

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE (rbST) SOBRE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y LA VIABILIDAD EMBRIONARIA EN OVEJAS DE PELO.

Effect of Recombinant Growth Hormone (rbST) Application on Superovulatory Response and Embryo Viability in Hair Ewes.

Luis F. Navarrete-Sierra¹, Alvar A. Cruz-Tamayo², Eugenia I. González-Parra¹, Raúl E. Piña-Aguilar³, José R. Sangines-García¹, Víctor Toledo-López⁴ y Julio P. Ramón-Ugalde^{1*}

¹ Centro de Selección y Reproducción Ovina. Instituto Tecnológico de Conkal Km 16.3 Antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal, México. ² Centro de Selección y Reproducción Caprina y Ovina, San Luis Potosí, México.

³ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. ⁴ Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, México.

*Tel. +52(999)9124131, Fax +52(999)9124135, E-mail: jramon@itaconkal.edu.mx

RESUMEN

Se estudió el efecto del uso de una proteína de alto valor nutricional y su interacción con la hormona de crecimiento recombinante (rbST) sobre la respuesta superovulatoria y la viabilidad embrionaria en ovejas de pelo. Se utilizaron doce ovejas adultas de raza Pelibuey, distribuidas completamente al azar en dos tratamientos. T_A: Control. T_B: 100 mg de Somatotropina Bovina recombinante (rbST). La sincronización del estro en ambos grupos duró 14 días, utilizando esponjas vaginales impregnadas con 40 mg de FGA, con cambio a los 7 días. La superovulación se realizó con FSH ovina (oFSH) a intervalos de 12 h en dosis decrecientes, iniciando 72 h antes de la retirada de las esponjas. En la primera aplicación se les administró adicionalmente 2 mL de prostaglandina PGF_{2α} a las ovejas. La inyección de rbST en el T_B se hizo junto con la octava aplicación de oFSH. Todas las ovejas se inseminaron vía intrauterina a las 56±1 h de la retirada de las esponjas, con semen refrigerado (10⁸ espermatozoides/pajuela). Los embriones se colectaron 5 días después de la inseminación y la viabilidad embrionaria se midió utilizando criterios morfológicos. Se observó un incremento en todas las variables de respuesta evaluadas por efecto de la aplicación de rbST: cuerpos lúteos (89 vs 119), cuerpos lúteos considerados (77 vs 117), embriones recuperados (64 vs 78), embriones viables (35 vs 64) y embriones viables por oveja (5,8 vs 10,6) siendo significativa la tasa de ovu-

lación (86,52% vs 96,64%) y la tasa de viabilidad embrionaria (54,69% vs 82,05%) (P<0,01), esto probablemente se atribuye a que la rbST altera los componentes del sistema de factores de crecimiento insulínico estimulando la esteroidogénesis folicular. La hormona de crecimiento aplicada antes de la ovulación estimula la maduración de mayor cantidad de folículos e incrementa la cantidad recuperada de embriones y la viabilidad embrionaria.

Palabras clave: Hormona de crecimiento recombinante, respuesta superovulatoria, viabilidad embrionaria.

ABSTRACT

The objective of this study was measure the effect of using nutritional high quality protein and its interaction with recombinant growth hormone over the ovulatory response and embryo viability in hair ewes. Twelve adult multiparous Pelibuey ewes were used and randomly submitted to two different treatments. In treatment A (T_A, Control group), the ewes received a superovulation treatment without the application of recombinant growth hormone (rbST) in treatment B (T_B), the ewes received the same superovulation treatment with the addition of 100 mg of recombinant bovine somatotropin (rbST). The induction and synchronization of the estrous cycle was realized by the insertion of vaginal sponges impregnated with 40 mg of FGA during 14 days, with sponge change at the seventh day. To induce the superovulation follicle stimulating ovine hormone (oFSH) was used in decreasing doses levels (every 12 h) starting 72 h

before the sponges withdrawal. In the first application 2 mL of prostaglandin PGF_{2α} were additionally applied. The application of 100 mg of rbST was done during the eighth administration of oFSH. The ewes were inseminated 56 ± 1 h after the sponge withdrawal with refrigerated semen (10⁸ sperm/ straw). The embryos were collected 5 days after the insemination and the embryo viability was measured by morphological evaluation. An increase was observed in all the variables evaluated in the rbST group: corporea lutea (89 vs 119), corporea lutea considered (77 vs 117), embryos recovered (64 vs 78), viable embryos (35 vs 64), and viable embryos by ewe (5.8 vs 10.6), with statistical significance, considered ovulation rate (86.52% vs 96.64%) and embryo viability rate (54.69% vs 82.05%) (P<0.01), this is probably due to the effect of rbST over the growing insuline factors that control the follicular esteroidogenesis. The rbST application before the ovulation influence the maturation of higher amount of follicles and increase the quantity and viability of the embryos obtained.

Key words: Embryo viability, recombinant growth hormone, superovulatory response.

INTRODUCCIÓN

El estatus nutricional de las ovejas (*Ovis aries*) es un factor determinante de la actividad ovárica ya que condiciona una respuesta reproductiva eficiente. Previo a la época de apareamiento, el efecto de la suplementación energética (*flushing*) permite un incremento en la fertilidad y prolificidad general del rebaño [29] aunque, esta práctica de manejo tiene poca efectividad cuando el rebaño mantiene una condición corporal de media a alta [1]. Con este antecedente, resulta interesante y conveniente, aplicar este tipo de manejo a animales de alto valor genético previo a ser utilizados como donantes de embriones, sin embargo, no siempre una suplementación extra en energía o proteína permite respuestas homogéneas a estímulos exógenos de ovulación múltiple [17]. Por otra parte, es conocida la modulación que la hormona de crecimiento ejerce a nivel ovárico en etapas de desarrollo folicular temprano [2,3]. Una clara interrogante sobre qué pasaría si se asociaran efectos aislados de proteína de alto valor nutricional y hormona de crecimiento bajo un esquema de control de ciclo con estímulo superovulatorio. ¿Se produciría una acción sinérgica? o por el contrario ¿Se tendría un efecto antagónico?

El presente trabajo estudió el efecto del uso de proteína de alto valor nutricional y su interacción con la hormona de crecimiento sobre la respuesta superovulatoria y la viabilidad embrionaria en ovejas de pelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán y en el Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO)

del Instituto Tecnológico de Conkal, ubicados en el centro-nordeste del estado de Yucatán, México. La región presenta un clima tropical subhúmedo, con lluvias en verano y una época de sequía de noviembre a abril, siendo la temperatura media anual de 26,6°C [9].

Se utilizaron 12 ovejas de raza Pelibuey adultas multiparas no lactantes, de 3 años de edad, distribuidas al azar en dos tratamientos. En el tratamiento A (T_A, Control), las ovejas recibieron un estímulo superovulatorio con Hormona Folículo Estimulante ovina (oFSH, ovagen®), utilizando 176 unidades NIH-FSH-S1 por oveja, distribuidas en ocho aplicaciones con dosis decrecientes. El grupo del tratamiento B (T_B) recibió además del estímulo con oFSH, 100 mg de Somatotropina bovina recombinante (rbST) por oveja.

Fueron alojadas en corraletas individuales (1,30 x 1,40 m) con libre acceso a agua, el alimento se les ofreció por la mañana y por la tarde a partes iguales. La dieta proporcionada fue a base de heno de estrella (*Cynodon nlemfuensis*) y un suplemento que se formuló utilizando sorgo, aceite vegetal, minerales y como fuente de proteína harina de pescado (TABLA I), esta dieta fue formulada para cubrir los requerimientos de ovejas adultas de 50 kg de peso vivo (PV) y una ganancia de 100 g/d, de acuerdo con los requerimientos del Agricultural and Food Research Council (AFRC) [4], y se ajustó a 10 mega Joules (MJ) de energía metabolizable (EM) por día y 160 g de proteína cruda (PC) por kg de materia seca (MS). El consumo estimado de 1,80 kg de MS por día, lo que correspondió aproximadamente al 3,6% del PV. Las ovejas se sometieron a un periodo de adaptación de 15 días a la dieta y al alojamiento. El peso inicial fue 40,66 ± 3,88 kg y 40,16 ± 3,92 para el T_A y T_B, respectivamente. La condición corporal fue evaluada de acuerdo a la metodología de Russel y col. [25], en donde ambos grupos obtuvieron una calificación de tres, tanto al inicio como al final del experimento.

TABLA I
MATERIA PRIMA Y COMPOSICIÓN DE LA DIETA
UTILIZADA EN LA ALIMENTACIÓN DE OVEJAS
SUPEROVULADAS / INGREDIENT AND NUTRIENT CONTENT
OF DIET USED IN EWES SUPEROVULATED

Ingredientes	(kg / kg MS)
Heno de estrella	0,650
Harina de pescado	0,127
Sorgo	0,190
Aceite	0,015
Minerales	0,015
<i>Composición Proximal</i>	
Proteína cruda (g/kg MS)	162,20
EM (MJ kg ⁻¹ MS)*	10,58
Cenizas (g/kg MS)	98,5

*Estimado teóricamente en base a criterios del AFRC (1993).
MS = Materia Seca.

Para observar el efecto de la hormona de crecimiento sobre la respuesta ovulatoria, las ovejas se distribuyeron al azar en dos tratamientos: en el tratamiento control (T_A) no se aplicó rbST; mientras que en el grupo tratado (T_B) si se aplicó dicha hormona; el estro de las ovejas fue sincronizado mediante la inserción de esponjas vaginales impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA, Chronogest®, Intervet, México) durante 14 días, realizando un cambio de esponja a los 7 días con el objetivo de mantener niveles circulantes elevados de progestágenos [21].

Para inducir la superovulación se le administró a cada oveja FSH ovina (oFSH; Ovagen®, Immuno-Chemical Products Ltd; Nueva Zelanda), a intervalos de 12 h en dosis decrecientes (35,2; 35,2; 26,4; 26,4; 17,6; 17,6; 8,8; 8,8 unidades NIH-FSH-S1), iniciando 72 h antes de la retirada de las esponjas, la cual coincidió con la séptima inyección. En la primera aplicación se les administró adicionalmente 2 mL de prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ (Lutalyse®, Pharmacia & Upjohn, Inc; México). La aplicación de 100 mg de Somatotrópina bovina recombinante (Lactotropina®, Elanco Animal Health, México) se llevó a cabo durante la octava aplicación del tratamiento superovulatorio.

Las ovejas se inseminaron, vía intrauterina, 56 ± 1 h después de retiradas las esponjas, con ayuda de un laparoscopia (Karl Storz® endoscope, Alemania), utilizando semen refrigerado de un macho con fertilidad probada, conteniendo un promedio de 10^8 espermatozoides por pajuela [7].

Los embriones fueron recolectados 5 días después de la inseminación, utilizando el método descrito por Ramón y col. [20]. Previamente se realizó la endoscopia para evaluar la respuesta a la superovulación. La viabilidad embrionaria se midió utilizando criterios morfológicos según la clasificación de Wintenberger-Torres y Sevellec [30]. Los embriones fueron considerados como viables cuando su estado de desarrollo al momento de la colecta era acorde a su edad, sin que presentasen signos de degeneración celular. Las anomalías a detectar fueron: ausencia de simetría, tamaño celular irregular, blastómeros excluidos, incremento de la granulación, células vacuoladas y zona pelúcida dañada.

Para medir la respuesta reproductiva, se determinaron y analizaron las siguientes variables: cuerpos lúteos (CL), cuerpos lúteos considerados (CLC); para evaluar la tasa de recuperación solamente se consideraron los CLs de los cuernos uterinos lavados [20], embriones recuperados (ER), embriones viables (EV) y embriones viables por oveja tratada (EV/OT). Todo cuerno con menos de tres CLs no fue lavado. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Ji^2 utilizando el programa SAS [27].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ovejas sometidas a un estímulo superovulatorio con oFSH se observó un incremento en todas las variables de res-

puesta evaluadas cuando se adicionó rbST (TABLA II), principalmente en tasa de ovulación (86,52% vs 96,64%) y tasa de viabilidad embrionaria (54,69% vs 82,05%) ($P < 0,01$). Esto probablemente se atribuye a que la rbST altera los componentes del sistema de factores de crecimiento insulínico, IGF (principalmente IGF-I) estimulando la esteroidogénesis folicular, lo que aumenta el número y la madurez fisiológica de los folículos de tamaño medio en los ovarios [10]. Asimismo, bajo un mismo tratamiento a base de oFSH y una suplementación con proteína de buena calidad, el incremento en la tasa de ovulación por la acción de la rbST, posiblemente se deba a un estímulo en el desarrollo y maduración del folículo asociado con el aumento en las concentraciones periféricas de IGF-I e insulina [23], favoreciendo al folículo que ha recibido el estímulo de la FSH. Tanto el IGF-I como la insulina, tienen efecto sinérgico para estimular la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa *in vitro* en bovinos [5] y ovinos [15]. Además, la rbST tiene efectos directos en la fisiología reproductiva de bovinos y ovinos, que incluyen: mayor tamaño del cuerpo lúteo, incremento en la secreción de progesterona y una ligera extensión del estro por el alargamiento de la vida media del cuerpo lúteo [23].

Algunos estudios han demostrado que la aplicación de rGH junto con FSH en ovejas superovuladas no tiene ningún efecto sobre la tasa de ovulación, aunque se reconoce una mejoría en la calidad de los folículos [14, 26]. Por el contrario, en este estudio se observó un aumento en la tasa de ovulación, lo que concuerda con Rosas y col. [24] en ovejas superovuladas tratadas con 100 mg de rbST, y con Gong y col. [11] en vacas superovuladas con FSH ovina y 350 mg de rbST, observando 55% y 80% de incremento en la tasa de ovulación, respectivamente. Paralelo al incremento en la tasa de ovulación, aumenta la cantidad de embriones viables, lo que coinci-

TABLA II
RESPUESTA AL ESTÍMULO SUPEROVULATORIO
EN OVEJAS DE PELO CON O SIN LA APLICACIÓN DE
HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE (rbST)/
SUPEROVULATORY RESPONSE IN HAIR EWES WITH OR WITHOUT
APPLICATION OF BOVINE RECOMBINANT GROWTH
HORMONE (rbST)

	Sin rbST	Con rbST
Ovejas por tratamiento	6	6
Cuerpos Lúteos	89	119
Cuerpos Lúteos considerados	77	117
Tasa de ovulación considerada (%)	86,52 ^a	96,64 ^b
Embriones recuperados*	64	78
Embriones viables	35	64
Tasa de viabilidad (%)	54,69 ^a	82,05 ^b
Embriones viables por oveja	5,8	10,6

^{a,b} Valores con distintos superíndices en la misma columna indican diferencias ($P < 0,01$). * De ovejas lavadas que presentaron mas de 3 cuerpos lúteos.

de con Rosas y col. [24], por otra parte Folch y col. [8], obtuvieron mayor cantidad de embriones transferibles (mórulas y blastocistos) en ovejas superovuladas con hormona folículo estimulante porcina (pFSH) y un tratamiento de rbST o Somatotropina porcina (pST). Otros resultados similares han sido reportados en bovinos [6, 12, 18, 23].

La influencia favorable de rbST en la viabilidad embrionaria puede ser debido a diversos factores, entre los que se incluyen: una acción positiva de la rbST al final del proceso de maduración del oocito [16, 19], debido a un efecto indirecto sobre el eje GH/IGF que provoca asimismo un aumento en la concentración de factores de crecimiento dentro del ambiente oviductal [8, 13, 28] o a una modulación en la concentración elevada de estradiol generada por el tratamiento superovulatorio; la cual perjudica el proceso de fertilización [22].

CONCLUSIONES

La hormona de crecimiento aplicada antes de la ovulación estimula la maduración de mayor cantidad de folículos en ovejas sometidas a un tratamiento superovulatorio y suplementadas con proteína de alta calidad.

La cantidad de embriones recuperados y la viabilidad embrionaria mejora cuando se utiliza rbST en ovejas sometidas a superovulación con suplementación proteica, lo que indica que existe una acción sinérgica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABECIA, J.A.; RHIND, S.M.; McMILLEN, S.R. Efecto de la subnutrición sobre la funcionalidad lútea y la distribución de progesterona en tejido endometrial en la especie ovina. **ITEA** 90 A: 63-71. 1990.
- [2] ADASHI, E.Y. Intraovarian regulation: the IGF-1 example. **Reprod. Fertil. Dev.** 4: 497-504. 1992.
- [3] ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; DERCOLE, A.J.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. Insulin like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocr Rev.** 6: 400-420. 1985.
- [4] AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (AFRC). Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Ed. CAB International Wallingford, UK. Chap. 7. 91-98pp.1993.
- [5] BORROMEO, V.; MODINA, S.; LUCIANO, A.M.; GAGGIOLI, D.; SECCHI, C.; GANDOLFI, F. Relationships between bovine oocyte developmental competence, GH concentration in follicular fluid and GH localisation in cumulus-oocyte complexes. Proceedings of the Annual Conference International Embryo Transfer Society. **Theriogenol.** 55(1): 405. 2001.
- [6] CUSHMAN, R.A.; DESOUZA, J.C.; HEDGPETH, V.S.; BRITT, J.H. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. **Theriogenol** 55: 1533-1547. 2001.
- [7] EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Conservación de semen durante corto tiempo. In: **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Ed. Acribia, España. 119-122pp. 1990.
- [8] FOLCH, J.; RAMÓN, J.; COCERO, M.; ALABART, J.; BECKERS, J. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. **Theriogenol** 55(9): 1777-1785. 2001.
- [9] GOBIERNO DEL ESTADO DE YUCATÁN. Los municipios de Yucatán, México 75-78 pp. 1988.
- [10] GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Treatment with recombinant bovine somatotrophin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin-like growth factor-I by ovarian follicles in ewes. **Anim. Reprod. Sci.** 41: 13-26. 1996a.
- [11] GONG, J.G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenol** 45: 611-622. 1996b.
- [12] GONZALEZ-FERNANDEZ, R.; VELARDE, J.C.; PEREA-GANCHOU, F.; SOTO-BELLOSO, E.; PALOMARES-NAVEDA, R.; HERNANDEZ-FONSECA, H. Production of transferable embryos in Brahman cows treated with bovine somatotropin. **Reprod. Fétil. Dev.** 16(1,2): 210. 2004.
- [13] HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. **J Endocrinol.** 168: 1-23. 2001.
- [14] JOYCE, I.M.; KHALID, M.; HARESIGN, W. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulation rate. **Theriogenol** 50(6): 873-884. 1998.
- [15] KHALID, M.; HARESIGN, W.; LUCK, M.R. Secretion of IGF-I by ovine granulosa cells: effects of growth hormone and follicle stimulating hormone. **Anim. Reprod. Sci.** 58(3-4): 261-272. 2000.
- [16] KÖLLE, S.; STOJKOVIC, M.; HUTZLER, P.; SINOWATZ, F. Influence of growth hormone and insulin-like growth factor-I on apoptosis in bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro. **Theriogenol.** 51(1): 380. 1999.
- [17] LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reprod.** 125: 543-553. 2003.

- [18] MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenol.** 55(1): 367. 2001.
- [19] PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJCARON, P.; SLAVIK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 41(3-4): 183-192. 1998.
- [20] RAMÓN, J.P.; FOLCH, J.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; ALABART, J.L.; COCERO, M.J.; ECHEGOYEN, E. La técnica de la transferencia de embriones en el ganado ovino. **ITEA.** Vol. Extra 11 (1): 61-63. 1991.
- [21] RAMÓN, J.P.; FOLCH, J.; MONTORO, V.; COCERO, M.J. Efecto de la concentración de Acetato de Fluorogestona en ovejas tratadas con FSH y GH. **VI Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario.** Roque, 23-26 de enero, Celaya Gto. México. 1: 235. 1996.
- [22] RAMÓN, J.; FOLCH, J.; ALABART, J.; COCERO, M.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; ALABART, J.; GARBAYO, J. Transferencia de embriones en ovejas receptoras tratadas con hormona de crecimiento, efectos sobre la viabilidad de los embriones. **Vet. Méx.** 29(2): 137-145. 1998.
- [23] RIEGER, D.; WALTON, J.S.; GOODWIN, M.L.; JOHNSON, W.H. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenol.** 35: 863-868. 1991.
- [24] ROSAS, P.J.; ZARCO, Q.L.; VALENCIA, M.J. Efectos de un tratamiento corto de somatotropina bovina recombinante (rBST) sobre la función lútea y el desarrollo embrionario temprano en la oveja superovulada. **Vet. Mex.** 26: 339. 1995.
- [25] RUSSEL, A.F.J. Body condition scoring in sheep. **In Pract.** 3: 91-93. 1984.
- [26] SCARAMUZZI, R.J.; MURRAY, J.F.; DOWNING, J.A.; CAMPBELL, B.K. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. **Dom. Anim. Endocrinol.** 17(2-3): 269-277. 1999.
- [27] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). Versión 5,16. Cary, NC, USA. 1991.
- [28] STEVENSON, K.R.; WATHES, D.C. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the estrous cycle. **J. Reprod. Fertil.** 108(1): 31-40. 1996.
- [29] WEST, K.S.; MEYER, H.H.; NAWAZ, M. Effects of differential ewe condition at mating and early postmating nutrition on embryo survival. **J. Anim. Sci.** 69(10):3931-8. 1991.
- [30] WINTENBERGER-TORRES, S. ; SEVELLEC, C. Atlas du développement embryonnaire precoce chez les ovins. **INRA.** Paris. 10-51 pp. 1987.