

Transferencia de embriones en ovejas receptoras tratadas con hormona de crecimiento, efectos sobre la viabilidad de los embriones

Julio P. Ramón Ugalde*
José Folch Pera**
María Jesús Cocero***
Alberto Fernández-Arias**
José Luis Alabart**
Juana María Garbayo**

Abstract

In order to study the survival of embryos transferred to recipient ewes synchronized with FGA and PMSG, and treated with GHp (Growth Hormone porcine), two experiments were done. In experiment 1, 69 Rasa Aragonesa ewes were used (12 donors and 57 recipients). An embryo, morphologically classified as viable, was transferred to each recipient, which was either treated with GHp (R1) or untreated (R2, control group). No effect was observed on the estrous average time. However, the Ovulation Rate (OR) was higher ($P < 0.01$) in R1. On the other hand, R1 ewes showed higher levels of progesterone (P_4), although this increment was not associated with the increase of Ovulation Rate (OR) but with the exogenous application of GHp. Nevertheless, a high correlation ($P < 0.01$) between the concentration of P_4 4 days and 17 days after fertilization, was found. No differences in fertility were observed between treatments. In experiment 2, 40 one-year old Rasa Aragonesa ewes (14 donors and 18 recipients) were used. Ninety-five 2-day old embryos were obtained. Sixty-eight morphologically classified as viable embryos were distributed in groups (8-10 embryos per group) and transferred to 4 recipients treated with GHp (R1) and to 4 untreated recipients (R2). These same embryos were recovered 3 days later from uterus, and their morphologic viability was evaluated. An increase ($P < 0.05$) in the OR of R1 was observed. No differences in the levels of P_4 were detected on the 7th day following treatment with GHp, although the number of data was insufficient to establish differences. Embryo recovery was higher in R1. A slight tendency ($P < 0.2$) towards a higher quality of embryos from R1 ewes was detected. Data presented in this study lead to the following conclusions: a) in recipient ewes treated with FGA and PMSG, the application of GH produces an increase of P_4 plasma concentration 4 days after sponge withdrawal and an increase in OR and b) fertility of transferred embryos is not altered by treating the recipient ewes with GH.

Key words: SHEEP, EWES, EMBRYO TRANSFER, GROWTH HORMONE.

Recibido el 5 de marzo de 1997 y aceptado el 17 de septiembre de 1997.

* Centro de Investigación y Graduados Agropecuarios, I.T.A. Núm. 2 Conkal, Yucatán, Apartado Postal 53-D, Itzimmá, 97100, Mérida, Yucatán, México.

** Unidad de Tecnología en Producción Animal, Servicio de Investigación Agraria-Diputación General de Aragón. Apartado 727, 50080, Zaragoza, España.

***Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Apartado Postal 8111, Madrid, España.

extracción se realizó 12 h antes que en las donadoras. Al momento de retirar las esponjas y 12 h más tarde, 29 receptoras (R1) recibieron una dosis IM de 0.3 mg/oveja de GHP* pura equivalente a 0.3 mg de pGH NIH B1 en bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) al 0.04% con un PH de 9.5** y diluida en suero fisiológico para su aplicación. El resto (n = 28) recibió una dosis IM de suero fisiológico (R2).

El celo de las ovejas fue detectado a intervalos de 6 h 18 h después de retirar las esponjas, utilizando machos enteros con donadoras, y hembras androgenizadas⁷ con receptoras, provistos de un arnés marcador.

Entre donantes y receptor, el nivel máximo de asincronía permitido a la hora de aparición del inicio del celo fue de 12 h.

Las ovejas donadoras fueron fecundadas mediante una monta dirigida a las 48 h después de la retirada de las esponjas y una inseminación intrauterina (100×10^6 espermatozoides/cuerno) con semen refrigerado⁸ a las 56 h después de retirar las esponjas.

Se tomó una muestra de sangre (5 ml) de todas las ovejas 4 días después de la extracción de las esponjas, con el fin de medir los niveles de progesterona (P_4) plasmática. El objetivo era valorar el grado de sincronía entre donadoras y receptoras, y medir las posibles diferencias en la concentración debidas al tratamiento. También se tomó una muestra el día 17 para el diagnóstico de gestación y para comparar la concentración media de P_4 entre tratamientos.

El análisis de la P_4 plasmática por radioinmunoanálisis (RIA) se realizó por el método directo,⁹ con un equipo comercial.*** La sensibilidad del análisis fue de 0.05 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interanálisis para una referencia de 1.37 ng/ml fueron de 15.3% y 18.6%, respectivamente.

Los embriones fueron recuperados quirúrgicamente del oviducto (3.5 días después de retirar las esponjas), mediante la perfusión del oviducto con 10 ml de amortiguador salino de fosfato (PBS). El PBS fue enriquecido con un 2% de suero fetal bovino (BSA). Los cuernos en posición ipsilateral al ovario que presentó un solo cuerpo lúteo (CL), no fueron lavados. Se empleó la técnica quirúrgica descrita por Ramón *et al.*,¹⁰ excepto una modificación en el método anestésico y la sutura de la incisión quirúrgica. Los animales intervenidos fueron previamente sedados por vía epidural con xilacina⁺ (0.4-0.5 ml) diluida en 20 ml de suero fisiológico, siguiendo la técnica descrita por Cruz *et al.*¹¹ El acceso quirúrgico fue cerrado mediante una sutura en forma de 8,¹² que

une a un mismo tiempo peritoneo, estructura muscular y piel, para lo cual se utilizó monofilamento quirúrgico⁺⁺ del Número 0.

La viabilidad de los embriones se basó en criterios morfológicos según Winterberger-Torres y Sevellec.¹³ Los embriones fueron considerados viables cuando su estado de desarrollo esperado era adecuado, desechando los no fertilizados y los que presentaban algunas anomalías morfológicas.

Se transfirieron 57 embriones morfológicamente viables (1 embrión/oveja) al oviducto ipsilateral al ovario, que presentó ovulación en ambos grupos de receptoras (R1 y R2). La transferencia se realizó mediante un catéter especial.⁺⁺⁺

La anestesia de las receptoras se realizó mediante una mezcla de 10 ml de ketamina 100[†] y 1.25 ml de xilacina, aplicando 1.1 ml de la mezcla por 50 kg de peso vivo.

El intervalo mínimo entre la recuperación-calificación del embrión de las donadoras y la transferencia a las receptoras fue de 2 h. Dos ovejas donadoras no se lavaron debido a que el número de embriones obtenidos fue suficiente para cubrir al total de las receptoras, sólo se determinó en ellas la tasa de ovulación (TO) por endoscopia.

El diagnóstico de gestación se realizó a los 19 días después de la monta, determinando la concentración de P_4 plasmática por RIA. Posteriormente, a los 40 días posmonta, mediante un ecógrafo[†] provisto de una sonda de uso externo de 5,0 MHz de frecuencia, se realizó un diagnóstico de gestación según Blasco y Folch.¹⁴

Experimento 2

Para el experimento 2 se distribuyeron en dos grupos 32 ovejas de un año de edad (14 donadoras y 18 receptoras) con un peso vivo medio de 43.1 ± 0.80 kg, equilibrados por peso vivo. Con estos grupos se trabajó durante la primavera.

La sincronización de los celos y el tratamiento superovulatorio de las ovejas donadoras se realizó de manera similar al experimento 1.

Las ovejas receptoras se sincronizaron con una esponja vaginal impregnada de FGA durante 14 días y la aplicación de 450 UI de PMSG a la retirada de la misma. Al momento de retirar las esponjas y 12 h más tarde, 9 ovejas (R1) receptoras recibieron una dosis de 0.3 mg/oveja/IM de GHP disuelta y diluida mediante el mismo procedimiento como en el experimento 1. Las ovejas del grupo testigo (R2) recibieron una dosis IM de suero fisiológico.

El celo de las ovejas fue detectado a intervalos de 6 h-18 h después de retirar las esponjas de las receptoras, utilizando machos enteros y vasectomizados provistos de arnés marcador con donadoras y receptoras, respectivamente. El nivel máximo de asincronía permitido a la hora de presentación del celo fue de 12 h.

Las donadoras fueron fecundadas con el mismo procedimiento utilizado en el experimento 1.

El análisis de la concentración de la P_4 plasmática se realizó de forma similar a la del experimento 1.

* Cronogest, Intervet.

** J.F. Beckers, comunicación personal.

*** 1251-Progesterone Coatria, bioMérieux.

+ Rompun, Bayer.

++ Supramid, B. Braun Melsungen Ag.

+++ "Tom cat" Catheter, hri 8890-703013, Medical, St. Louis, Mo. 63103 USA.

† Ketolar, Parke-Davies

‡ Toshiba Sonolayer, mod. Sal-32B.

Con el fin de estudiar los efectos de la GHP sobre los niveles plasmáticos de P_4 en las ovejas receptoras, se tomaron muestras diarias de sangre (5 ml), desde el día de la extracción de las esponjas vaginales hasta el día en que se recogen y valoran los embriones transferidos (7.5 días del retiro de las esponjas). Las 2 primeras muestras de sangre fueron tomadas con un intervalo de 1 h, o sea antes y después de la aplicación de GHP en las R1.

Este experimento consta de dos periodos:

Periodo 1

El acceso quirúrgico, la perfusión del oviducto y la calificación por criterios morfológicos de los embriones de 1.5 días de edad (3.5 días después de retirar las esponjas) de las ovejas donadoras se realizaron de forma similar a la descrita en el experimento 1.

Concluida la calificación morfológica de los embriones, se seleccionaron como receptoras 4 ovejas de cada grupo (R1 y R2), tomando como criterio el momento de presentación de celo, buscando el máximo nivel de sincronía respecto a las donadoras, y procurando que las diferencias entre ellas fueran mínimas.

Antes de realizar la transferencia de los embriones, se hizo una endoscopia para medir la tasa de ovulación. Se transfirieron 68 embriones viables (8-10/oveja) al oviducto, siguiendo el mismo procedimiento que el experimento 1, y asegurando que ambos grupos R1 y R2 recibieran el mismo número de embriones provenientes de las mismas donadoras.

Periodo 2

La recuperación de los embriones de 5.5 días de edad (7.5 días después de retirar las esponjas) transferidos a las ovejas R1 y R2 se realizó a los cuatro días después de

la transferencia. La perfusión de los cuernos uterinos se hizo con 40 ml de PBS y 2% de BSA, utilizando la técnica descrita por Ramón *et al.*¹⁰

Una vez obtenidos los embriones, se hizo la valoración morfológica.

Análisis estadístico

Se comparan las variables dicotómicas (tales como la fertilidad, tasa de viabilidad de los embriones, etc.) utilizando el método de Ji-cuadrada (con y sin la corrección de Yates) o mediante el test de Fisher exacto, cuando fue necesario. Otros parámetros que comprenden más de dos categorías (tales como la tasa de ovulación, calidad morfológica de los embriones, etc.), fueron contrastados mediante la prueba de Brown¹⁵ (estadístico X_R^2). Dicha prueba se basa en teoría básica del muestreo multinomial y la distribución asintótica del Ji-cuadrado. Esta prueba se realizó mediante un programa escrito en QBASIC siguiendo las instrucciones del autor. Variables tipo continuo (h salida en celo) se analizaron mediante la técnica "t" de Student.

Las diferencias en la concentración de P_4 plasmática entre grupos en los días 4 y 19 posmonta se analizó mediante ANOVA de una vía 16. Con fines estadísticos, se aplicó un valor a la calificación morfológica que se realizó en los embriones según Garbayo *et al.*,¹⁷ quedando de la siguiente forma:

DG = 0 (degenerados)

R - = 1 (ZP abierta)

R = 2 (grado 3)

R+ = 3 (grado 2-3)

B - = 4 (grado 2)

B = 5 (grado 1)

Cuadro 1
RESULTADOS OBTENIDOS EN OVEJAS
SUPEROVULADAS CON FSHP-LH

Número*	FGA/cel $\bar{x} \pm ES$	CL (TO)	CLC (TOC)**	ER (TR)	EV (TV)	EV/OT
12	25 ± 1.0	140 (11.7)	104 (10.4)	88 (84.6)	68 (77.2)	6.8

* Sólo se lavaron 10 ovejas.

** Sólo se consideraron los cl de los cuernos lavados.

FGA/Cel: Intervalo entre la retirada de la esponja y la aparición del celo.

CL (TO): Cuerpos lúteos (tasa de ovulación); CLC(TOC): Cuerpos lúteos considerados (tasa de ovulación considerada); ER(TR): Embriones recuperados (tasa de recuperación); EV(TV): Embriones viables (tasa de viabilidad); EV/OT: Embriones viables/oveja tratada.

Cuadro 2

RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES OBTENIDOS 3.5 DÍAS DESPUÉS DE RETIRAR LAS ESPONJAS Y TRANSFERIDOS AL OVIDUCTO DE RECEPTORAS TRATADAS CON GH (R1) VS TESTIGO (R2) (1 EMBRIÓN/RECEPTORA)

	Número	FGA/Cel $\bar{x} \pm ES$	Diagnóstico de gestación			CN
			CL (TO)	RIA (%)	ECO (%)	
R1	29	28.3 ± 1.63	64 (2.20) ^a	62.0	55.1	16
R2	28	28.6 ± 1.82	38 (1.35) ^b	53.5	46.4	13

Número = Número de ovejas receptoras.

^{a,b} = P < 0.01.

FGA/Cel= Intervalo entre el retiro de las esponjas y la aparición de los celos.

CL (TO)= Cuerpos lúteos (tasa de ovulación).

RIA= Radioinmunoanálisis.

ECO= Ecografía.

CN= Corderos nacidos.

Resultados

La hora promedio de presentación de celo fue de 25 ± 1.0 h después de retirar la esponja. Los resultados de la tasa de ovulación (TO), la tasa de ovulación considerada (TOC), la tasa de recuperación (TR), la tasa de viabilidad (TV) y los embriones viables por oveja tratada (EV/OT) se presentan en el Cuadro 1.

Según resultados obtenidos en la transferencia de embriones a ovejas tratadas con GHp (R1) y no tratadas (R2), no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, en la hora promedio de presentación de celo (28.4 ± 1.21 h). La tasa de ovulación fue significativamente mayor en el grupo R1 que en el R2 (2.2 vs 1.35; P < 0.01). La fertilidad media a los 17 (57.8%) y 45 (50.7%) días posmonta y al parto (50.7%) resultó similar en ambos tratamientos (Cuadro 2).

En el lote R2 no se observaron ovejas con más de 2 ovulaciones, mientras que en R1, 27.6% de las ovejas (8/29) tuvieron 3 o 4 ovulaciones, resultado que fue significativamente mayor (P < 0.01) en favor del grupo R1. Sin embargo, la fertilidad según el tipo de ovulación, resultó similar en todas las situaciones (Cuadro 3).

Todas las ovejas donantes presentaron celo entre las 18 y 27 h (valor medio: 25.1 ± 0.93) posteriores a la extracción de las esponjas.

Todas las ovejas receptoras presentaron celo entre las 30 y 39 h (R1: 37.3 ± 1.01; R2: 36.0 ± 1.89) posteriores al retiro de las esponjas.

En cuanto a la recuperación y transferencia de embriones, el Cuadro 4 muestra los resultados obtenidos en las ovejas donadoras de embriones de 1.5 días. Debido a que una oveja no respondió al tratamiento de inducción a la superovulación (CL= 3) y otra resultó enferma, sólo se lavaron 12 ovejas.

Sólo se transfirieron 68 embriones considerados como viables, desechando 10 embriones que presentaron

algunas anomalías (1 embrión con células muy difusas, 1 no fertilizado, 1 degenerado, 2 retrasados, 3 con células muy grandes e irregulares y 2 zonas pelúcidas rotas).

El Cuadro 5 indica los resultados de recuperación y viabilidad de los embriones que fueron transferidos al nivel de oviducto (8-10/oveja) y posteriormente recogidos del cuerno uterino.

El Cuadro 6 muestra la calificación morfológica otorgada a los embriones recuperados del cuerno uterino. También se recoge el valor final obtenido, así como su significación estadística.

No se encontraron diferencias entre tratamientos en la calidad de los embriones recuperados, aunque hubo una tendencia en favor del grupo R1 (P < 0.2).

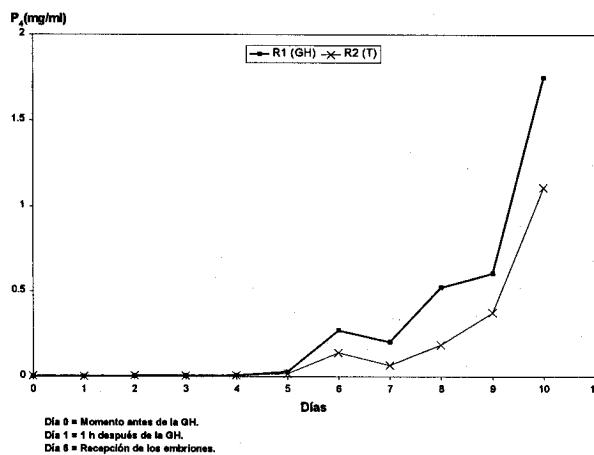


Figura 1. Perfil de la concentración de P₄ plasmática de ovejas receptoras de embriones, tratadas con GH (R1) y sin tratar (R2).

Cuadro 3
RESULTADOS DE LA TASA DE OVULACIÓN (TO)
Y LA FERTILIDAD (F) DE OVEJAS RECEPTORAS TRATADAS CON
GH (R1) VS TESTIGO (R2) SEGÚN EL TIPO
DE OVULACIÓN: SIMPLE (S) Y MÚLTIPLE (M)

Lote	Número	Número de ovulaciones							
		S		M		3		4	
		Número	F	Número	F	Número	F	Número	F
R1	4	50.0	17	53.0	6	83.3	2	-	-
R2	18	55.5	10	50.0	-	-	-	-	-

TO= S vs M: P < 0.01.

Los niveles de P_4 en el día 4 fueron mayores en el grupo R1 que en el R2 (0.5 ± 0.07 vs 0.29 ± 0.05 ; $P < 0.05$). Esto no fue debido a la mayor tasa de ovulación del grupo R2, sino a que las ovejas del grupo R2 que presentaron 2 cuerpos lúteos tuvieron una concentración de P_4 superior a las del grupo R1 que tuvieron el mismo número de ovulaciones (0.52 ± 0.09 vs 0.2 ± 0.03 ; $P < 0.01$). Esto no se repitió en el día 19 entre las ovejas que quedaron gestantes, por lo que no se observaron diferencias significativas en los niveles de P_4 entre ambos grupos en este día (1.9 ± 0.3 vs 2.2 ± 0.5) para los grupos R1 y R2, respectivamente.

La Figura 1 muestra el perfil de P_4 observado en los tratamientos R1 y R2. En la misma se puede apreciar un aumento en la concentración de P_4 del tratamiento R1 5 días después de la aplicación de GH. Sin embargo, esta diferencia no resultó significativa entre tratamientos. No hubo correlación entre la concentración de P_4 y la TO.

Discusión

En ambos experimentos la TO del tratamiento R1 (GH) fue superior al testigo (R2). Este resultado parece indicar que la acción de una dosis baja de gonadotropina de vida media larga, como es la PMSG, se vio favorecida por la aplicación de GHp, incrementando al doble la TO normal. Otros autores indican que cuando la GH se aplica sin la asociación de gonadotropinas exógenas, la TO no se ve alterada.¹⁸ Algo similar ocurre cuando se aplica asociada a una dosis de gonadotropina alta en tratamientos de superovulación, ya sea con PMSG¹⁹ o con FSHp.²⁰

Al ser mayor la TO cabría esperar un incremento en los niveles de P_4 plasmática en los lotes tratados con GH. Sin embargo, aunque en el experimento 2 se observó un perfil de P_4 distinto y ligeramente más alto en las

Cuadro 4
RESPUESTA A UN TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON
FSH-P EN OVEJAS DE LA RAZA RASA ARAGONESA CL(TO):
CUERPOS LÚTEOS (TASA DE OVULACIÓN); CLC(TOC):
CUERPOS LÚTEOS CONSIDERADOS (TASA DE OVULACIÓN
CONSIDERADA)*; ER(TR): EMBRIONES RECUPERADOS (TASA
DE RECUPERACIÓN); EV(TV): EMBRIONES VIABLES
(TASA DE VIABILIDAD); ET: EMBRIONES TRANSFERIDOS;
EV/OT: EMBRIONES VIABLES/OVEJA TRATADA

Número	CL(TO)	CLC(TOC)*	ER(TR)	EV(TV)	ET	EV/OT
14**	95 (7.9)	87 (7.9)	78 (89.6)	68 (87.1)	68	5.6

Número: Número de ovejas donadoras.

* Sólo se consideran los CL de los cuernos lavados.

** Sólo se consideran 12 ovejas donadoras para la CLC (TOC).

tratadas con GH (R1), se apreció una correlación negativa y no significativa entre la TO y P_4 , a los 4 días de la extracción de las esponjas en ambos experimentos. Esta contradicción aparente se debe a que en ambos lotes (R1 y R2) la P_4 disminuye cuando aumenta la TO (excepto en el grupo GH en las de TO = 4 tienen algo más de P_4 que las de TO = 3), lo que justifica la correlación negativa entre P_4 y TO. El hecho de que haya más P_4 en el lote tratado con GH se debe fundamentalmente a que las de TO = 2 y TO = 1 tienen más P_4 que las mismas del lote testigo, encontrando sólo diferencias significativas entre las de TO = 2. Este resultado no coincide con los obtenidos por otros autores, quienes observaron una correlación positiva entre la TO y la concentración de P_4 en vacas superovuladas²¹ y tratadas con somatotropina recombinante bovina (rBST).²² El resultado del presente

Cuadro 5
RESULTADOS TOTALES DE LA RECUPERACIÓN
Y VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES TRANSFERIDOS
A OVEJAS TRATADAS CON GH (R1) VS OVEJAS TESTIGO (R2)

Rec.	Número	TO	ET	ER(%) en útero	EV (%)	EV/ET (%)
R1	4	2.50 ^a	34	22 (64.7) ^c	18 (82.0)	52.9
R2	4	1.25 ^b	34	8 (30.7) ^{d*}	8 (62.5)*	30.7*

Nº= Número de ovejas; ^{a,b}= P < 0.05; ^{c,d}= P < 0.01.

* Una receptora de 8 embriones ha sido eliminada en los cálculos de ER, EV y EV/ET debido a que hubo problemas en el lavado.

TO = tasa de ovulación; ET = embriones transferidos; ER = embriones recuperados; EV = embriones viables.

Cuadro 6
RESULTADOS DE LA CALIFICACIÓN MORFOLÓGICA OTORGADA A LOS EMBRIONES RECUPERADOS DEL CUERNO UTERINO DESPUÉS DE SER TRANSFERIDOS A NIVEL DEL OVIDUCTO DE OVEJAS DE LA RAZA RASA ARAGONESA TRATADAS CON GHP (R1) Y NO TRATADAS (R2)

<i>Calif</i>	<i>R1</i>	<i>Calif</i>	<i>R2</i>
(4)	1 MC grado 2		
(3)	1 MC grado 2-3		
(2)	1 MC grado 3		
(0,0)	2 M degeneradas	(0)	1 M degenerada
(0)	1 M degenerada (10 cel)		
(4)	1 BJ grado 2		1 BJ grado 2
(3,3,3)	3 BJ grado 2-3	(4)	
(5)	1 B grado 1		
(3)	1 B grado 2-3 (cel. grandes)		1 B grado 2
(5)	1 B grado 1 con doble botón embrionario	(4)	1 B Grado 1
	1 Hatching**	(5,5)	2 Hatching**
(5)	3 Hatching** grado 1	(0)	1 Hatching**
(5,5,5)	1 Hatching** colapsado dentro de ZP		degenerado
(5)	3 Hatched*** grado 1		
	1 ZP ovalada abierta vacía		
(5,5,5)			
(1)			1 ZP abierta
		(1)	
(76)	3.45 ± 0.38*	(24)	3.0 ± 0.80*

Nivel de significación: $P < 0.2$.

* (Total) valor medio ± error estándar.

ZP: Zona pelúcida; M: Mórula; MC: Mórula compactada; BJ: Blastocisto joven; B: Blastocisto.

** Hatching: Blastocisto saliendo de ZP.

*** Hatched: Blastocisto fuera de ZP.

estudio podría tener varias causas: 1) Puede ser que la TO no fue lo suficientemente alta (como en el caso de las vacas superovuladas), para poner en evidencia esta relación; 2) podría deberse a que una acción directa de la GH incrementa la capacidad esteriodogénica de las células luteales;²³ 3) a que la GH facilitó la movilización de precursores de la P_4 al nivel de glándulas suprarrenales o un menor catabolismo hepático de la P_4 ;²⁴ 4) a que algunos de los CL observados en la endoscopia, quizás no fueran funcionales o presentarían estructuras diferentes.

La supervivencia de los embriones en las ovejas tratadas con GH podría estar favorecida porque el nivel de P_4 durante los primeros días del ciclo es más alto.²⁵ Sin embargo, la supervivencia de los embriones a los 19 y 45 días de la extracción de las esponjas fue similar en ambos tratamientos. Tampoco se detectaron diferencias

en la concentración de P_4 a los 19 días de las ovejas gestantes. Es posible que esto se deba a que existen variaciones individuales importantes en la concentración de P_4 requerida para mantener la gestación.²⁶ Podría ser que los segundos cuerpos lúteos logrados (R1: TO = 2) por la aplicación de GH, resultasen o de mala calidad o de vida media corta.^{2,27,28} También puede ser que después de 19 días, los mecanismos de retroalimentación entre LH y P_4 han regulado la función lútea, de tal manera que un solo CL produce la misma cantidad de P_4 que 2 o 3 CLs.

En el experimento 2, la TR de las ovejas tratadas con GH fue más alta. Este resultado muestra la misma tendencia que el obtenido en ovejas tratadas con GHP donadoras de embriones.²⁰ Es posible que este resultado esté relacionado con la variación de la P_4 debida a la acción de la GH. Así, una de las ovejas del tratamiento

testigo, la tasa de pérdidas fue total, registrándose en esta oveja el menor nivel de P_4 de todas las receptoras de ambos tratamientos. Por el contrario, es relevante que las ovejas tratadas con GH mostraron un nivel medio de P_4 más alto (de aproximadamente un 40% más) que el nivel medio de las testigo. A este respecto, Ashworth *et al.*²⁹ indican que aquellas ovejas que durante los primeros días del embrión muestran un perfil de P_4 inferior a 0.1 ng/ml, presentan una tasa de pérdidas muy alta, incluso los embriones son eliminados en pocas horas. Por otra parte, es conocida la existencia de un factor de inhibición de la división embrionaria a nivel del oviducto³⁰ durante los primeros días de edad del embrión, por ello la P_4 es necesaria para eliminar este factor,³¹ además de favorecer la secreción de factores de crecimiento³² necesarios para su desarrollo.

En resumen, es posible que la GH por el efecto de la P_4 , haya favorecido el transporte adecuado de los embriones durante su paso del oviducto hacia el útero.

La TV de los embriones de las ovejas tratadas con GH fue superior a la de las no tratadas. Esta tendencia es la misma que la observada en ovejas donadoras tratadas con GHp20 donde el efecto benéfico de la GH pudo deberse a factores de crecimiento insulínicos ligados a la proteína (IGF-BP), los cuales realizaron un efecto modulador sobre los efectos detrimentales derivados de las altas concentraciones de E_2 . En el presente experimento los efectos de la GH sobre la calidad embrionaria no parecen deberse a una modulación de los estrógenos, porque los animales no fueron superovulados. Es posible que el efecto benéfico de la GH se haya producido directamente sobre el medio ambiente del oviducto.

Los embriones de 1.5 días transferidos al oviducto de receptoras con o sin GH, seguramente ya habían adquirido de sus madres las glicoproteínas provenientes de la región ampular,³³ que parecen estimular la capacidad del ovocito para ser fecundado y desarrollarse a estadios más avanzados. La importancia del microambiente del oviducto sobre el desarrollo embrionario ha sido demostrada mediante estudios regionales acerca del oviducto. Es conocido que los embriones retenidos a nivel del istmo mediante el ligamento de la unión útero-tubárica no se desarrollan hasta estado de blastocisto,³⁴ mientras que aquellos que son aislados en la región ampular, progresan hasta estado de blastocisto temprano.³⁵ Este hecho confirma que la tendencia a una mejor calidad de los embriones, como se observó en las ovejas tratadas con GH, que podría deberse a modificaciones ocurridas en el microambiente del oviducto, dado que los embriones transferidos poseían la misma calidad inicial. Este efecto ha sido demostrado *in vitro* e *in vivo* por Cognié *et al.*³⁶ Desgraciadamente, el número de embriones recuperados en el lote testigo fue insuficiente, lo que impidió lograr conclusiones definitivas.

Los resultados obtenidos en ambos experimentos indican que la aplicación de GH aumenta la TO de ovejas receptoras de embriones, aunque este efecto no se traduce en un incremento de la fertilidad. Por otra parte, no es

posible obtener conclusiones definitivas en el experimento 2, debido al escaso número de datos, aunque se pueden hacer algunas observaciones: Se ha obtenido un aumento de la TO debido al tratamiento con GH, que no está relacionado con la concentración de P_4 ; la recuperación de los embriones es mayor en las ovejas tratadas con GH; la calidad de los embriones durante su paso por el oviducto se mejora con un tratamiento con GH.

Referencias

1. Anderson SH, Killian GJ. Detection of a 48kDa, methionine-enriched oviductal protein in conditioned media from bovine isthmus explants but not ampullar explants. *J Anim Sci* 1992;70:256.
2. Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 1988;82:843-856.
3. Roberts RM, Bazer FW. The functions of uterine secretions. *J Reprod Fertil* 1988;82:875-892.
4. Murray RA, Bazer FW, Rundell JW, Vincent CK, Wallace HD, Warnik AC. Developmental failure of swine embryos restricted to the oviductal environment. *J Reprod Fertil* 1971;24:445-448.
5. Niemann H, Freitag M, Elsaesser F. The role of oestrogens in early embryonic development. *J Reprod Fertil* 1989;38:73-83.
6. Carson DD, Jacobs AL, Julian J, Rohde LH. Glycoconjugates as positive and negative modulators of embryo implantation. *Reprod Fertil Dev* 1992;4:271-274.
7. Quintal JF, Heredia MA, Rodríguez OLR. Utilización de testosterona para inducir comportamiento viril en borregos Pelibuey. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México; 1984 octubre-noviembre 29-31 y 1; México (DF). México (DF): SARH-UNAM, 1984:325.
8. Colas G, Thimonier J, Courot M, Ortavant R. Fertilité, prolificité et fécondité pendant la saison sexuelle des brebis inséminées artificiellement à l'acetate de fluorogestone. *Ann Zootech* 1973;22:441-451.
9. Garbayo A. Relación entre concentración de progesterona plasmática y supervivencia embrionaria en la oveja (tesis de maestría). Zaragoza, España: Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza. Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos, 1990.
10. Ramón JP, Folch J, Fernández-Arias A, Alabart JL, Cocero MJ, Echegoyen E. La técnica de la transferencia de embriones en el ganado ovino. *Inf Téc Econ Agrar* 1991;11:61-63.
11. Cruz JI, Marijuan S, Falceto MV. Protocolo de anestesia epidural en ovejas para transferencia embrionaria. *Inf Téc Econ Agrar* 1993;12:394-395.
12. Alexander A. Técnica quirúrgica en animales y temas de terapéutica quirúrgica. Suturas. 6ª ed. México (DF): Nueva Editorial Interamericana, 1986.
13. Winterberger-Torres S, Sevellec C. Atlas du développement embryonnaire precoce chez les ovins. Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique, 1987.
14. Blasco I, Folch J. Diagnóstico precoz de gestación y determinación del número de fetos por ecografía en ganado ovino. *Inf Téc Econ Agrar* 1989;82:22-32.
15. Brown GH. The statistical comparison of reproduction rates for groups of sheep. *Austr J Agric Res* 1988;39:899-905.
16. SAS Institute: SAS/STAT guide for personal computers. Version 6 ed. Cary (NC): SAS Institute Inc., 1985.
17. Garbayo A, Alabart JL, Folch J, Cocero MJ, Ramón JP,

- Fernández-Arias A. Efecto de la inmunización pasiva contra andrógenos en ovejas "Rasa Aragonesa" superovuladas con FSH. *Inf Téc Econ Agrar* 1993;12:418-420.
18. Davis SR, Smith JF, Gluckman PD. Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod Fertil Dev* 1990;2:173-178.
 19. Herrler A, Farries E, Niemann H. Trials to stimulate insulin like growth factor I level to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 1990;33:248.
 20. Folch J, Ramon JP, Cocero MJ, Perez SS, Garrido D, Garde J, *et al.* The exogenous treatment with porcine growth hormone (GHP) improves embryo quality in superovulated ewes. 45th Annual Meeting of the European Association for Animal Production; 1994 September 5-8; Edinburgh, UK. Cambridge, UK: European Association for Animal Production, 1994:260.
 21. Saumande J, Tamboura D, Chupin D. Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationship with number of ovulations and of embryos collected. *Theriogenology* 1985;23:719-731.
 22. Rieger D, Walton JS, Goodwin ML, Johnson WH. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1991;35:863-868.
 23. Adashi EY, Resnik CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. A novel role for somatomedin-C in the cyto differentiation of the ovarian granulosa cell. *Endocrinology* 1984;155:1227-1235.
 24. Kramer RE, Griner JW, Colby HD. Site de action of growth hormone on adrenocortical steroidogenesis in rats. *Endocrinology* 1977;101:297-301.
 25. Wilmut I, Sales DI, Ashworth CJ. Physiological criteria for embryo mortality: is asynchrony between embryo and ewe a significant factor? In: Land RB, Robinson DW, editors. *Genetics of reproduction in sheep*. London (UK): Butterworths, 1985:275-290.
 26. Wilmut I, Sales DI, Ashworth CJ. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology* 1985;23:107-119.
 27. White LM, Keisler DH, Dailey RA, Inskoop EK. Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J Anim Sci* 1987;65:1595-1601.
 28. Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1991;43:91-99.
 29. Ashworth CJ, Sales DI, Wilmut I. Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fertil* 1989;87:23-32.
 30. Hill JL, Marshall JT, Nawcarrow CD. Isolation of the inhibitory factor to sheep embryo development contained in ovine oviduct fluid. Proceedings of the 23rd Annual Conference of the Australian Society Reproduction Biology; 1991 August 29-31; Newcastle, Australia. Newcastle Australian Society Reproduction Biology, 1991:66.
 31. Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DT. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams - a review. *Livest Prod Sci* 1986;113:219-247.
 32. Heap RB, Rider V, Wooding FBP, Flint APF. Molecular and cellular signaling and embryonic survival. In: Sreenan JM, Diskin MG, editors. *Embryonic mortality in farm animals*. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff, 1986:46-73.
 33. Gandolfi F, Modina S, Brevini TAL, Galli C, Moor RM, Lauria A. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the pellucid zone, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem* 1991;35:383-392.
 34. Moor RM, Osborn JC, Crosby IM. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil* 1985;74:167-172.
 35. Pope CE, Day BN. Development of pig embryos following restriction to the ampullar portion of the oviduct. *J Reprod Fertil* 1972;31:135-138.
 36. Cognié Y, Poulin N, Guerin Y, Martinet N. Administration of exogenous growth hormone in early follicular phase enhances embryo production in sheep. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction; 1992 August 23-27; The Hague, The Netherlands: Congress of Animal Reproduction, 1992:785-787.