 3 grupos de melatonina y el grupo control tras la descongelación.

Grupo	10^{-6} M	10^{-8} M	10^{-10} M	Control
Tasa de reexpansión (%)	5/53 (9,4) ^b	(6/57) 10,5 ^b	(14/48) 29,2 ^a	7/52 (13,5) ^b

Letras diferentes indican diferencias de $P < 0,05$ (a, b)

Tabla 14: Números de células (\pm E.S.) por blastocisto obtenidas por tinción de Hoechst y números de células con reacción al peróxido de hidrogeno por la tinción de DCHFDA en blastocistos producidos *in vitro* en los tres grupos de melatonina (10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} M) y en el grupo control.

Grupo	10^{-6} M	10^{-8} M	10^{-10} M	Control
n	5	6	13	6
HOECHST	118,6 \pm 47,4	148,7 \pm 35,6	132,5 \pm 29,4	127 \pm 33
n	5	6	11	6
DCHFDA	28,2 \pm 18,6	24,5 \pm 6,0	33,6 \pm 15,1	19,8 \pm 1,4

III. DISCUSIÓN

La melatonina ha sido muy utilizada en los últimos años para mejorar los parámetros reproductivos en la especie ovina, de manera que en nuestro país su uso se ha extendido notablemente en las ganaderías desde su comercialización en el año 2000 por sus propiedades de revertir los efectos del anoestro estacionario, aumentando además la tasa de ovulación y la prolificidad en diferentes genotipos (Abecia et al., 2007). Además, en los últimos años se han podido documentar algunas de las acciones concretas de la melatonina, en particular sobre el ovario y la viabilidad embrionaria temprana (revisión de Abecia et al., 2008)

El carácter liposoluble de la melatonina permite su rápida difusión en los fluidos corporales y su facilidad para atravesar membranas celulares. De este modo, su efecto positivo en la mejora de la tasa de ovulación y de la prolificidad puede ser debido a una acción directa a nivel del oocito ovino. Así, existen en la literatura artículos que han evaluado los efectos de la adición de la melatonina en los medios de maduración y fecundación *in vitro*, con un efecto positivo sobre la maduración oocitaria y la tasa de división embrionaria, tanto en la especie humana (Park et al., 2006) como en ratones (Na et al., 2005) o bovinos (Dimitriadis et al., 2005). Además, las altas concentraciones de melatonina en el líquido folicular del folículo preovulatorio (Brzezinski et al., 1987) así como la presencia de receptores de melatonina en las células de la granulosa en varias especies (Na et al., 2005; Kang et al., 2009), sugieren asimismo un efecto directo de la hormona pineal sobre la competencia del oocito.

También hay que considerar que el posible efecto beneficioso de la melatonina en la producción de embriones *in vitro* puede estar mediatizado por su acción antioxidante, de captación de radicales libres (Reiter et al., 1995). En particular, es en el proceso de fecundación *in vitro* donde las altas concentraciones de espermatozoides en pequeños volúmenes de medios de fecundación, favorecen los procesos oxidativos y la formación de un mayor número de radicales libres. Es en este contexto donde la melatonina puede proporcionar una protección frente al estrés oxidativo y a sus efectos tóxicos (Tamura et al., 2008).

En el presente experimento, la suplementación con melatonina a los medios de maduración y de fecundación *in vitro* en estación reproductiva no tiene ningún efecto sobre la maduración y la división embrionaria a las 36 horas tras la fecundación, aunque el grupo 10^{-6} M en cuanto a la división, parece mostrar resultados algo superiores a los del resto sin que esta diferencia sea significativa. Resultados previos en nuestro laboratorio han mostrado que una concentración similar de melatonina es capaz de aumentar significativamente las tasas de maduración y de división embrionaria temprana frente al grupo testigo, sin melatonina (Casao et al., resultados no publicados); sin embargo, concentraciones algo superiores, 10^{-5} M, no ejercen ningún efecto significativo sobre la maduración y la división embrionaria. Estudios en la especie humana han mostrado que las concentraciones fisiológicas de melatonina en el fluido folicular son prácticamente 3 veces superiores a los niveles plasmáticos de la hormona. Así, las concentraciones 10^{-6} M de melatonina adoptadas en el presente estudio son similares a las que habría en el fluido folicular, con lo que constituyen una buena aproximación para evaluar los beneficios de la melatonina exógena sobre las fases de maduración y fecundación. Además, Ronnberg et al. (1990) han mostrado que las concentraciones intrafoliculares de melatonina están sujetas a variaciones estacionales, que pueden condicionar la diferente competencia para la maduración y fecundación de los oocitos recuperados en anoestro frente a los obtenidos en la estación sexual referida por algunos autores (Stenbak et al., 2001; Vazquez et al., 2008). Así, en nuestro estudio los oocitos fueron obtenidos en estación reproductiva, con lo que han podido estar sometidos a altas concentraciones de melatonina intrafoliculares que han podido condicionar el efecto de un posterior tratamiento con la hormona pineal *in vitro*.

De hecho, los resultados del presente experimento y los previos de nuestro laboratorio parecen coincidir con los mostrados por otros autores en el sentido de que el efecto de la melatonina sobre la maduración de oocitos es dosis-dependiente. De este modo y aunque la toxicidad de la melatonina es muy baja, parece que en ratón la melatonina a una concentración 10^{-3} M tiene un efecto claramente negativo sobre la maduración oocitaria (Adriaens et al., 2006).

En lo que el porcentaje de blastocistos obtenido como producto final de la producción de embriones *in vitro* se refiere, en el presente experimento, el tratamiento con melatonina mejoró dicho porcentaje respecto al grupo testigo. Aunque el análisis estadístico sólo mostró diferencias significativas entre el grupo melatonina 10^{-8} M y el control, lo cierto es que la melatonina mejoró una media de 8 puntos el porcentaje final de blastocistos respecto a la ausencia de ella en todo el proceso. La literatura carece de estudios de la adición de diferentes concentraciones de melatonina en los medios de cultivo *in vitro*, aunque en nuestro estudio las menores concentraciones de melatonina (10^{-8} y 10^{-10} M) parecen comportarse bien a la hora de favorecer el desarrollo embrionario; sin embargo, concentraciones más altas (10^{-6} M) fueron más efectivas en el presente estudio en la etapa de fecundación, probablemente debido a la capacidad protectora de la melatonina de los efectos dañinos del estrés oxidativo (Chetsawang et al., 2006), alto en situaciones de elevado metabolismo, cual es el caso de la fecundación *in vitro*. Incluso, concentraciones intermedias entre 10^{-5} y 10^{-6} en los medios de cultivo tras la descongelación mejoraron la tasa de reexpansión de blastocistos ovinos descongelados (Abecia et al., 2002a).

Esta capacidad antioxidante de la melatonina también se ha comprobado en la fase de cultivo *in vitro*, aunque también puede haber un efecto dosis dependiente, de manera que incluso se han descrito efectos negativos de altas concentraciones de melatonina (iguales o superiores a 10^{-3} M) sobre el desarrollo de embriones porcinos (Rodríguez-Osorio et al., 2007).

En cuanto a la descongelación, se puede ver que el grupo de embriones que estuvieron sometidos a niveles de melatonina 10^{-10} M durante todo el proceso de producción *in vitro*, mostró una tasa de reexpansión significativamente mayor (29%) a la del resto de los grupos, doblando la del grupo control y prácticamente triplicando la de los otros grupos experimentales con mayores concentraciones de melatonina en los medios. Estos resultados positivos de las menores concentraciones de melatonina sobre el cultivo y la viabilidad de los embriones, de confirmarse en ulteriores ensayos, pueden tener un notable interés en la optimización de la eficacia de las técnicas de producción de embriones ovinos *in vitro* y en la conservación de

los mismos. Hay que tener en cuenta que en la fase de desarrollo, tras la fecundación, los embriones fueron cultivados en una estufa de nitrógeno, con una concentración de oxígeno de únicamente el 5%, lo que ha podido atenuar los efectos de altas concentraciones de melatonina y destacar la eficacia de bajas concentraciones de la hormona en la viabilidad de los blastocistos obtenidos. Así y en un reciente estudio, Papis et al. (2007) han mostrado que los efectos beneficiosos de la melatonina sobre el desarrollo de embriones bovinos fue mayor cuando los embriones fueron cultivados en presencia de altas concentraciones de oxígeno atmosférico (20%) frente a concentraciones fisiológicas del mismo (7%). Por otra parte y aunque otros autores han mostrado mayores tasas de reexpansión tras la descongelación de blastocitos producidos *in vitro* que las obtenidas en el presente estudio (Zhu et al., 2001; Dattena et al., 2004), hay que tener en cuenta que en nuestro caso los embriones, al igual que se hizo con los obtenidos *in vivo* en el experimento 1, fueron congelados en presencia de PVA para evitar contaminaciones y el síndrome de elevado peso al nacimiento inducido por el uso de suero, lo que ha podido reducir ligeramente la viabilidad. En cualquier caso, queda claro que la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* se reduce notablemente en relación a los producidos *in vivo*, prácticamente a la mitad e incluso más, debido a su mayor sensibilidad a la congelación (Leibo y Loskutoff, 1993; Dattena et al., 1994).

Los datos anteriores de reexpansión parecen ser confirmados por los resultados de tinción. Aunque las diferencias no fueron significativas, el grupo 10^{-6} M, que fue el que mostró la tasa de reexpansión más baja, también fue el que tuvo un número menor de células por blastocisto (119), mientras que el grupo 10^{-10} M tuvo un número más alto (132) y sobre todo el grupo 10^{-8} , con 148 células por embrión. Estos resultados parecen indicar que las altas concentraciones de melatonina en el medio no parecen ser adecuadas en las fases de desarrollo embrionario posteriores a la fecundación. Hay que tener en cuenta de nuevo que en esta fase de cultivo los embriones fueron cultivados en una estufa de nitrógeno, con una concentración muy baja de oxígeno (5%), lo que puede limitar el efecto de altas concentraciones de la hormona pineal tal y como ya se ha señalado con anterioridad.

Por lo que a los resultados obtenidos tras la tinción por el DCHFDA se refiere, no existieron diferencias entre los distintos grupos. Destaca el hecho de que el número de células reactivas por blastocisto fue similar al obtenido en el experimento 1, en el que se utilizaron embriones producidos *in vivo* pero asimismo descongelados. Sin embargo, el grupo control se comportó realmente bien, mostrando un número de células reactivas por embrión inferior a 20, muy similar al mostrado por embriones recientemente producidos asimismo *in vitro* en nuestro laboratorio pero no congelados (Buffoni, 2009).

IV. CONCLUSIONES

- ✓ La adición de melatonina a los medios de maduración y de fecundación no tuvo ningún efecto significativo sobre la maduración oocitaria y la división embrionaria a las 36 horas. No obstante, el efecto positivo de la melatonina parece apreciarse en la fase de cultivo, donde los grupos con la hormona pineal en el medio parecen mejorar los porcentajes de desarrollo en relación al testigo, especialmente en el grupo 10^{-8} M.
- ✓ Por lo que a la viabilidad de los embriones obtenidos se refiere, el grupo con una concentración de melatonina 10^{-10} M fue el que ofreció una significativamente superior tasa de viabilidad tras la descongelación, próxima al 30%, el triple de la mostrada por los otros dos grupos experimentales y más del doble de la del grupo control.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

En las condiciones en que se realizó el presente estudio podemos concluir lo siguiente:

- ✓ El tratamiento superovulatorio simplificado combinado (eCG+FSH) utilizado en el presente experimento permitió obtener resultados muy satisfactorios en cuanto a la producción de embriones y viabilidad de estos mismos tras la vitrificación en ovejas de raza Ojalada Soriana, en todos los casos muy similares a los obtenidos con el protocolo de 6 inyecciones decrecientes de FSH. Así, en el conjunto de las 3 recuperaciones se obtuvieron un total de 13,7 y 14,1 embriones viables respectivamente.
- ✓ Se detectó un efecto significativo del número de recuperación ($P < 0,05$ a $P < 0,01$) sobre la práctica totalidad de los parámetros analizados, que se vieron notablemente perjudicados en la segunda y tercera recuperaciones independientemente del tratamiento de superovulación recibido.
- ✓ Un 30% de las ovejas que recibieron el tratamiento decreciente mostraron una fase luteal corta en la primera recuperación, frente a únicamente un 5% en el caso del tratamiento decreciente. El mayor estrés consecuencia del número de inyecciones pudo ser la causa, pues dicho problema se redujo drásticamente en las subsiguientes recuperaciones.
- ✓ El tratamiento simplificado adelantó significativamente la salida en celo, aspecto a tener muy en cuenta a la hora de realizar la fecundación mediante IA o de recuperar embriones en el estadio de desarrollo deseado.
- ✓ Unos niveles elevados de anticuerpos anti eCG previos a la aplicación del tratamiento simplificado, se asociaron con una reducción significativa de la tasa de fecundación en las tres recuperaciones, de manera que en la segunda y tercera dicha reducción afectó también a las tasas de viabilidad y de congelabilidad.

- ✓ El tratamiento de superovulación no modificó la viabilidad *in vitro* de los embriones tras la descongelación ni en el número de células de los mismos
- ✓ La adición de melatonina a los medios de maduración y de fecundación *in vitro* no tuvo ningún efecto significativo sobre la maduración oocitaria y la división embrionaria a las 36 horas. No obstante, la melatonina parece ejercer un efecto positivo en la fase de cultivo, donde los grupos con la hormona pineal en el medio parecen mejorar los porcentajes de desarrollo en relación al testigo, especialmente en el grupo 10^{-8} M,
- ✓ Por lo que a la viabilidad de los embriones obtenidos *in vitro* se refiere, el grupo con una concentración de melatonina 10^{-10} M fue el que ofreció una significativamente superior tasa de viabilidad tras la descongelación, próxima al 30%, el triple de la mostrada por los otros dos grupos experimentales y más del doble de la del grupo control.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A. & Palacín, I. 2008. Effect of exogenous melatonin on the ovary, the embryo and the establishment of pregnancy in sheep. *animal*. 2 (03): 399-404.
- Abecia, J. A., Forcada, F. & Zuniga, O. 2002a. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. *Veterinary Research Communications*. 26 (2): 151-158.
- Abecia, J. A., Forcada, F., Zúñiga, O. & Valares, J. A. 2002b. The effect of progestagen treatment on sheep reproductive performance at different phases of the oestrous cycle. *Anim. Res*. 51 (2): 149-155.
- Abecia, J. A., Valaresa, J. A., Forcada, F., Palacin, I., Martin, S. & Martino, A. 2007. The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. *Small Ruminant Research*. 69 (1-3): 10-16.
- Adams, G. P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl*. 54: 17-32.
- Adriaens, I., Jacquet, P., Cortvrindt, R., Janssen, K. & Smitz, J. 2006. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*. 228 (2-3): 333-343.
- Ainsworth, L., Tsang, B., Downey, B., Marcus, G. & Armstrong, D. 1980. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol. Reprod*. 23: 621-627.
- Alberio, R., Olivera, J., Roche, A., Alabart, J. & Folch, J. 2002. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Ruminant Research*. 46 (2-3): 81-87.
- Alberio, R. H., Echegoyen, E., Olivera, J., Roche, A., Alabart, J. L., Fernandez-arias, A. & Folch, J. 2001. Performance in a OPU program of FSH stimulated or nonstimulated Romanov and Rasa Aragonesa ewe breeds. *Theriogenology*. 55: 509 (abstract).
- Allen, W. R. & Moor, R. M. 1972. The origin of the equine endometrial cups. *J Reprod Fertil*. 29 (2): 313-316.
- Anel, L., Sevillano, C., Alvarez, M., Alegre, B., Anel, E., Domínguez, J. C., Carbajo, M. T. & De La Fuente, J. 1997. Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. *Theriogenology*. 47 (1): 152-152.
- Armstrong, D. T. & Evans, G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19 (1): 31-42.

- Armstrong, D. T., Pfizner, A. P., Warnes, G. M., Ralph, M. M. & Seamark, R. F. 1983. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *J Reprod Fertil.* 67 (2): 395-401.
- Baldassarre, H., de Matos, D. G., Furnus, C. C., Castro, T. E. & Cabrera Fischer, E. I. 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science.* 35 (1-2): 145-150.
- Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray, A. & Merrell, B. 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology.* 56 (1): 147-155.
- Baril, G., Chemineau, P., Cognie, Y., Guérin, Y., Lebœuf, B., Orgeur, P. & Vallet, J. C. 1993. Caractéristiques de reproduction des ovins et des caprins. In: FAO (ed.) *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*, p 4-46. Rome.
- Berbion, P., Baril, G., Cognie, Y. & Vallet, J. C. 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.* 41: 331-339.
- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P. P., Rosati, I., Ledda, S. & Naitana, S. 2004. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology.* 61 (7-8): 1477-1486.
- Bettencourt, E. M., Bettencourt, C. M., Silva, J. C. e., Ferreira, P., Manito, C. I., Matos, C. M., Romão, R. J. & Rocha, A. 2008. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Ruminant Research.* 74 (1-3): 134-139.
- Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A. & Sirard, M. A. 1996. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology.* 46 (7): 1191-1203.
- Bodin, L., Drion, P. V., Remy, B., Brice, G., Cognié, Y. & Beckers, J. F. 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reprod Nutr Dev.* 37 (6): 651-660.
- Brogliatti, G. M., Palasz, A. T., Rodriguez-Martinez, H., Mapletoft, R. J. & Adams, G. P. 2000. Transvaginal collection and ultrastructure of Llama oocytes. *Theriogenology.* 54 (8): 1269-1279.
- Brown, B. W. & Radziewicz, T. 1998. Production of sheep embryos in vitro and development of progeny following single and twin embryo transfers. *Theriogenology.* 49 (8): 1525-1536.
- Brück, I., Synnestvedt, B. & Greve, T. 1997. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology.* 47 (6): 1157-1167.

- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H. & Wurtman, R. J. 1987. Melatonin in human preovulatory follicular-fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 64 (4): 865-867.
- Buffoni, A. 2009. Evaluación de la Producción *in vitro* de embriones a partir de oocitos de ovarios de ovejas superovuladas recuperados el Día 8 tras el celo. *Memoria fin de Master*. Facultad de veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- Cahill, L. P., Driancourt, M. A., Chamley, W. A. & Findlay, J. K. 1985. Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep. *J Reprod Fertil*. 75 (2): 599-607.
- Cameron, A. W. N., Battye, K. M. & Trounson, A. O. 1988. Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. *J Reprod Fertil*. 83 (2): 747-752.
- Carolan, C., Lonergan, P., Monget, P., Monniaux, D. & Mermillod, P. 1996. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev*. 43: 477-483.
- Casao, A., Yáñez, J., Forcada, F., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2007. Efecto de la melatonina en los procesos de IVM e IVF en la especie ovina. *XII Jornadas sobre Producción Animal. AIDA-ITEA*.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Cidadão, R. & Robalo Silva, J. 2003. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology*. 60 (3): 521-532.
- Cheng, W. T. K., Moor, R. M. & Polge, C. 1986. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 25 (1): 146 (abstract).
- Chetsawang, B., Putthaprasart, C., Phansuwan-Pujito, P. & Govitrapong, P. 2006. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *Journal of Pineal Research*. 41 (2): 116-123.
- Christakos, S. & Bahl, O. P. 1979. Pregnant mare serum gonadotropin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *J. Biol. Chem*. 254 (10): 4253-4261.
- Chupin, D., Cognie, Y., Combarous, Y., Procureur, R. & Saumande, J. 1987. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and the ewe. In: O'Callaghan, J. R. (ed.) *Follicle Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, p 63-72. Dordercht.
- Cognie, Y. 1992. Progress in reproduction techniques in sheep. *World Sheep and Wool Congress, Argentina*.

- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51 (1): 105-116.
- Cole, H. H. & Hart, G. H. 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am J Physiol*. 93 (1): 57-68.
- Cox, J. F. & Saravia, F. 1992. Use of a multiple sperm penetration assay in ovines. *Proceedings of the XVII Annual Meeting of the Chilean Society of Animal Production, Chilean*.
- Cox, J. F., Saravia, F., Briones, M. & Santa maría, A. 1995. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 451-460.
- Cran, D. & Cheng, W. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during in vitro and in vitro fertilization. *Gam. Res.* 13: 241-251.
- D'Alessandro, A., Martemucci, G., Toteda, F., Gambacorta, M. & Manchisi, A. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. *Small Ruminant Research*. 19: 255-261.
- D'Alessandro, A. G., Martemucci, G., Colonna, M. A., Borghese, A., Terzano, M. G. & Bellitti, A. 2001. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Animal Reproduction Science*. 65 (3-4): 255-264.
- Dattena, M., Accardo, C., Pilichi, S., Isachenko, V., Mara, L., Chessa, B. & Cappai, P. 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*. 62 (3-4): 481-493.
- Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S. & Cappai, P. 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*. 42 (2): 235-239.
- De felici, M. & Siracusa, G. 1982. Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. *Gam. Res.* 6: 107-113.
- De matos, D., Furnus, C. & Moses, D. 1997. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 57: 1420-1425.
- De matos, D., Furnus, C., Moses, D. & Baldassarre, H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 432-436.

- De matos, D., Furnus, C., Moses, D. & Matkovic, M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 451-457.
- Demoustier, M. M., Beckers, J. F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J. L. & Ectors, F. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*. 30 (2): 379-386.
- Dieleman, S. J., Kruij, T. A. M., Fontijne, P., Jong, W. H. R. D. & Weyden, G. C. V. D. 1983. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J.Endocrinol.* 97: 31-42.
- Dimitriadis, I., Papanikolaou, T., Vainas, E., Amiridis, G. S., Valasi, I., Samartzi, F. & Rekkas, C. A. 2005. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 40: 397-397.
- Ding, J. & Foxcroft, G. 1992. Follicular heterogeneity and oocyte maturation *in vitro* in pigs. *Biol. Reprod.* 47: 648-655.
- Ding, J. & Foxcroft, G. 1994. Conditioned media produced by follicular cells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.* 50: 1377-1384.
- Doherty, E. M. O., Wade, M. G., Hill, J. L. & Boland, M. P. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*. 48 (1): 161-169.
- Driancourt, M. A. 1987. Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J Reprod Fertil.* 80 (1): 207-212.
- Driancourt, M. A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55 (6): 1211-1239.
- Driancourt, M. A., Gibson, W. R. & Cahill, L. P. 1985. Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reproduction Nutrition Développement*. 25 (1A): 1-15.
- Driancourt, M. A., Gougeon, A., Royere, D. & Thibault, C. 1993. Ovarian function. In: C. Thibault, M. C. L., R.H.F. Hunter (ed.) *Reproduction in mammals and man.*, p 281-305. Paris, *Ellipses*.
- Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Koft, G. & Schultz, R. 1990. Precocious loss of granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucid. *Dev. Biol.* 137: 46-55.
- Duque, P., Hidalgo, C., Gómez E., Pintado, B., Facal, N. & Diez, C. 2003. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source:

- Effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 487-496.
- Durinzik, K., Saniga, E. & Lanzendorf, S. 1995. The relationship between size and maturation *in vitro* in the unstimulated human oocyte. *Fert. Steril.* 63: 404-406.
- Einspanier, A., Wempe, F. & Scheit, K. H. 1991. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1006-1010.
- Eppig, J. J. 1980. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*. *Biology of Reproduction.* 23 (3): 545-552.
- Eppig, J. J., Schultz, R. M., O'Brien, M. & Chesnel, F. 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 164: 1-9.
- Evans, A. C. O., Duffy, P., Hynes, N. & Boland, M. P. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology.* 53 (3): 699-715.
- Flores-Foxworth, G., McBride, B. M., Kraemer, D. C. & Nuti, L. C. 1992. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology.* 37 (1): 213-213.
- Forcada, F., Abecia, J. A., Cebrián-Pérez, J. A., Muño-Blanco, T., Valares, J. A., Palacín, I. & Casao, A. 2006. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes *Theriogenology.* 65 (2): 356-365.
- Forcada, F., Abecia, J. A., Lozano, J. M. & Zuñiga, O. 2000. Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. *Livestock Production Science.* 66 (3): 263-269.
- Fortune, J. E. 2002. Activation of primordial follicles. In: Eppig J., H.-h. C., Lessl M. (ed.) *The future of the oocyte basic and clinical aspects.*, p 11-21. Nueva York, EEUU.
- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y. & Ono, H. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology.* 18 (2): 161-175.
- Fukui, Y., Okada, M. & N., I. 1998. Incidence of Premature Luteal Regression in Ewes Superovulated with a Single Injection of Follicle-Stimulating Hormone Combined with Equine Chorionic Gonadotropin. *J. Reprod. Dev.* 44: 407-412.
- Fukui, Y. & Sakuma, Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* in relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 22: 669-673.

- Funahashi, H., Cantley, T., Stumpf, T., Terlouw, S. & Day, B. 1994. Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 51: 633-639.
- Funahashi, H. & Day, B. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 98: 179-185.
- Galli, C. & Lazzari, G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science.* 42 (1-4): 371-379.
- Gandolfi, F., Luciano, A. M., Modina, S., Ponzini, A., Pocar, P., Armstrong, D. T. & Lauria, A. 1997. The *in vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology.* 48 (7): 1153-1160.
- García-López, N., Ollero, M., Muiño-Blanco, T. & Cebrián-Pérez, J. A. 1996. A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology.* 46 (1): 141-151.
- Gardner, D., Lane, M., Spitzer, A. & Batt, P. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod.* 50 (2): 390-400.
- Gibbons, A. E. & Cueto, M. I. 1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. *Revista interna INTA EEA Bariloche, Argentina.*
- Gibbons, J. R., Wiltbank, M. C. & Ginther, O. J. 1997. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction.* 57 (5): 1066-1073.
- González-Bulnes, A., Baird, D. T., Campbell, B. K., Cocero, M. J., García-García, R. M., Inskeep, E. K., López-Sebastián, A., McNeilly, A. S., Santiago-Moreno, J., Souza, C. J. H. & Veiga-López, A. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development.* 16 (4): 421-435.
- Gonzalez-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R. M., Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A. & Cocero, M. J. 2002a. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology.* 58 (8): 1607-1614.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J. & Lopez-Sebastian, A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology.* 54 (7): 1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J., Souza, C. J. H., Groome, N. P., Garcia-Garcia, R. M., Lopez-Sebastian, A. & Baird, D. T. 2002b.

- Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*. 57 (4): 1263-1272.
- Gonzalez-Reyna, A., Marquez-Garca, E., Lizarraga-Tracy, H. & Martinez-Gonzalez, J. C. 1999. Dose response effects of PMSG on ovulation rate and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncro-mate-B implants. *Small Ruminant Research*. 31: 149-155.
- Gopichandran, N. & Leese, H. J. 2006. The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 131 (2): 269-277.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory production of cattle embryos*, Wallingford, Oxon UK: CAB International.
- Gordon, I. & Lu, K. H. 1990. Production of embryos in vitro and its-impact on livestock production. *Theriogenology*. 33 (1): 77-87.
- Grasa, P., Perez-Pe, R., Baguena, O., Forcada, F., Abecia, A., Cebrian-Perez, J. A. & Muino-Blanco, T. 2004. Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-Up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes. *J Androl*. 25 (6): 982-990.
- Guler, A., Poulin, N., Mermillod, P., Terqui, M. & Cognié, Y. 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 54 (2): 209-218.
- Hammami, S. 2008. Producción de embriones ovinos “in vitro” con vistas a la selección genética. *Tesis de Master of science*. Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoza.
- Harstone, G. 2000. The embryo. *Human Reproduction* 15: 31-41.
- Henderson, K. M., Weaver, A., Wards, R. L., Ball, K., Lun, S., Mullin, C. & McNatty, K. P. 1990. Oocyte production and ovarian steroid concentrations of immature rats in response to some commercial gonadotrophin preparations. CSIRO Publishing.
- Herve, V., Roy, F., Bertin, J., Guillou, F. & Maurel, M.-C. 2004. Antiequine Chorionic Gonadotropin (eCG) Antibodies Generated in Goats Treated with eCG for the Induction of Ovulation Modulate the Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Bioactivities of eCG Differently. *Endocrinology*. 145 (1): 294-303.
- Hewitt, D. A. & England, G. C. W. 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology*. 49 (5): 957-966.
- Hirshfield, A. N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. In: K.W. Jeon & Friedlander, M. (eds.) *International Review of Cytology: academic press*, p 43-101.

- Huneau, D., Crozet, N. & Ahmed-Ali, M. 1994. Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. *Theriogenology*. 42 (6): 1017-1028.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. & Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47 (1): 23-32.
- Hyttel, P., Greve, T. & Callesen, H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl*. 38: 35-47.
- Hyttel, P., Xu, K., Smith, S. & Greve, T. 1986. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* 78: 615-625.
- Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A. & Itoh, M. T. 2000. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *J. Pineal Res.* 28: 48-51.
- Ishwar, A. K. & Memon, M. A. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*. 19: 35-43.
- Issels, R., Nagele, A., Eckert, K. & Wilmanns, W. 1988. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and n-acetylcysteine. *Biochem. Pharmacol.* 37: 881-888.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., López-Bejar, M. & Paramio, M. T. 2002. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*. 57 (5): 1431-1441.
- Jabbour, H. N. & Evans, G. 1991. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Animal Reproduction Science*. 26: 93-106.
- Kang, J.-T., Koo, O.-J., Kwon, D.-K., Park, H.-J., Jang, G., Kang, S.-K. & Lee, B.-C. 2009. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *Journal of Pineal Research*. 46: 22-28.
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J. F. & Boland, M. P. 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*. 46 (1-2): 1-14.
- Lajous, D., Joly, T., Baril, G., cognie, Y. & beckers, J. F. 1997. Superovulatory response and quality of embryos recovered from Romanov ewes after a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Proceedings of the 13th Meeting Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE)*, p 166 (abstract).
- Laster, D. B. 1972. Disappearance and uptake of ¹²⁵I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil*. 30 (3): 407-415.

- Laurincik, J., Kopecny, V. & Hyttel, P. 1994. Pronucleus development and DNA-synthesis in bovine zygotes produced in vivo. *Theriogenology*. 41 (1): 235-235.
- Ledda, S., Naitana, S., Cappai, P., Branca, A., Loi, P., Forcada, F., Abecia, J. A. & Zarazaga, L. 1992. Efecto del tratamiento PMSG/FSHp sobre la superovulación en ovejas Sarda y Rasa Aragonesa. *Actas de las VI Jornadas Científicas de Reproducción Animal e IA.*: 298-303.
- Leibfried, L. & First, N. L. 1979. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. *J. Anim Sci.* 48 (1): 76-86.
- Leibo, S. P. & Loskutoff, N. M. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 39 (1): 81-94.
- Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P., Ledda, S. & Naitana, S. 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower *in vitro* viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 (3): 239-246.
- Leoni, G. G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L. & Naitana, S. 2007. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Molecular Reproduction and Development*. 75 (2): 373-382.
- Li, F., Pi, W. H., Zhu, H. Z., Zhang, S. S., Liu, S. R. & Xue, J. L. 2006. The effect of estrous ewe serum and heparin on in vitro fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Ruminant Research*. 63 (3): 226-232.
- Lindner, G. M. & Wright Jr, R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20 (4): 407-416.
- Lonergan, P., Carolan, C., Langendonckkt, A. V., Donnay, I., Khatir, H. & Mermillod, P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biology of reproduction*. 54: 1420-1429.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. & Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 48-53.
- López Sebastián, A., Gomez-Brunet, A., Lishman, A. W., Johnson, S. K. & Inskeep, E. K. 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *J Reprod Fertil.* 99 (2): 437-442.
- López Sebastián, A., González de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gómez Brunet, A., Townsend, E. C. & Inskeep, E. K. 1999. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to fsh in spanish merino ewes. *Theriogenology*. 52 (3): 505-514.

- Marquant-Leguienne, B. & Humblot, P. 1998. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*. 49 (1): 3-11.
- Martemucci, G., D'Alessandro, A., Toteda, F., Facciolongo, A. M. & Gambacorta, M. 1995. Embryo production and endocrine response in ewes superovulated with PMSG, with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. *Theriogenology*. 44: 691-703.
- Martemucci, G., Gambacorta, M., Toteda, F., Manchisi, A. & Bellitti, E. 1988. Superovulatory response to treatment with PMSG, FSH-P or hMG in ewe for embryo transfer. *Zoot. Nutr. Anim.* 15: 379-386.
- Martinez, A. G. & Matkovic, M. 1998. Cryopreservation of ovine embryos: Slow freezing and vitrification. *Theriogenology*. 49 (5): 1039-1049.
- Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M. & Seren, E. 1988. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. *Gamete Research*. 21: 223-232.
- Maurel, M.-C., Roy, F., Hervé, V., Bertin, J., Vaiman, D., Cribiu, E., Manfredi, E., Bouvier, F., Lantier, I., Boue, P. & Guillou, F. 2003. Immune response to equine Chorionic Gonadotropin used for the induction of ovulation in goats and ewes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 31: 766-769.
- Maxwell, W. N. C. & Wilson, H. R. 1989. Superovulation and embryo recovery in ewes treated with a single injection of PMSG and FSH-P. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 21: 50 (abstract).
- McKelvey, W. A. C., Robinson, J. J., Aitken, R. P. & Robertson, I. S. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*. 25: 855-865.
- McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K. & Samuelsson, B. 1972. Prostaglandin F2a identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature*. 238: 129-134.
- McIntosh, J. E. A., Moor, R. M. & Allen, W. R. 1975. Pregnant mare serum gonadotrophin: Rate of clearance from the circulation of sheep. *J Reprod Fertil*. 44 (1): 95-100.
- McNatty, K. P., Hudson, N., Gibb, M., Ball, K., Henderson, K. M., Heath, D. A., Lun, S. & Kieboom, L. E. 1985. FSH influences follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J Reprod Fertil*. 75 (1): 121-131.
- Mermillod, P. 2002. Reproduction-gamete and embryo technology: *In vitro* fertilization. *Elsevier Science doi: 10.1006, recds 0431*.

- Mermillod, P., Oussaid, B. & Cognie, Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 54: 449-60.
- Montgomery, G., Galloway, S., Davis, G. & McNatty, K. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction.* 121 (6): 843-852.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J. & Alberio, R. H. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology.* 65: 1551-1562.
- Mutiga, E. R. & Baker, A. A. 1982. Superovulatory response in merino ewes to three PMSG dose levels. *Theriogenology.* 17: 100 (Abstract).
- Na, K., Kim, J., Lee, J., Yoon, T., Cha, K. & Lee, D. 2005. Effect of Melatonin on the Maturation of Mouse GV Oocytes and Apoptosis of Cumulus Cells In Vitro. *Fertility and Sterility.* 84 (Supplement 1): S103-S103.
- Naitana, S., Dattena, M., Gallus, M., Loi, P., Branca, A., Ledda, S. & Cappai, P. 1995. Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocysts. *Theriogenology.* 43 (8): 1371-1378.
- Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M. & Cappai, P. 1997. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Animal Reproduction Science.* 48 (2-4): 247-256.
- Naito, K., Fukuda, Y. & Toyoda, Y. 1988. Effect of pig follicular fluid on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Gam. Res.* 21: 289-295.
- Naqvi, S. M. K. & Gulyani, R. 1999. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. *Small Ruminant Research.* 34 (2): 127-131.
- Nasr-Esfahani, M., Aitken, J. & Johnson, M. 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development.* 109 (2): 501-507.
- Nicholas, F. W. & Smith, C. 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Animal Production.* 36: 341-353.
- Okada, A., Kamada, S., Jeon, C.-W., Miyamoto, A. & Fukui, Y. 2000. Incidence of Abnormal Corpus Luteum in Superovulated Ewes. *J. Reprod. Dev.* 46: 397-402.
- Okada, M., Ishida, N., Ogiso, T., Itagaki, R., Ishikawa, D. & Y., F. 1999. Effect of Dosage of Equine Chorionic Gonadotropin Combined with a Single Injection of Porcine Follicle-Stimulating Hormone for Superovulation Treatment in Ewes. *J. Reprod. Dev.* 45: 307-313.

- Osborn, J. C. & Moor, R. M. 1983. The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *J. Steroid Biochem.* 19: 133-137.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. & Suzuki, T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology.* 48 (5): 769-774.
- Papis, K., Poleszczuk, O., Wenta-Muchalska, E. & Modlinski, J. A. 2007. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research.* 43: 321-326.
- Park, E., Lee, D., Cho, J., Han, J., Cha, K. & Yoon, T. 2006. P-103: Addition of melatonin in in vitro maturation (IVM) medium increases maturation and fertilization of immature human oocytes. *Fertility and Sterility.* 86 (3, Supplement 1): S168-S168.
- Pavlok, A., Torner, H., Motlik, J., Fulka, J., Kauffold, P. & Duschinski, U. 1988. Fertilization of bovine oocytes in vitro: Effect of different sources of gametes on fertilization rate and frequency of fertilization anomalies. *Animal Reproduction Science.* 16 (3-4): 207-213.
- Pierson, J., Wang, B., Neveu, N., Sneek, L., Cote, F., Karatzas, C. N. & Baldassarre, H. 2004. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reproduction Fertility and Development.* 16 (8): 795-799.
- Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A. & Llano, B. P. 1998. Superovulatory response of murciana goats to treatments based on PMSG/anti-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology.* 50 (3): 357-364.
- Ptak, G., Dattena, M., Loi, P., Tischner, M. & Cappai, P. 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology.* 52 (6): 1105-1114.
- Pugh, P. A., Fukui, Y., Tervit, H. R. & Thompson, J. G. 1991. Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. *Theriogenology.* 36 (5): 771-778.
- Rao, B. S., Naidu, K. S., Amarnath, D., Vagdevi, R., Rao, A. S., Brahmaiah, K. V. & Rao, V. H. 2002. In vitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Ruminant Research.* 43 (1): 31-36.
- Raso, M., Buratovich, O. & Villa, M. 2004. Comparación de 4 tratamientos de sincronización de celos en ovinos. *Carpeta Técnica, Ganadería N° 9, Abril 2004. EEA INTA Esquel.*
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlowwalden, L., Chuang, J. I., Ortiz, G. G. & Acunacastroviejo, D. 1995. A review of the

- evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*. 18 (1): 1-11.
- Riesenberg, S., Meinecke-Tillmann, S. & Meinecke, B. 2001. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German Merino ewes. *Theriogenology*. 55 (4): 847-865.
- Robinson, J. J., Wallace, J. M. & Aitken, R. P. 1989. Fertilization and ovum recovery rates in superovulated ewes following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different times after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns. *Journal of Reproduction and Fertility*. 87 (2): 771-782.
- Rodriguez-Osorio, N., Kim, I. J., Wang, H., Kaya, A. & Memili, E. 2007. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. *Journal of Pineal Research*. 43 (3): 283-288.
- Rodríguez, C., Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J., Chamorro, C. & Paz, P. 2006. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*. 41 (2): 106-113.
- Romero-Arredondo, A. & Seidel Jr, G. E. 1994. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 41 (2): 383-394.
- Ronnberg, L., Kauppila, A., Leppaluoto, J., Martikainen, H. & Vakkuri, O. 1990. Circadian and Seasonal Variation in Human Preovulatory Follicular Fluid Melatonin Concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 71 (2): 493-496.
- Rose, T. A. & Bavister, B. D. 1992. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Rep. Dev*. 31: 72-77.
- Roy, F., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E. P., Pobel, T., Deletang, F., Combarnous, Y., Guillou, F. & Maurel, M.-C. 1999a. Humoral Immune Response to Equine Chorionic Gonadotropin in Ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and Interference with Subsequent Fertility. *Biol Reprod*. 61 (1): 209-218.
- Roy, F., Maurel, M.-C., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E. P., Lantier, I., Pobel, T., Deletang, F., Combarnous, Y. & Guillou, F. 1999b. The Negative Effect of Repeated Equine Chorionic Gonadotropin Treatment on Subsequent Fertility in Alpine Goats Is Due to a Humoral Immune Response Involving the Major Histocompatibility Complex. *Biol Reprod*. 60 (4): 805-813.
- Rubianes, E., Ibarra, D., Ungerfeld, R., Carbajal, B. & de Castro, T. 1995. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*. 43 (2): 465-472.

- Rubianes, E., Ungerfeld, R., Viñoles, C., Rivero, A. & Adams, G. P. 1997. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 47 (8): 1479-1488.
- Ryan, J. P., Hunton, J. R. & Maxwell, W. M. C. 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 551-60.
- Scaramuzzi, R. J., Adams, N. R., Baird, D. T., Campbell, B. K., Downing, J. A., Findlay, J. K., Henderson, K. M., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S. & Tsonis, C. G. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction Fertility and Development*. 5 (5): 459-478.
- Schiewe, M. C., Fitz, T. A., Brown, J. L., Stuart, L. D. & Wildt, D. E. 1991. Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin F2 alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 93 (1): 19-30.
- Scudamore, C. L., Robinson, J. J., Aitken, R. P., Kennedy, D. J., Ireland, S. & Robertson, I. S. 1991. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. *Theriogenology*. 35 (2): 329-337.
- Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. & Hanada, A. 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*. 30 (3): 489-496.
- Shirazi, A. & Sadeghi, N. 2007. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Research*. 69 (1-3): 103-107.
- Simonetti, L. 2008. Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O. E., Carou, N., Alberio, R. H., Abecia, J. A. & Palacin, I. 2008. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*. 104 (2-4): 227-237.
- Smith, C. L. 1984. Dose effect of Follicle Stimulating Hormone for superovulation of crossbred Targhee ewes : C.L. Smith, Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824. *Theriogenology*. 21 (1): 262-262.
- Soonen, A. H., Lewalski, S., Meinecke-Tillman, S. & Meinecke, B. 1991. Trabcervical collection of ovine and caprine embryos. *7th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Cambridge*. 1: 208.

- Sorensen, R. & Wassarman, M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 50: 531-536.
- Stangl, M., Kühholzer, B., Besenfelder, U. & Brem, G. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*. 52 (4): 709-716.
- Stenbak, T. K., Redmer, D. A., Berginski, H. R., Erickson, A. S., Navanukraw, C., Toutges, M. J., Bilski, J. J., Kirsch, J. D., Kraft, K. C., Reynolds, L. P. & Grazul-Bilska, A. T. 2001. Effects of follicle stimulating hormone (FSH) on follicular development, oocyte retrieval, and in vitro fertilization (IVF) in ewes during breeding season and seasonal anestrus. *Theriogenology*. 56 (1): 51-64.
- Sun, F. J., Holm, P., Irvine, B. & Seamark, R. F. 1994. Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocytes in vitro. *Theriogenology*. 41 (4): 981-988.
- Széli, A. Z. & Windsor, D. P. 1994. Survival of vitrified sheep embryos in vitro and in vivo. *Theriogenology*. 42 (5): 881-889.
- Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N. & Okano, A. 1993. Effect of cysteamine on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Theriogenology*. 39: 326-326.
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G. & Sasamoto, S. 1995. Superovulation of holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*. 43 (7): 1259-1268.
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J. & Sugino, N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*. 44 (3): 280-287.
- Tervit, H. R. & Rowson, L. E. A. 1974. Birth of lambs after culture of sheep ova in vitro for up to 6 days. *J Reprod Fertil*. 38 (1): 177-179.
- Tervit, H. R., Smith, J. F., MCGowan, L. T., Wells, R. W. & Parr, J. 1992. Laparoscopic recovery oocytes from sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 24: 26 (abstract).
- Tervit, H. R., Whittingham, D. G. & Rowson, L. E. A. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*. 30 (3): 493-497.
- Thibault, C. 1972. Final stages of mammalian oocyte maturation in oogenesis. In: J.D. Biggers and A.W., S. (ed.) p 397-411. University Park Press, Baltimore, London.
- Thibault, C., Szollosi, D. & Gerard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 865-896.

- Thompson, J. G. E., Simpson, A. C., James, R. W. & Tervit, H. R. 1990. The application of progesterone-containing CIRD(TM) devices to superovulated ewes. *Theriogenology*. 33 (6): 1297-1304.
- Tibary, A., Anouassi, A. & Khatir, H. 2005. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*. 64 (3): 618-638.
- Torrès, S., Cognié, Y. & Colas, G. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*. 27 (2): 407-419.
- Torrès, S. & Sevellec, C. 1987. Repeated superovulation and surgical recovery of of embryos in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*. 27 (4): 859-863.
- Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 28: 125-137.
- Ungerfeld, R. & Rubianes, E. 1999. Effectiveness of short-term progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim. Sci.* 68: 349-353.
- Vazquez, M. I., Sartore, I., Abecia, J. A., Forcada, F., Sosa, C., Palacin, I., Casao, A. & Meikle, A. 2008. Melatonin treatment and undernutrition affect expression of uterine estrogen and progesterone receptors in ewes during the reproductive and the anestrus seasons. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 152-152.
- Veiga-Lopez, A., Cocero, M. J., Dominguez, V., McNeilly, A. S. & Gonzalez-Bulnes, A. 2006. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. *Reprod Biol*. 6 (3): 243-64.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G. & Rubianes, E. 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*. 55: 993-1004.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M. & Rubianes, E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*. 51: 1351-1361.
- Visconti, P. E. & Kopf, G. S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. & Diekman, A. B. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of reproductive immunology*. 53 (1): 133-150.
- Walker, S., Hill, J., Kleemann, D. & Nancarrow, C. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod*. 55 (3): 703-708.

- Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R., Evans, R. C. & Bunch, T. D. 1998. A protocol for in vitro maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*. 29 (1): 83-88.
- Wani, N. A. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*. 44: 89-95.
- Wani, N. A., Wani, G. M., Khan, M. Z. & Salahudin, S. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*. 36 (1): 63-67.
- Wani, N. A., Wani, G. M., Khan, M. Z. & Sidiqi, M. A. 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small Ruminant Research*. 34: 71-76.
- Watanabe, H., Kimura, H., Ishida, N., Okada, M., Miyamoto, A. & Fukui, Y. 1998. A Simple Superovulation Method of A Single Injection of Follicle-Stimulating Hormone Combined with Equine Chorionic Gonadotropin for Superovulation of Suffolk Ewes During the Breeding Season: II. The Ovarian Responses and the Embryo Qualities. *J. Reprod. Dev.* 44: 177-183.
- Wildeus, S. 2000. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim Sci.* 77 (E-Suppl): 1-14.
- Wintenberger-Torres, S. & Sevellec, C. 1987. Atlas of the early development of the sheep embryo. INRA, Paris.
- Wright, R. W., Jr., Bondioli, K., Grammer, J., Kuzan, F. & Menino, A., Jr. 1981. FSH or FSH Plus LH Superovulation in Ewes following Estrus Synchronization with Medoxyprogesterone Acetate Pessaries. *J. Anim Sci.* 52 (1): 115-118.
- Yamada, A., Kawana, M., Tamura, Y., Miyamoto, A. & Y., F. 1996. 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.* 42: 81-87.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil E. & Neilly, J. D. (eds.) *The physiology of reproduction*, p 135-185.
- Yang, Y. B. & Lu, K. H. 1990. The influence of bovine oocyte type on in vitro-fertilization and subsequent development in vitro. *Theriogenology*. 33 (1): 355-355.
- Yoshida, M., Ishigaki, K. & Pursel, V. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 68-71.
- Younis, A. I., Keefer, C. L. & Brackett, B. G. 1989. Fertilization of bovine oocytes by sperm injection. *Theriogenology*. 31 (1): 276-276.

- Zhang, X., Rutledge, J. & Armstrong, D. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 292-296.
- Zhu, S. E., Zeng, S. M., Yu, W. L., Li, S. J., Zhang, Z. C. & Chen, Y. F. 2001. Vitrification of *in vivo* and *in vitro* produced ovine blastocysts. *Animal Biotechnology*. 12 (2): 193-203.