

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE COMO FACTOR EN  
LA EFICIENCIA EMBRIONARIA EN CABRAS SUPEROVULADAS CON  
FSHp**

**PRESENTA**

**ING. ADÁN GONZÁLEZ GÓMEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**NOVIEMBRE, 2013**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
POSGRADO CONJUNTO EN CIENCIA ANIMAL**



**TESIS**

**LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE COMO FACTOR EN LA EFICIENCIA EMBRIONARIA EN CABRAS SUPEROVULADAS CON FSHp**

**QUE PRESENTA**

**ING. ADÁN GONZÁLEZ GÓMEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2013**

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA- MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE COMO FACTOR EN LA  
EFICIENCIA EMBRIONARIA EN CABRAS SUPEROVULADAS CON FSHp

TESIS QUE PRESENTA:

ING. ADÁN GONZÁLEZ GÓMEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

NOVIEMBRE 2013

**LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE COMO FACTOR EN LA EFICIENCIA EMBRIONARIA EN CABRAS SUPEROVULADAS CON FSHp.**

Aprobación de la tesis por el comité particular:



---

**Dr. Fernando Sanchez Dávila**

*Asesor Principal*



---

**Ph. D. Alejandro S. del Bosque González**

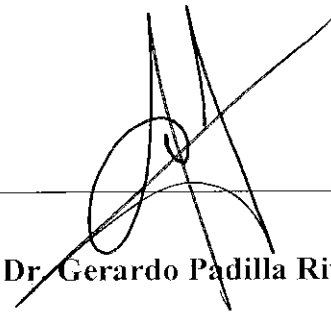
*Co – Asesor*



---

**Dr. Rogelio A. Ledezma Torres**

*Co – Asesor*



---

**Dr. Gerardo Padilla Rivas**

*Co – Asesor*

Escobedo, N.L., México, Noviembre de 2013.

## DEDICATORIAS.

A **Dios**, primeramente por permitirme llegar a la conclusión de este trabajo y poder terminar mi segunda tesis y obtener el grado de MC, por prestarme salud y recibir el amor de todos mis seres queridos.

A mis **padres**, que gracias a su esfuerzo en los valores y educación inculcada. Hoy en día soy un hombre diferente, centrado y optimista de salir siempre adelante. A ellos que me enseñaron lo mejor de sí y convivir en armonía y unión familiar. Los grandes cimientos de mi vida los cuales me han permitido crecer y ser un mejor ser humano. A ambos, gracias; gracias por darme el mejor ejemplo de vida.

A mis **hermanos**, que siempre han estado a mi lado para apoyarme y gracias a sus errores puedo observarlos, analizarlos y no cometerlos. Gracias a sus virtudes, trato de tomar lo mejor de ellos y construir mi vida con los mejores ejemplos. Y a pesar de ser el hermano menor, espero y este logro lo puedan tomar como ejemplo y salir adelante enfrentando las decisiones que han tomado, querer es poder y hay que estar de acuerdo en que no existen cosas imposibles, solo retos difíciles.

Y la última dedicatoria, la reserve para lo mejor de mi vida, el mejor regalo que Dios me mando, mi futura esposa **Liliana Sánchez Rangel**, este es un logro más, espero y sea de tu agrado y sirva para tu desarrollo profesional y personal. Aquí te demuestro que con esfuerzo, empeño y dedicación llegaras a la meta, gracias por ser mi motor e impulsarme a conseguir lo que me propongo. Esta es una muestra de cuanto me esforzaré para conseguir nuestros sueños, gracias y espero permanecer a tu lado por el resto de nuestras vidas, poder disfrutar y cosechar estos grandes éxitos.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria de la UANL, por las prestaciones y servicios para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Fernando Sánchez Dávila, por su empeño y tiempo dedicado a mi formación profesional durante estos 7 años. A su esfuerzo brindado para la elaboración de esta investigación. Un investigador y gran ejemplo en mi vida, y espero algún día llegar a ser mejor que él. A su familia por todas las atenciones recibidas.

Mención especial para los ranchos que me permitieron y me brindaron gran ayuda para la elaboración del proyecto, al “**Rancho Cerro de Agua**” ubicado en Galeana, Nuevo León y a su propietario Francisco Chapa. Y al “**Rancho Mary**” de Higuera, Nuevo León, propiedad del Dr. Fernando Sánchez y familia. Gracias a ambas partes por la gran colaboración.

Al Comité Revisor, por su tiempo, comentarios y observaciones brindadas, todas ellas de gran ayuda para que esto pudiera salir adelante, Gracias.

A mi lugar de trabajo, Prestamos y Soluciones Financieras SA de CV, por el tiempo libre y la comprensión de los permisos para concluir dicha investigación.

A todos mis amigos, compañeros y personas que de forma directa o indirecta ayudaron a la elaboración y conclusión del presente trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Título:</b>	<b>Página</b>
Comité Revisor.....	I
Dedicatorias.....	II
Agradecimientos.....	III
Índice de contenido.....	IV
Índice de figuras.....	VIII
Índice de tablas.....	IX
Lista de abreviaturas.....	X
Resumen.....	XI
<b>I. Objetivos y Metas</b> .....	XII
<b>II. Hipótesis</b> .....	XII
<b>III. Introducción</b> .....	1
<b>IV. Revisión de Literatura</b> .....	4
IV. 1. Ciclo Estral.....	4
IV. 1.1 El ciclo ovárico y su regulación. ....	5

IV. 2. Fundamentos y objetivos de la técnica MOET.....	8
IV. 2.1 Principios y consideraciones generales.....	10
IV. 3. Fisiología hormonal en un programa MOET.....	11
IV. 4. Estimulación ovárica para la ovulación múltiple.....	13
IV. 5. Factores que influyen en la respuesta a la superovulación.....	14
IV. 6. Sincronización del estro donante-receptora.....	16
IV. 7. Fecundación de la hembra donante.....	17
IV. 7.1 Dosis inseminantes.....	18
IV. 7.2 Momento óptimo de realización de la IA.....	18
IV. 7.3 Tasa de fertilización.....	18
IV. 8. Colecta de embriones.....	20
IV. 8.1 Técnica quirúrgica.....	21
IV. 8.2 Técnica no quirúrgica.....	23
IV. 9. Búsqueda y clasificación de embriones. ....	24
IV. 10. Transferencia de embriones.....	26
IV. 11. Conservación de embriones.....	28
IV. 11.1 Conservación por enfriamiento a 5 °C.....	28

IV. 11.2 Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido.....	29
IV. 11.3 Técnica de descongelamiento.....	30
IV. 11.4 Técnica de vitrificación.....	31
IV. 12. Eficiencia de la transferencia de embriones.....	32
IV. 13. Ventaja sanitaria de la TE. ....	33
IV. 14. Mecanismos de acción de la rBST.....	34
IV. 15. Uso de la rBST en caprinos y ovinos. ....	36
<b>V. Materiales y Métodos.....</b>	<b>38</b>
V. 1. Localización del experimento.....	39
V. 2. Manejo de los animales.....	38
V. 2.1. Condición corporal (CC) ....	39
V. 2.2. Manejo sanitario.....	39
V. 3. Sincronización donadora/receptora .....	39
V. 4. Tratamiento superovulatorio y fecundación.....	40
V. 5. Detección de estros y fecundación.....	40
V. 6. Recolección, búsqueda, clasificación y transferencia de embriones.....	41

V. 7. Diseño experimental.....	41
<b>VI. Resultados y Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>VII. Conclusión.....</b>	<b>47</b>
<b>VIII .Bibliografía.....</b>	<b>48</b>
<b>IX. Anexos.....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Título:</b>	<b>Página</b>
Fig.1. Representación esquemática de los diferentes eventos fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral en la cabra: el patrón de desarrollo del folículo, ciclo ovárico y las regulaciones endocrinas. *Folículo ovulatorio(s). Adaptada de: Evans (2003).	6
Fig. 2. La evolución del comportamiento sexual durante el ciclo estral en cabras japonesas de línea enana. De: Fabre-Nys (2000)	8
Fig. 3 Ejemplo de un cronograma para la sincronización de hembras donantes (superior)- receptoras (inferior) para el Noreste de México.	17
Fig 4. Punción en la unión útero tubárica con introducción de sonda foley de dos vías.	22
Fig 5. Segunda punción en oviducto para la aplicación de 20cc de PBS.	22
Fig 6. Colecta de embriones mediante arrastre en una caja petri.	22
Fig 7. Búsqueda de embriones realizada en estereoscopio a 40x	25
Fig 8. Blastocistos caprinos grado I y II.	25
Fig 9. Búsqueda del cuerno uterino para transferir embriones.	27
Fig 10. Siembra de embrión mediante técnica semi-quirúrgica.	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Título:</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Desarrollo embrionario comparativo entre ovejas y cabras en diferentes momentos después del retiro de las esponjas intravaginales (Adaptación de Moore, 1980).	21
Tabla 2. Resultados del efecto de la rBST en cabras donadoras en época de anestro estacional. (medias $\pm$ EE).	42
Tabla 3. Resultados del efecto de la rBST en cabras donadoras al final de la época de anestro estacional (medias $\pm$ EE).	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>CC</i></b>	Condición corporal
<b><i>CIDR</i></b>	Control Interno de Liberación de Droga
<b><i>CL</i></b>	Cuerpo luteo
<b><i>eCG</i></b>	Gonadotropina corionica equina
<b><i>FGA</i></b>	Acetato de fluorogestona
<b><i>FSHp</i></b>	Hormona folículo estimulante porcina
<b><i>GnRH</i></b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b><i>IA</i></b>	Inseminación artificial
<b><i>IATF</i></b>	Inseminación artificial a tiempo fijo
<b><i>INFT</i></b>	Interferon- tau
<b><i>IGF-I</i></b>	Factores de crecimiento similar a la insulina- tipo I
<b><i>IRE</i></b>	Intervalo retiro- estro
<b><i>MAP</i></b>	Acetato de medroxiprogesterona
<b><i>MOET</i></b>	Ovulación múltiple y transferencia de embriones
<b><i>P<sub>4</sub></i></b>	Progesterona
<b><i>PBS</i></b>	Solución buffer fosfato
<b><i>PGF<sub>2α</sub></i></b>	Postaglandina f2- alfa
<b><i>PRDP</i></b>	Post retiro- dispositivo progestágeno
<b><i>PV</i></b>	Peso vivo
<b><i>rBST</i></b>	Somatotropina bovina recombinante
<b><i>TE</i></b>	Transferencia de embriones
<b><i>TRA</i></b>	Técnicas de reproducción asistida

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue utilizar la Somatotropina bovina recombinante (rbST) en cabras lecheras superovuladas para determinar cómo actúa en la eficiencia embrionaria fuera de la estación reproductiva. Se utilizaron 15 cabras (primer etapa, reproductiva) Saanen (n=8) y Alpina (n=7) y 16 cabras (Alpina n=6, Nubio n=9, Saanen n=1) en la segunda etapa. La sincronización del estro, se realizó durante 7 días con CIDR (Control Interno de Liberación de Droga) y 200 mg de FSHp (Hormona folículo estimulante porcina). Las cabras se asignaron en tres tratamientos ajustados en base a peso vivo (PV) y condición corporal (CC) (0 mg, 100 mg y 200 mg de rbST). El lavado se realizó a los 7 días posteriores al retiro del dispositivo mediante laparotomía. Los resultados de la primer etapa, para el número de cuerpos lúteos fueron iguales estadísticamente ( $3.2 \pm 2.4$  control,  $5.3 \pm 2.1$  100 mg y  $6.7 \pm 2.8$  200 mg). El número de embriones recolectados fue significativamente mayor para el tratamiento de 200 mg de rbST ( $7.00 \pm 4.95$ ); sin embargo, el porcentaje de embriones recolectados fue menor en el tratamiento de 200 mg de rbST (63.6%), grupo control (100%) y el tratamiento de 100 mg de rbST (83.3%). El porcentaje de embriones transferibles fue del 100% para todos los tratamientos. En la segunda etapa, no hubo una respuesta significativa en el tratamiento de superovulación y por lo tanto no se logró evaluar el efecto de la rbST. Después de los resultados, se puede concluir; que la rbST tiene un efecto positivo en cuanto a la cantidad y calidad de embriones producidos por cabras superovuladas.

**Palabras clave:** Somatotropina bovina recombinante, embrión, superovulación, FHSp, cabras.

## **I. Objetivos y Metas.**

**Objetivo general:** Determinar el efecto de una dosis única de rBST en la eficiencia embrionaria en cabras sometidas a un programa de superovulación.

### **Metas.**

- Implementación y desarrollo de un programa MOET en caprinos en el estado de Nuevo León para lograr índices productivos y reproductivos eficientes, que vengan a fortalecer la cadena sectorial de esta especie pecuaria en beneficio de los productores y por lo tanto en el desarrollo sustentable del sector pecuario de la región.
- Estandarizar un protocolo corto con la aplicación de una dosis única de rBST en los programas MOET de acuerdo a las condiciones en que se explotan las cabras a nivel estatal.

## **II. Hipótesis.**

La dosificación de una dosis única de rBST mejorará la eficiencia embrionaria en cabras que se someten a un tratamiento corto de superovulación.

### **III. Introducción.**

La producción caprina en México se ha incrementado en los últimos años, debido al aumento en la demanda de carne y leche (AMCGCR, 2007). Los productores demandan una mejor calidad genética en sus animales, y recurren al extranjero para adquirir material genético sobresaliente (Gama y Bressan 2011). Dentro de las técnicas de reproducción asistida (TRA) empleadas actualmente a nivel mundial, se encuentra la inseminación artificial, acompañada de otra técnica, que es el programa integral MOET (Múltiple ovulación y transferencia de embriones), donde el objetivo es acelerar el progreso genético vía madre (Baldassarre 2007). En los últimos 25 años se han logrado considerables avances en programas MOET, como herramienta del mejoramiento genético en ovinos y caprinos, siendo necesario maximizar la producción y sobrevivencia de embriones para obtener varias crías de alto mérito genético. Cabe señalar que una hembra de alto valor genético podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad, de manera que es posible multiplicar su potencial reproductivo, al utilizarse cabras de escaso valor genético como receptoras de embriones genéticamente superiores (Mueller, 1993). El potencial natural reproductivo de cada especie y de cada raza es una limitante a la rapidez de difusión del progreso genético. En las condiciones tradicionales de cría ovina y caprina, el número de descendientes producidos por hembra y por año es de una o dos crías, por lo tanto durante su vida reproductiva se logran obtener entre 6 a 8 crías. Los programas MOET permiten incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. Sin embargo, esta técnica desde sus inicios ha tenido respuestas muy variadas en cabras en función de la tasa de recuperación y calidad embrionaria, dependiendo de los protocolos de superovulación que se han utilizado a nivel mundial (Cognie, 2003). Gran parte

de la variabilidad en la respuesta ovulatoria se atribuye a la población folicular presente en los ovarios al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, la cual es completamente aleatoria en los protocolos convencionales (Gonzalez-Bulnes 2007). Diversas estrategias han sido diseñadas y evaluadas con el objetivo de aumentar en número de folículos reclutables y disminuir los efectos negativos de folículos dominantes al comienzo del estímulo gonadotrópico. Entre las estrategias utilizadas se destacan: **1)** El uso de agonistas y/o antagonistas de GnRH (Hormona liberadora de gonadotrofinas) previo a la superovulación a los efectos de incrementar el número de folículos pequeños disponibles para estimulación con FSH exógena (Cognie et al., 2003); **2)** iniciar el tratamiento superovulatorio al comienzo del ciclo, inmediatamente después de la ovulación (Menchaca y Rubianes 2002); **3)** asegurar concentraciones de progesterona alta durante la fase inicial del tratamiento superovulatorio (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Recientemente, se han realizados estudios en ovejas relacionados con la aplicación previa a la ovulación de la Somatotropina bovina recombinante (rBST), para mejorar la maduración de una mayor cantidad de folículos e incrementar la cantidad recuperada de embriones y la viabilidad embrionaria (Navarrete et al. 2008; Mejia et al. 2011). 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 (Navarrete et al. 2008); también se ha encontrado que altera los componentes del sistema de factores de crecimiento insulínico, IGF (principalmente IGF-I) estimulando la esteroidogénesis folicular (Montero-Pardo et al. 2011) y los fluidos uterinos (Costine et al. 2005). El aumento de los IGF-I disminuye las secreciones de Interferon (IFNT), producidas en el embrión, dando como resultado una aceleración en el desarrollo embrionario (Montero-Pardo et al., 2011; Mejia et al. 2011). Asimismo, se ha relacionado con el desarrollo y mantenimiento de la sensibilidad a la LH en los folículos antrales de ovinos. En este sentido, la administración de

rBST mantiene la sensibilidad de los folículos ováricos de LH (hormona leutilizante) y FSH en ovejas hipofisectomizadas (Eckery et al. 1997).

## **IV. Revisión de Literatura.**

En las cabras, el principal problema que surge reproductivamente es de ser una especie que muestra una estacionalidad reproductiva, la cual está relacionada con las variaciones anuales del fotoperiodo (Delgadillo et al, 2004). El inicio y la duración de su período reproductivo durante todo el año, depende de diferentes factores ambientales y fisiológicos (latitud y el clima, la disponibilidad de alimentos, la raza y el sistema de reproducción). El hecho de que su actividad sexual es estacional, afecta a la distribución de su producción durante el año y es un problema tanto en los productos lácteos y los sistemas de producción de carne (Chemineau et al, 2004).

### **IV. 1. Ciclo Estral**

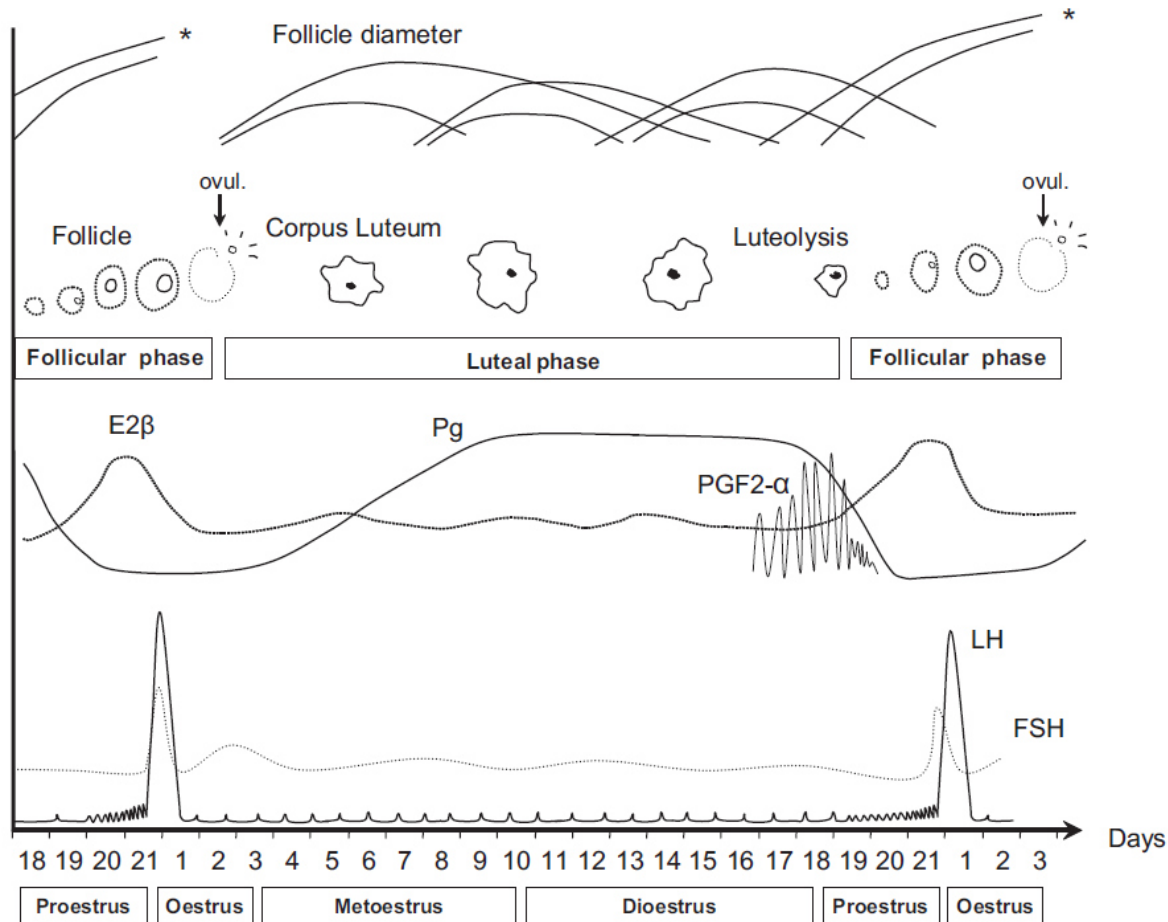
El ciclo estral se compone de todos los cambios morfológicos y fisiológicos en los ovarios y el tracto genital para la expresión del estro (fase de receptividad hacia el macho) y a la ovulación, lo cual involucra la preparación de los genitales para la cópula, la fecundación y posteriormente el embrión. Durante el transcurso de la temporada de reproducción, las hembras pueden someterse a varios ciclos de estro sucesivamente y el número de ciclos sucesivos depende de la longitud de la época de reproducción y la cría de las cabras (Chemineau et al. 1999). La longitud de ciclo estral se define por el intervalo entre dos expresiones sucesivas de estro o dos ovulaciones (Evans 2003). Por lo tanto, la duración promedio del ciclo estral de la cabra es de  $21 \pm 4$  días (Fig. 1). Un estudio con cabras alpinas durante la temporada reproductiva registró un 77% de normalidad en la duración de sus ciclos (17-25 días), el 14% fueron de corta duración (8 días en promedio) y el 9% fueron ciclos largos (39 días en promedio, Baril et al. 1993). La alta frecuencia relativa de ciclos cortos es característica de las cabras triponas o jóvenes, y se incrementa cuando la ovulación es inducida justo antes o durante la temporada reproductiva. Esta

proporción puede ser modulada por el medio ambiente, donde se menciona al fotoperíodo y la nutrición (Santiago et al. 2008).

#### **IV. 1.1 El ciclo ovárico y su regulación.**

Durante el periodo del ciclo estral, los ovarios sufren un proceso de cambios morfológicos (reclutamiento y crecimiento folicular), bioquímicos (maduración folicular) y fisiológicos (regulaciones endócrinas); cambios que transcurren durante el proceso de la ovulación. Todo este conjunto de cambios cíclicos que se lleva en las gónadas, es lo que llamamos ciclo ovárico (Rahman et al. 2008).

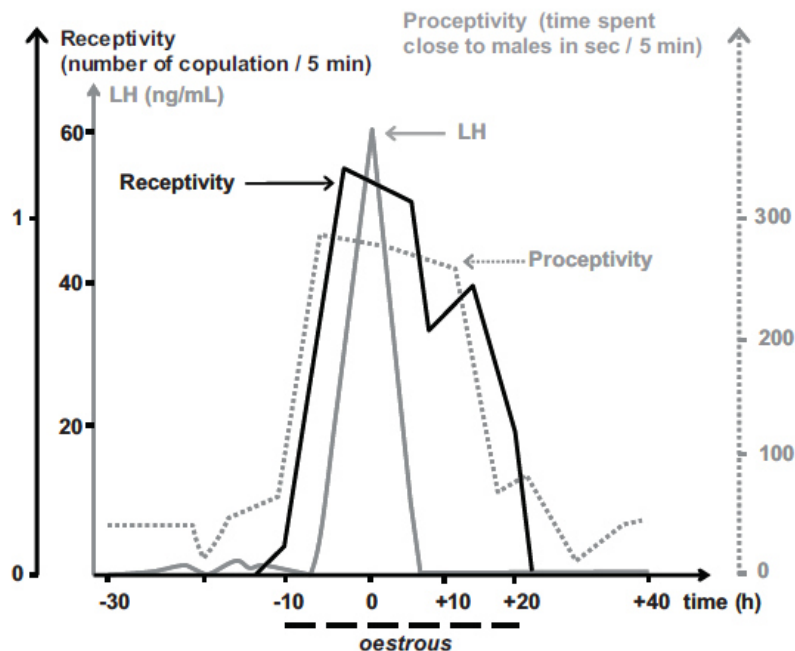
El crecimiento folicular se desarrolla de una manera de ondas durante todo el ciclo (Evans 2003). Una onda folicular es caracterizada por una liberación de hormona gonadotrópica (GnRH); , estas ondas, dependen del crecimiento folicular como lo es: el reclutamiento, selección y dominancia folicular, que generalmente en cabras y ovejas se presenta por tres ondas foliculares (Driancourt, 2001). Diversos estudios utilizan la técnica de ecografía y mediciones de niveles de gonadotropinas en plasma sanguíneo para determinar las ondas que prevalecen durante el ciclo (Ali 2006; Simões et al. 2006; Martinez et al. 2005). La última onda proporciona el folículo ovulatorio. Cuando se producen ovulaciones dobles, suelen ser de los folículos derivados de la misma onda, pero en algunos casos se derivan a partir de dos olas consecutivas del folículo (Evans 2003).



**Fig.1.** Representación esquemática de los diferentes eventos fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral en la cabra: el patrón de desarrollo del folículo, ciclo ovárico y las regulaciones endocrinas. \* Foliculo ovulatorio (s). Adaptada de: Evans (2003).

El ciclo ovárico lo podemos dividir en dos fases: a) fase folicular y b) fase luteal (Fig. 1). La fase folicular está representada por la onda folicular, la cual desarrolla el foliculo ovulatorio e involucra la maduración de los folículos dependientes de gonadotropinas hasta la ovulación (crecimiento terminal). Durante la fase folicular, la FSH secretada por la glándula pituitaria estimula el crecimiento folicular. Una onda corta de gonadotropina actúa sobre los folículos antrales (de 2-3 mm de diámetro), los cuales son elegidos para poder desarrollarse. Sólo 2 o 3 de estos folículos llegan a medir 4 mm de diámetro y son elegidos para entrar en la fase dominancia. Bajo la influencia de la LH, llegan a la fase pre-ovulatoria (6-9mm), mientras que los folículos

subordinados son degenerados (atresia folicular). El aumento de las concentraciones periféricas de 17- $\beta$ - estradiol, (secretada por los folículos más grandes) induce un comportamiento de estro y actúa como un "feedback" positivo en el eje de gonadotropina. El consiguiente aumento de la secreción de GnRH induce el aumento de las cantidades de pre-ovulación de LH e induce la ovulación 20-26 horas más tarde y posteriormente; la luteinización de las células foliculares (Rahman et al. 2008). El comienzo de la fase folicular, antes de que el comportamiento del estro sea observado, también se le conoce como proestro. La fase del estro incluye eventos de la conducta estral a la ovulación. La tasa de ovulación se ve afectada por la época y por la nutrición (Scaramuzzi et al. 2006). La fase luteal tiene su inicio en el momento de la ovulación. Alrededor de 5 días después del comienzo del estro, las células del folículo ovulado se tornan a células luteales y comienzan a formar el cuerpo lúteo (CL). El CL comienza a secretar progesterona ( $P_4$ ), por lo tanto las concentraciones de  $P_4$  en plasma sanguíneo comienzan a incrementar ( $> 1\text{ng/ml}$ ) durante 16 días. Durante esta fase lútea, la gonadotropina dependiente de crecimiento folicular continúa de una forma de onda similar a la progesterona, pero inhibe la ovulación. Al final de la fase lútea, 16-18 días después del estro, la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  es secretada por la pared no fecundada del útero, esto induce la regresión del CL (luteolisis) acompañada de una disminución en las secreciones de progesterona. Esta disminución en las concentraciones de progesterona en el plasma sanguíneo va acompañada del aumento de la secreción de las hormonas gonadotrópicas (GnRH), para comenzar una nueva fase folicular. La fase folicular es llamada también, periodo post-estro, el cual puede ser dividido en metaestro (cuando las concentraciones periféricas de la progesterona comienza a aumentar) y diestro (cuando las concentraciones periféricas de la progesterona son altas hasta el comienzo de la luteólisis).



*Fig. 2. La evolución del comportamiento sexual durante el ciclo estral en cabras japonesas de línea enana. De: Fabre-Nys (2000)*

#### IV. 2. Fundamentos y objetivos de la técnica MOET

La finalidad de la aplicación de esta técnica en los animales domésticos tiene fundamentos genéticos, comercial, sanitario y de conservación de especies. Permite lograr los siguientes objetivos:

- ✓ Introducir y difundir rápidamente nuevas razas o genotipos de alto valor productivo. Las características deseables son rápidamente introducidas en la majada o hato en una sola generación.
- ✓ Reducir riesgos en la transmisión de enfermedades, debido a que en los primeros estadios de su desarrollo, los embriones presentan una protección natural contra los

agentes infecciosos. Esta ventaja comparativa ha favorecido el comercio internacional de embriones congelados.

- ✓ Difundir material genético de alto valor comercial con facilidad de adaptación ambiental de las crías a diferentes sistemas de producción y manejo (mediante receptoras adaptadas a la región).
- ✓ Aumentar el progreso genético en la producción, a través del incremento en la intensidad de selección de las madres destinadas a la producción de machos genéticamente superiores, al disponer de un mayor número de crías por hembra seleccionada.
- ✓ Acortar el intervalo generacional. La posibilidad de obtener descendencia de las madres a temprana edad permite una reducción del intervalo generacional, con mayor beneficio cuando se emplea semen de animales jóvenes.
- ✓ Apoyar las técnicas reproductivas en las que interviene la micromanipulación de embriones (determinación del sexo, fecundación “in vitro”, clonación, transgénesis, etc.).
- ✓ Conservar razas o especies. La conservación de material genético (embriones congelados) en bancos de germoplasma permite la conservación de genes que de otra manera desaparecerían con la especie.

#### **IV. 2.1 Principios y consideraciones generales.**

La elección de las hembras donantes se realizará teniendo en cuenta su valor genético y en base a los criterios apropiados de mejoramiento de las aptitudes productivas para cada raza y tomando en cuenta el objetivo principal productivo (Evans 2003).

Las condiciones generales de un buen estado reproductivo, sanitario y nutricional son imprescindibles, tanto para las hembras donantes como para las receptoras. Se debe realizar el control clínico de los animales, los tests serológicos de enfermedades infecto contagiosas (Brucelosis, Aftosa, etc.) y los controles parasitarios correspondientes (Gibbons et al. 2009).

Las hembras deben al menos haber tenido una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses post parto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Acortar estos tiempos puede significar una baja respuesta al tratamiento y por lo tanto una baja producción de embriones (Gibbons et al. 2008 ; 2009).

La necesidad de utilizar hembras jóvenes como donantes puede llevar a una baja eficiencia reproductiva. En el supuesto caso de tratar una hembra nulípara, el peso mínimo deberá ser del 75% del peso adulto de la raza y haber presentado estros anteriormente (Gibbons et al. 2008).

Se recomienda no usar tríponas como madres receptoras. Lo indicado son las hembras adultas, que puedan llevar a cabo la gestación sin comprometer su crecimiento y contribuir al desarrollo de la cría por medio de una buena lactancia.

Los programas MOET requieren de una serie de manipulaciones de las donantes y receptoras. En el caso de recurrir a instalaciones extrañas, es preferible que los animales tengan un período de adaptación previo, de uno a dos meses, antes de comenzar los tratamientos. La identificación con números visibles a la distancia, permite realizar los manejos necesarios sin cometer equivocaciones y sin provocar stress, que perjudicar los resultados.

Se debe considerar los aspectos sanitarios, nutricionales y reproductivos de los machos y la calidad seminal ya sea que se utilice monta natural o la inseminación artificial con semen fresco, refrigerado o congelado.

#### **IV. 3. Fisiología hormonal en un programa MOET**

Los tratamientos hormonales que pueden ser usados en programas MOET son inducción del estro y la ovulación múltiple (hembras donantes) o la ovulación (hembras receptoras) y la sincronización del estro entre ambas (Gonzalez-Bulnes et al. 2004). La GnRH es un decapeptido producido por neuronas secretoras del sistema nervioso central. La secreción de esta hormona está influenciada por condiciones externas (fotoperíodo, stress, nutrición) e internas (estrógenos, progesterona, feromonas). Su acción se ejerce a nivel de las células gonadotróficas de la hipófisis, activando la síntesis y liberación de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante) (Evans 2003).

Las gonadotrofinas, FSH y LH, son glicoproteínas sintetizadas a nivel de la hipófisis anterior, y participan en la regulación de la función ovárica.

La FSH favorece el crecimiento y la maduración folicular y de los ovocitos; induce en los folículos maduros la presentación de receptores a la LH y sostiene la liberación de estrógenos. La

secreción basal está asociada a la dinámica folicular durante la fase luteal y presenta dos incrementos durante la fase folicular: el primero conjuntamente a la descarga preovulatoria de LH, que es GnRH dependiente y otro, de menor intensidad, 18 horas más tarde producto de la caída de los niveles sanguíneos de los estrógenos (no dependiente de la GnRH) (Evans 2003).

La LH incrementa su concentración durante un período corto previo a la ovulación en forma de pulsos. La frecuencia de los pulsos de LH está supeditada a la estimulación de las células hipofisarias por la GnRH. Cada pulso de LH, corresponde con un pulso de GnRH. Durante la fase preovulatoria, el incremento de la secreción de estrógenos liberados por los folículos ejerce un retrocontrol positivo sobre el eje hipotálamo hipofisario, que induce al denominado "pico preovulatorio de LH". La LH participa conjuntamente con la FSH en la maduración final del folículo, induce la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo que presentó ovulación (Ali 2006).

La  $P_4$  es un esteroide secretado por el cuerpo lúteo; en el caso de ocurrir fertilización, se mantiene en valores constantes durante la gestación a partir de la placenta y del cuerpo lúteo. Su función es mantener la preñez hasta el parto. Antes de la ovulación, participa con los estrógenos en la manifestación externa del celo. Ejerce un retrocontrol negativo sobre el hipotálamo, inhibiendo la secreción de GnRH y la consiguiente pulsatilidad de LH, de manera que bloquea la ovulación (Evans 2003).

La prostaglandina es secretada por el endometrio uterino. Su incremento induce la luteólisis (eliminación del cuerpo lúteo), y por ende, el descenso de los niveles de progesterona y la aparición de un nuevo período de estro (Evans 2003).

#### **IV. 4. Estimulación ovárica para la ovulación múltiple**

La ovulación múltiple ha sido inducida en la especie ovina y caprina, mediante la administración de 1000 a 1200 UI de eCG (Gonadotropina coriónica equina), 48 horas antes de finalizar el tratamiento progestacional. Los tratamientos con eCG han dado resultados inferiores a los obtenidos mediante FSH, debido a que por su elevado peso molecular, tiene una vida media larga (21 horas) y provoca un crecimiento folicular disperso, induce la formación de folículos anaovulatorios, luteinización folicular prematura y reduce la fertilidad, recuperación y calidad embrionaria (Nunes y Salgueiro, 2011). La ovulación múltiple se presenta a las 54 horas post retiro-dispositivo de progestágeno (PRDP) (Goel et al. 2005).

Una mayor eficiencia se logra cuando se utiliza FSH de origen porcino u ovino (Alberio et al. 1993). En contraste con la eCG, el empleo de la FSH determina una mejor migración espermática (Evans y Armstrong, 1984), mayor tasa de fertilización cuando se emplea la inseminación artificial (Evans et al. 1984) y una mayor producción de embriones (Armstrong et al. 1983; Torres et al. 1987).

El tratamiento más utilizado para provocar la ovulación múltiple en caprinos es la aplicación de dosis iguales de FSH hacia el final del tratamiento progestágeno. A diferencia de la eCG, la FSH presenta una vida biológica corta (3 a 4 horas), por lo que se hace necesario su administración repartida en 6-8 aplicaciones cada 12 horas. La ovulación múltiple se presenta a las 60 horas PRDP (Evans 2003).

Las dosis de FSH se expresan en miligramos Armour, que es una unidad de actividad de un test biológico equivalente de 10 a 14  $\mu$ g de hormona FSH pura. Las dosis recomendables para las cabras y las ovejas varían entre los 16 a 20 mg Armour (González et al. 1991; Brebion et al.

1992); la respuesta ovulatoria a estas dosis está sujeta a los diferentes genotipos. El aumento de la dosis de FSH (mayor a 16-20 mg Armour) no produce un incremento de la respuesta ovulatoria. Así mismo la FSH puede expresarse en mg de NIH-FSH-P1, recomendándose dosis totales de hasta 200 mg por hembra donante.

Para obtener una mejor respuesta ovulatoria se aconseja administrar LH en forma creciente hacia el final del tratamiento progestacional (Baril et al. 1992). Se recomienda una relación FSH/LH de 3:1 (1er a 3er aplicación), 1:1 (4ta aplicación) y 1:2 (5ta aplicación). La presentación del estro post tratamiento de FSH es variable; sin embargo es habitual observar celo entre las 24 a 36 horas PRDP. El tratamiento para las cabras es similar al presentado para el ovino (administración de 20-30 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Bioniche, Canadá) por oveja tratada). Para obtener una mejor tasa de fertilización, se recomienda un tratamiento corto con un progestágeno en esponja intravaginal o CIDR de 12 días y una dosis de  $PF_{2\alpha}$  (50  $\mu$ g de Cloprostenol) 48 horas antes de retirar las esponjas (Corteel et al. 1988).

Cabe considerar que siempre será necesario determinar una dosis recomendable según la eficiencia del tratamiento de ovulación múltiple y ajustarla en base a la especie, raza, época del año, sistema de producción, entre otros factores.

#### **IV. 5. Factores que influyen en la respuesta a la superovulación.**

El factor intrínseco de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de superovulación. Estudios realizados en vacunos demostraron que solamente el 68% de las hembras respondió con embriones transferibles. El 32% restante incluía a las hembras sin respuesta a la estimulación ovárica, sin recuperación de embriones u ovocitos, o con recuperación de embriones no transferibles (Donaldson, 1984). Por consiguiente siempre se debe tener

presente que un porcentaje de hembras no responderan al tratamiento hormonal de superovulación. La variabilidad individual a la respuesta hormonal de ovulación múltiple está condicionada por factores extrínsecos (raza, estación sexual, alimentación) e intrínsecos (foliculogénesis) (González- Bulnes et al. 2004).

La raza es un importante factor de variación, presentándose en las más prolíficas una mayor respuesta a la ovulación múltiple, embriones transferibles y crías nacidas (González- Bulnes et al. 2004). La época reproductiva también influye sobre el número medio de ovulaciones por hembra, siendo superior en la estación reproductiva respecto al período de anestro. Esta diferencia no se observó en las cabras lecheras (Baril y Vallet, 1990b), aunque la calidad de los embriones fue superior en la época reproductiva (Baril y Vallet, 1990a).

La alimentación, principalmente energía, juega un factor fundamental en la respuesta a los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, debido a que se ha demostrado que no solamente afecta la respuesta ovulatoria sino que es posible que se presenten luteólisis prematuras, tanto en estación como en contraestación sexual. Consecuentemente la recuperación embrionaria es baja. En cabras, la aparición de este fenómeno es muy variable (0 a 27%). Este problema también ha sido reportado en ovinos (González- Bulnes et al. 2004).

La respuesta ovulatoria a los tratamientos hormonales ha sido estudiada en base a la presencia folicular en los ovarios y se ha determinado que está positivamente correlacionada con el número de folículos chicos (2 a 3 mm de diámetro) al momento de la primera aplicación de FSH, la cantidad de folículos medianos (4-5 mm) al momento de finalizado el tratamiento progestacional y el número de folículos grandes (>6 mm) al momento del estro (González-Bulnes et al. 2000). Se ha sugerido que el bloqueo gonadotropo mediante un tratamiento prolongado con

antagonista de la GnRH (10 a 14 días), previo a la aplicación de FSH, posibilita incrementar el número y concentrar las ovulaciones, reducir su variabilidad entre animales y duplicar el número de corderos nacidos por donante (7 crías por hembra donante) con una alta repetibilidad. A su vez, la administración endovenosa de 3 mg de LH a las 32-36 horas de finalizado el tratamiento progestacional, posibilita sincronizar la ovulación entre las 20–28 horas post aplicación, permitiendo realizar la inseminación artificial a tiempo fijo a las 48–50 horas PRDP (Cognie et al. 2003).

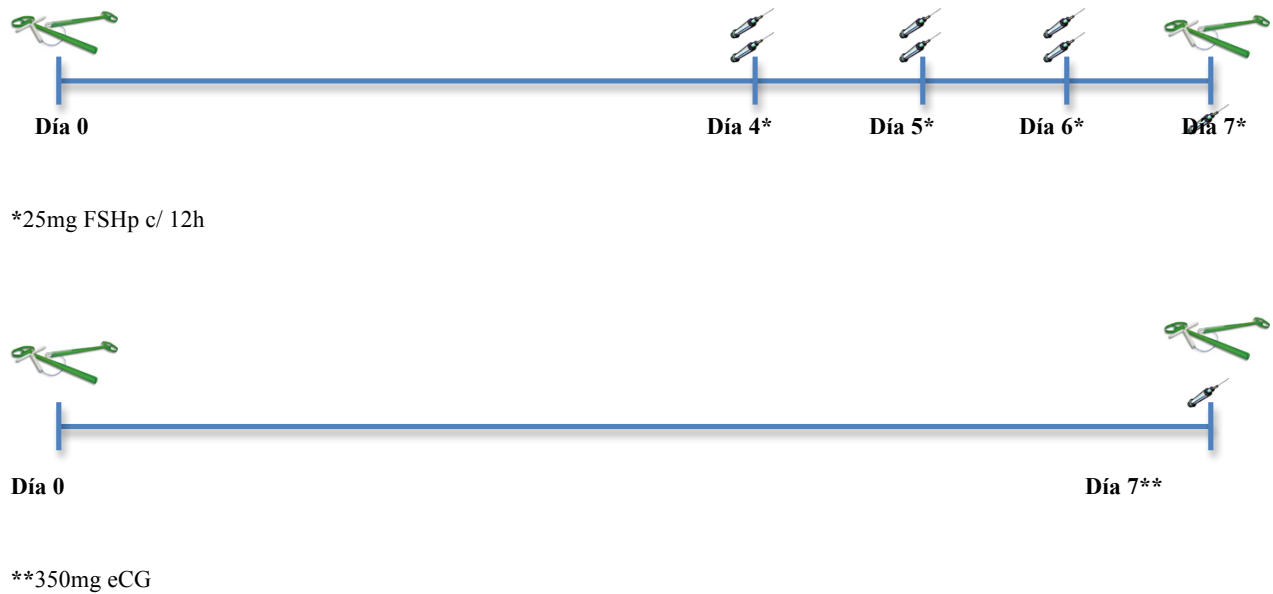
En la actualidad existen varios factores no bien esclarecidos, que controlan la foliculogénesis, el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la ovulación y la fertilización. Los avances que se logren en el entendimiento de sus funciones y sus interrelaciones, determinarán una mayor eficiencia de los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, reduciendo los costos e incrementando los beneficios de esta técnica (González- Bulnes et al. 2004).

#### **IV. 6. Sincronización del estro donante-receptora.**

La sincronización de los estros de las receptoras mediante tratamiento progestacional se realiza en forma conjunta con las hembras donantes. El objetivo es lograr que ambas presenten el mismo día del ciclo estral en el momento de la recuperación y siembra de embriones.

Los análogos sintéticos de la progesterona, el FGA (acetato de fluorogestona) y el MAP (acetato de medroxiprogesterona), son comúnmente empleados en esponjas intravaginales para los tratamientos de sincronización de celos. Se aplican durante 14 días en las cabras. En México, Australia y Nueva Zelanda es muy frecuente la utilización de progesterona vía vaginal, empleando el CIDR. La sincronización también se puede llevar a cabo mediante la colocación de

CIDR con una larga (14 días) o corta (7 días) duración con resultados similares y aceptables. Cuatro días antes de realizar el retiro del dispositivo se comienza el tratamiento de superovulación (25mg FSHp) con intervalos de 12h. En el caso de las receptoras, es recomendable la dosificación de 350mg de eCG al momento de retirar el dispositivo (Sanchez-Dávila et al. 2013).



*Fig. 3 Ejemplo de un cronograma para la sincronización de hembras donantes(superior)- receptoras (inferior) para el Noreste de México*

#### **IV. 7. Fecundación de la hembra donante**

La fecundación en las hembras donantes puede realizarse mediante servicio de monta controlada o mediante inseminación artificial (IA), con semen fresco o congelado. El servicio de monta controlada se realiza cada 12 horas, desde el comienzo del celo y hasta su finalización. En el caso de emplearse la IA, ya sea con semen fresco o congelado, se recomienda el empleo de la técnica laparoscópica, debido a que la deposición del semen en los cuernos uterinos y en

proximidad del sitio de fertilización, permite aumentar las tasas de fertilización, así como reducir las dosis de inseminación (Menchaca y Rubianes 2007).

#### **IV. 7.1 Dosis inseminantes**

Las siguientes son dosis de inseminación de referencia para la IA con semen fresco (en millones de espermatozoides):

- IA cervical: 800 (ovinos) - 400 a 600 (caprinos).
- IA laparoscópica: 80 (ovinos) - 100 (caprinos) (Brebion et al. 1992).

La dosis seminal empleada en la IA laparoscópica con semen congelado en ovinos (Wolff et al. 1994) y caprinos (Vallet y Baril, 1990) es de 100 millones de espermatozoides.

#### **IV. 7.2 Momento óptimo de realización de la IA**

En caprinos, se recomienda realizar la IA laparoscópica con semen fresco entre las 20 y 24 horas post inicio del celo (Vallet y Baril, 1990). Si se utiliza semen congelado, es conveniente realizar la IA a las 46-52 horas PREIP (Menchaca y Rubianes 2007).

#### **IV. 7.3 Tasa de fertilización**

La eficiencia de la fertilización en las hembras multiovoladas ha presentado resultados muy variables en función de la técnica de fertilización empleada, momento de inseminación y respuesta individual ovulatoria al tratamiento hormonal. La fertilización de los ovocitos se puede realizar mediante servicio natural, IA cervical o laparoscópica. Se debe tener en cuenta que mediante el servicio natural o la IA por vía cervical en las donantes de alta respuesta ovulatoria

(más de 10 a 12 ovulaciones) se obtiene una baja tasa de fertilidad, debido a la reducción del transporte espermático en el tracto reproductivo. Los programas de inseminación a tiempo fijo (IATF) por laparoscopia con semen congelado para los tratamientos de ovulación múltiple son muy riesgosos y sólo deben ser utilizados cuando se conoce la distribución de celos de la población en particular, para el régimen hormonal y estación en la cual se desea trabajar. La eficiencia de fertilización con el empleo de semen congelado a tiempo fijo ha presentado resultados variables. Sin embargo, se recomienda inicialmente realizar la inseminación laparoscópica, luego de detectado el celo. En esta investigación, se realizó la IA vía laparoscopia con semen congelado 51h post- retiro CIDR. En caprinos, se obtuvieron porcentajes de fertilización del 32% (IA cervical) y 65% (IA laparoscópica) con semen fresco (Menchaca y Rubianes 2007), y 70-75% con semen congelado por laparoscopia (Fieni et al. 1990).

La tasa de fecundación es muy dependiente del nivel de respuesta ovulatoria al tratamiento de estimulación. En las cabras Alpinas y Saanen, la fertilidad disminuye cuando la respuesta ovulatoria es elevada (>15 cuerpos lúteos, 49% vs. <15 cuerpos lúteos, 66%) (Baril et al. 1989). La fertilidad de la IA en las hembras multiovladas es menor respecto a la inseminación de animales testigo no tratados. La tasa de fecundación no se puede incrementar por medio de un mayor número de inseminaciones o elevando la concentración espermática de la dosis inseminante (Vallet et al. 1991; Brebion et al. 1992).

#### **IV. 8. Colecta de embriones**

La metodología empleada para la obtención de embriones consiste en inyectar un medio líquido para producir una corriente de arrastre (lavado o flushing) a través de los cuernos uterinos. Se utiliza un medio comercial en base a PBS (Solución Buffer Fosfato), al que se le debe adicionar un 10% de suero adulto bovino, ovino o caprino inactivado. Para la obtención de suero, se sangra en forma aséptica con material esterilizado. El suero se centrifuga a 2000 g durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación. Se filtra por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . La inactivación de la proteína complemento se realiza en baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. El suero filtrado inactivado se puede conservar durante un año a -20 °C.

En la presente investigación, el lavado se realizó en el 7mo día PRDP. Sin embargo, debido a que el desarrollo embrionario inicial en caprinos presenta un retraso de 12 a 24 horas, la colecta de embriones se recomienda en los días 8vo o 9no PRDP (Moore, 1980).

Las colectas embrionarias se realizan en los días mencionados debido a los siguientes fundamentos:

- Los embriones están en el tercio superior de los cuernos uterinos.
- Presentan la membrana pelúcida, necesaria como barrera sanitaria.
- La congelación se realiza en estado de mórula compacta o blastocisto.

<b>Días post retiro de esponjas</b>	<b>Caprinos</b>	<b>Ovinos</b>
7	Morula	Morula
8	Morula	Morula compacta Blastocito
9	Mórula compacta Blastocisto Blastocisto expandido	Blastocito expandido Blasticito fuera de la zona pelúcida
10	Blastocisto fuera de la zona pelúcida	Blasticito fuera de la zona pelúcida

*Tabla 1. Desarrollo embrionario comparativo entre ovejas y cabras en diferentes momentos después del retiro de las esponjas intravaginales (Adaptación de Moore, 1980).*

Las técnicas para la colecta de embriones en los pequeños rumiantes son:

#### 8.1 Técnica quirúrgica

#### 8.2 Técnica no quirúrgica

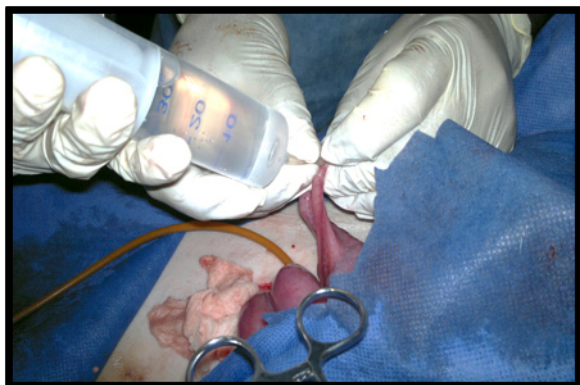
### **IV. 8.1 Técnica quirúrgica**

La hembra se ubica en un plano inclinado en una camilla (cabeza hacia abajo). Se rasura y se desinfecta el campo operatorio. Se realiza una laparotomía media de 5 a 7 cm, y a 3 cm por delante de la ubre. Antes de comenzar con la recuperación embrionaria se realiza una determinación de la respuesta ovulatoria (recuento del número de cuerpos lúteos), mediante ecografía o por observación laparoscópica. En base al número de estructuras colectadas se determina el porcentaje de recuperación embrionaria.

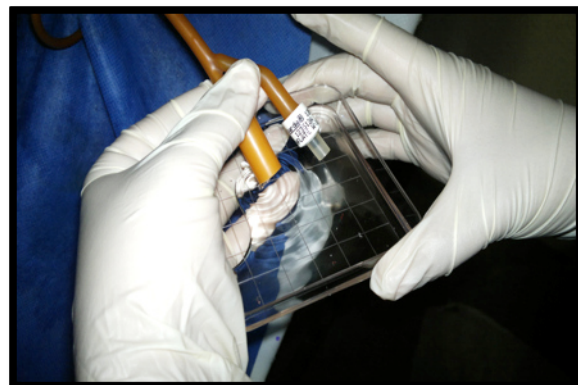
La recuperación embrionaria consiste en la colocación de una sonda Foley de dos vías (cal. 10 x 5cm). Se realiza una punción en la unión útero tubárica y se enhebra la sonda en el interior de la luz del cuerno uterino (1 cm), fijando la misma por medio de un clamp vascular o ligadura (Fig 4). Aproximadamente a un par de cm de la bifurcación de los cuernos uterinos, se realiza una segunda punción, para la inyección de 20 cc de PBS a 38 °C (Fig 5). De esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia la unión útero tubárica, donde está ubicada la sonda, y el medio de colecta es recuperado en una caja de Petri (Fig 6). Se procede de igual manera con el otro cuerno uterino.



*Fig 4. Punción en la unión útero tubárica con introducción de sonda foley de dos vías.*



*Fig 5. Segunda punción en oviducto para la aplicación de 20cc de PBS.*



*Fig 6. Colecta de embriones mediante arrastre en una caja petri.*

Finalizada la recuperación embrionaria, se realiza la sutura de los planos quirúrgicos y se administran antibióticos (3 días).

El medio recuperado en cajas de Petri cuadrículadas para proceder a la búsqueda de embriones bajo lupa (10X) en un estereoscopio.

En la primera recuperación embrionaria, la técnica quirúrgica permite alcanzar una eficiencia media del 60%. El inconveniente que presenta es la formación de adherencias post quirúrgicas que reducen la eficiencia en la obtención sucesiva de embriones. Se a observado que haciendo una correcta lubricación durante el tiempo de la cirugía se logra evitar de manera significativa las adherencias (Baril, et al. 1995).

#### **IV. 8.2 Técnica no quirúrgica**

La técnica no quirúrgica o por laparoscopia fue desarrollada por Mc Kelvey et al. (1986) en ovinos, y por Vallet et al. (1987) en caprinos. Se realizan tres punciones (con trócares) en la cavidad abdominal. La primera punción permite introducir el laparoscopio; la segunda, una sonda de tres vías (cada vía corresponde a: 1) entrada del PBS, 2) salida del PBS e 3) insuflación del balón); y la tercera, una pinza no traumática. Esta pinza permite la manipulación del tracto reproductivo, a fin de hacer avanzar la sonda por la luz uterina y fijar la unión útero tubárica durante el flujo del PBS. Esta técnica requiere un muy buen entrenamiento y su costo es elevado debido a la necesidad de disponer de un laparoscopio. Presenta una menor eficiencia en la recuperación de embriones (60%). La obstrucción de la sonda por coágulos o mucus representa a veces una gran dificultad; pero su ventaja es que disminuye las adherencias y por lo tanto no se

disminuye el porcentaje de recuperación embrionaria en intervenciones sucesivas. Vallet et al. (1987) obtuvieron tasas de recuperación del 59, 58 y 68% en caprinos.

El tiempo medio para realizar una recuperación de embriones es de aproximadamente 15 a 20 minutos (quirúrgica) y 20 a 30 minutos (por laparoscopia) por hembra.

Independientemente de la técnica de recuperación embrionaria utilizada, y si se desea contar con la seguridad de que las hembras donantes no queden preñadas por embriones no recuperados, se recomienda la administración de prostaglandinas PF2 alfa al final de las intervenciones (5 mg de Dinoprost trometamina).

#### **IV. 9. Búsqueda y clasificación de embriones.**

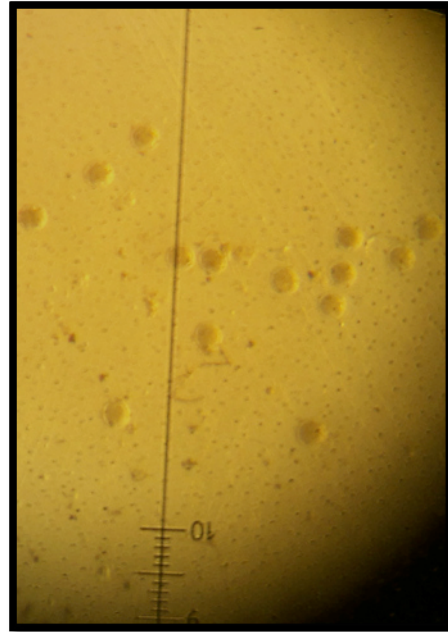
El medio de lavado recolectado es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realiza bajo lupa con platina térmica a 38 °C (Fig 7). Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micropipeta y colocados en una caja de Petri con medio de conservación enriquecido con suero al 20% a resguardo de la luz y a temperatura de laboratorio. Una vez finalizada la búsqueda, se procede a la clasificación de los embriones. De ser posible es importante utilizar campana y aire filtrado. Cabe recordar que se debe trabajar en condiciones estrictas de esterilidad.

La clasificación de los embriones se realiza en base a sus aspectos morfológicos y con 10 a 40x. Una micropipeta o una fina pipeta de vidrio permitirá mover los embriones, para poder observarlos desde distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad (Fig 8). El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera

hasta un máximo de 24 horas de retraso. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración.



*Fig 7. Búsqueda de embriones realizada en estereoscopio a 40x.*



*Fig 8. Blastocistos caprinos grado I y II.*

En algunos embriones, se puede observar desprendimiento parcial de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad. Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en la sobrevivencia embrionaria (Bari et al. 2003) cuando se transfieren embriones de calidad regular respecto a la calidad buena o excelente (Anexo 1). Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados o vitrificados en nitrógeno líquido.

La tasa de sobrevivencia embrionaria no es afectada por el día en que se realiza la colecta embrionaria (día 5 o 6 post estro). En los estadios embrionarios normales para los días correspondientes a su colecta (día 5, mórula; día 6, blastocisto) se presentan valores similares de sobrevivencia embrionaria ovina (74%). Sin embargo, blastocistos colectados en día 5 tienen una alta sobrevivencia respecto a mórulas retardadas colectadas en día 6 (Bari et al. 2003).

#### **IV. 10. Transferencia de embriones**

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la recuperación de los embriones y su siembra sea inmediato y no supere las 2 horas en el medio de conservación embrionario. Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo máximo entre descongelamiento y siembra se reduce a 20 o 30 minutos. El sitio habitual de siembra de los embriones es el cuerno ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo.

Los 2 métodos más utilizados en la siembra de embriones son el quirúrgico o no quirúrgico por laparoscopia (González et al. 1991). En ambos casos se procede a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino y en su tercio superior. Mediante una micropipeta, se deposita el embrión en la luz uterina (acondicionado en 10 µl de PBS).

Existe una técnica combinada en la cual se visualiza el cuerno uterino por laparoscopia, se realiza una pequeña incisión de 1 cm en la línea media abdominal, y mediante una pinza, se exterioriza el cuerno uterino para realizar la siembra embrionaria (Siembra semi-quirúrgica de embriones) (Fotos 9 y 10).

En las cabras lecheras, se ha determinado una tasa superior de sobrevivencia embrionaria cuando se realiza una siembra doble (Armstrong et al. 1983; Tervit et al. 1983). La tolerancia en

el tiempo de sincronización de estro entre donante y receptora es de  $\pm 1$  día. A mayor sincronización, mayor es la eficiencia de la transferencia (González- Bulnes et al. 2004).



*Fig 9. Busqueda del cuerno uterino para transferir embriones.*



*Fig 10. Siembra de embrión mediante técnica semi-quirúrgica.*

Cabe consignar que se ha mencionado el "efecto donante" como la variabilidad que se puede presentar en la tasa de sobrevivencia de embriones (0 a 78%) para una igual calidad embrionaria entre distintas madres (Heyman et al. 1987).

Es importante realizar un examen laparoscópico o ecografía de los ovarios de las receptoras, con el fin de asegurarse que se dispone de hembras con uno o dos cuerpos lúteos correspondientes al día 6 o 7 del ciclo estral. Asimismo se debe tener presente, al realizar la selección de las receptoras, que la sobrevivencia embrionaria está influenciada por el número de cuerpos lúteos. Armstrong et al. (1983) obtuvieron valores del 52, 63 y 75% de sobrevivencia embrionaria con recipientes con 1, 2 y 3 cuerpos lúteos. La técnica de laparoscopia facilita la realización de una buena clasificación de las receptoras por su respuesta ovulatoria.

En ciertas oportunidades y en especial cuando se trata de cabras, se presentan receptoras con folículos quísticos o cuerpos lúteos regresados. Estas hembras no deben ser utilizadas como receptoras.

En referencia a la siembra embrionaria por vía cervical, la misma es de muy baja utilización debido a la dificultad que presenta el paso del cérvix (Lewalski et al. 1991; Flores-Foxworth et al. 1992).

Es muy importante considerar el tiempo entre la recuperación, búsqueda y clasificación hasta la siembra de los embriones. Debido al trabajo que implica la realización de un programa de TE, debe estar muy bien organizado y coordinado para obtener óptimos resultados.

#### **IV. 11. Conservación de embriones**

##### **IV. 11.1 Conservación por enfriamiento a 5 °C**

La posibilidad de conservación de embriones facilita la difusión de material de alto valor genético a nivel local o regional. Para un transporte a corta distancia, la refrigeración a 5 °C permite su conservación por 24 horas, en medio de cultivo (Ovum Culture Medium). La velocidad de enfriamiento se realiza a razón de 1 °C por minuto.

El calentamiento de los embriones se realiza a 0.6 °C por minuto o bien se colocan directamente a 37 °C en PBS enriquecido. Se examinan a 10x, se seleccionan y se siembran inmediatamente. El porcentaje de sobrevivencia varía entre el 35 al 48% (Bilton y Moore, 1976; Driancourt et al. 1988).

#### **IV. 11.2 Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido**

En 1976 se publicaron los primeros trabajos en caprinos (Bilton y Moore, 1976) y en ovinos (Willadsen et al. 1976).

Al igual que el semen de estas especies, es posible realizar el congelamiento de sus embriones y mantenerlos en nitrógeno líquido por períodos prolongados. Este método de conservación ha permitido la comercialización internacional y por ende la difusión a nivel mundial del material genético.

El procedimiento consiste en someter las células embrionarias a la incorporación de medios crioprotectores. Estos compuestos (polialcoholes) son capaces de penetrar en las células por difusión simple y su función es disminuir la formación de los cristales de agua por medio del descenso del punto de congelación. El medio que contiene los embriones (extracelular) es más rico en agua que el medio intracelular. Por lo tanto, al comienzo del congelamiento, la formación de los primeros cristales de hielo se produce en el medio extracelular, generando la salida de agua intracelular hacia el exterior, por difusión, y disminuyendo la formación de hielo intracelular. Los tiempos y la velocidad del proceso de congelamiento determinan la futura viabilidad del embrión.

Se ha determinado la mayor eficiencia de sobrevivencia embrionaria post descongelamiento cuando se emplea etilenglicol, respecto al glicerol o dimetilsulfósido (DMSO). Como valores de referencia, es posible obtener porcentajes de preñez entre el 39 al 55% (Le Gal et al. 1993)

La congelación se realiza con embriones de calidad excelente o muy buena, en estado de mórula compacta o blastocisto expandido (día 6to o 7mo post estro). El estadio de blastocisto es

más resistente al congelamiento, debido a que una parte de las células puede sufrir severos daños, pero sin que se limite su futuro desarrollo.

La selección de los embriones antes de su congelamiento es de vital importancia, debido a que su estado determina sus posibilidades de sobrevivir a la descongelación. Los blastocistos sin membrana pelúcida pueden ser congelados sin afectarse su sobrevivencia. Las limitantes en este caso son de tipo sanitario.

La conservación de embriones en nitrógeno líquido puede llevarse a cabo mediante la técnica de congelamiento o vitrificación.

#### **IV. 11.3 Técnica de descongelamiento**

El descongelamiento de los embriones se realiza en baño termostático de agua a 37 °C durante 30 segundos. Posteriormente, se realiza la extracción progresiva del crioprotector en etapas sucesivas (5 a 10 minutos cada una), sumergiendo los embriones en placas de Petri con concentraciones decrecientes de etilenglicol (1 M, 0.5 M) en base a PBS + suero 20%, y luego se los coloca en una placa con PBS + suero. Seguidamente se realiza una evaluación de las características morfológicas. En este examen se lleva a cabo una selección de los embriones debido a los daños que se presentan por el proceso de congelamiento/descongelamiento. Como valor de referencia, se acepta entre un 10 y un 30% de embriones dañados.

Otra técnica de remoción del crioprotector al descongelamiento, consiste en el empleo de sucrosa. Esta sustancia, debido a su alto peso molecular, no puede pasar al interior de los embriones y genera, por lo tanto, un medio hiperosmótico extracelular que ejerce una función de difusión masiva del crioprotector hacia el exterior de los embriones. Asimismo produce retención

de agua en el medio extracelular impidiendo que ésta ingrese a mayor velocidad que la salida del crioprotector. En la práctica, los embriones descongelados se colocan en una solución de sucrosa 0.25-0.5 M en PBS + suero durante 5 a 10 minutos, y luego se realizan 3 pasajes sucesivos de 5 a 10 minutos en PBS + suero.

Se recomienda que ante la compra de embriones se solicite al laboratorio que realizó el congelamiento de embriones, el envío del protocolo de congelamiento y de descongelamiento y el certificado sanitario correspondiente. En caprinos, se ha observado una mayor sobrevivencia de los embriones en estado de blastocisto expandido o sin pelúcida (Chemineau et al. 1986; Li et al. 1990). El inconveniente de realizar el congelamiento en ese estadio embrionario es la restricción sanitaria para los embriones sin membrana pelúcida.

#### **IV. 11.4 Técnica de vitrificación**

Otra técnica de conservación a bajas temperaturas es la vitrificación. El principio físico se basa en someter a los embriones a una alta concentración de crioprotector en muy bajos volúmenes de solución, de manera de evitar la formación de cristales de hielo.

El procedimiento para la vitrificación se realiza a temperatura de laboratorio (25 °C), en tres pasos sucesivos de inmersión de los embriones en soluciones crecientes de glicerol y etilenglicol, en base de PBS con 20% de suero fetal bovino (Martínez et al. 2006). Brevemente: 1) Glicerol 10% durante 5 minutos, 2) Glicerol 10% + Etilenglicol 20% durante 5 minutos y 3) Glicerol 25% + Etilenglicol 25% durante 30 segundos. A continuación los embriones son aspirados en tips con 1 ml de medio (2 embriones/tip) y sumergidos en criotubos con nitrógeno líquido (Gibbons et al. 2008 ; 2009).

La desvitrificación se realiza “al aire” a 37 oC durante 6 segundos. Inmediatamente los embriones son colocados durante 5 minutos en una solución de glicerol 12.5% + etilenglicol 12.5% + sucrosa 0.5 M en base de PBS con 20% de suero fetal bovino. Posteriormente se colocan a temperatura ambiente en dos soluciones de 0.5 M y 0.25 M de sucrosa (5 minutos por solución). Por último, los embriones son lavados 2 veces en PBS + suero (2.5 minutos por solución) (Gibbons et al. 2008). En caprinos, mediante la vitrificación de blastocistos, se han obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria entre el 64 al 70% y un porcentaje de preñez entre el 64 al 86% (2 embriones/receptora) (Traldi et al. 2009; Gibbons et al. 2010). Esta técnica no es recomendable para vitrificar mórulas caprinas debido a su baja eficiencia reproductiva.

#### **IV. 12. Eficiencia de la transferencia de embriones**

Traldi et al. 2009 y Gibbons et al. 2010; han presentado valores medios de referencia de la eficiencia de las diferentes etapas de la ovulación múltiple y TE (tratamiento convencional FSH):

- *Número de cuerpos lúteos por hembra donante: 14.*
- *Número de embriones + ovocitos recuperados por vía quirúrgica: 65%.*
- *Tasa de fertilización por IA laparoscópica: 75%.*
- *Tasa de selección de embriones para congelamiento: 85%.*
- *Tasa de selección de embriones post descongelamiento: 80%.*
- *Porcentaje de preñez (Siembra directa): 70%.*

- *Número de crías nacidas por hembra donante tratadas al azar:* TE inmediata: 5 cabritos/cabra donante.

-*TE congelados:* 2 a 3.6 cabritos/cabra donante.

#### **IV. 13. Ventaja sanitaria de la TE.**

A pesar de las medidas sanitarias actualmente existentes, el riesgo de introducir enfermedades a través de la incorporación de animales vivos, es muy alto. La TE reduce considerablemente este riesgo, debido a la barrera natural que presentan los embriones contra bacterias y virus (Stringfellow et al. 1991). Se ha demostrado la posibilidad de obtener embriones sin riesgo sanitario de madres infectadas con el virus de la Lengua azul (BTV). Por lo tanto es posible recuperar el material genético de un plantel infectado.

La inmunidad pasiva que aporta la madre receptora confiere al feto una sanidad invaluable, más aún cuando los embriones son exportados a países con enfermedades exóticas para el país de origen. Los costos de cuarentenas, de transporte y las dificultades de adaptación de los animales (condiciones climáticas, alimentarias y sanitarias), brinda a la TE una multiplicidad de beneficios comerciales adicionales.

La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) tiene como objetivo el intercambio y divulgación de los adelantos científicos en la TE y las tecnologías afines. Su comité de importaciones y exportaciones realiza la difusión de información técnica y científica para la formulación de las regulaciones sanitarias en el comercio de embriones. La IETS ha realizado una importante publicación de referencia sobre las normas generales de la TE (International Embryo Transfer Society, 1990).

#### **IV. 14. Mecanismos de acción de la rBST.**

El mecanismo por el cual la rBST mejora el porcentaje de preñez está relacionado con los efectos directos e indirectos de la somatotropina en los procesos reproductivos. Después de la inyección subcutánea de 500 mg de rBST, los niveles de IGF-I aumentan y se mantienen elevados durante 14 días; la repetición de la inyección cada 14 días mantiene niveles de IGF-I altos y constantes (Jousan et al. 2007). Habría dos periodos o ventanas fisiológicas en las cuales la rBST y el IGF-I ejercen su efecto y corresponden a las etapas cuando ocurre la mayoría de las pérdidas embrionarias. La primera ventana está relacionada con la fertilización y el desarrollo del embrión durante los primeros 7 días. La adición in vitro de rBST al medio de cultivo favorece la maduración del ovocito y aumenta la proporción de embriones que se dividen. La rBST puede actuar a través de las células del cumulus o directamente en el ovocito porque hay receptor en ambas células (Izadyar et al., 2000). La administración in vivo de rBST al momento del servicio aumenta el porcentaje de ovocitos fertilizados y la proporción de embriones transferibles (Moreira et al., 2002a; Gutiérrez et al., 2005). El embrión bovino tiene receptores para la somatotropina e IGF-I (Izadyar et al., 2000); in vitro, la adición de estas hormonas al medio incrementa la proporción de embriones que llega a la etapa de blastocisto (Moreira et al., 2002b). Además, los embriones producidos in vitro con la adición de IGF-I producen mayores porcentajes de concepción después de su transferencia (Block y Hansen, 2007). La segunda ventana fisiológica corresponde a los días cuando ocurre el reconocimiento materno de la gestación (16 a 19 días después de la inseminación). Hay receptores para rBST e IGF-I en las glándulas endometriales (Pershing et al., 2002); así, la administración de rBST puede modificar el ambiente uterino, lo cual favorecería las condiciones del desarrollo embrionario y con ello su capacidad para producir Interferón-tau (Spencer et al., 2004). Además, la rBST disminuye la

sensibilidad del mecanismo que desencadena la secreción de la PGF2a, mediante la disminución de la actividad de la enzima ciclooxigenasa en las células del endometrio (Badinga et al., 2002). Moreira et al. (2000) y Morales-Roura et al. (2001) sugieren que la rBST también podría favorecer la supervivencia embrionaria a través del mejoramiento de la función del cuerpo lúteo. Una de las causas de la muerte embrionaria se relaciona con el retraso del desarrollo embrionario, lo que reduce la capacidad del embrión para producir Interferón-tau, por lo cual el embrión no puede suprimir la síntesis de la PGF2a. El retraso del desarrollo embrionario se puede deber a las concentraciones séricas bajas de progesterona que padecen las vacas lecheras, porque el cuerpo lúteo produce menos progesterona y las hormonas esteroides se catabolizan más rápido (Vasconcelos et al., 2003).

Las células grandes del cuerpo lúteo tienen receptores para la somatotropina y la adición in vitro de IGF-I a cultivos de células del cuerpo lúteo aumenta la producción de progesterona (Spicer et al., 1993; Gong et al., 1994). Además, los bovinos (Lucy et al., 1994) y ovinos (Montero et al., 2011; Zarco et al., 2012) tratados con rBST tienen concentraciones más altas de progesterona. Pero según Hernández Cerón et al. (2000) y Gutierrez et al. (2005), las concentraciones de progesterona son similares entre las vacas tratadas con rBST y las testigo. Así, la función de la progesterona como parte del mecanismo de acción de la rBST en el mejoramiento del porcentaje de preñez es contradictorio todavía.

El tratamiento con rBST puede evitar el efecto de algunos factores tóxicos para los embriones presentes en el ambiente uterino. Así, el IGF-I bloquea la inducción de apoptosis causada por el estrés calórico y mitiga el efecto negativo del etanol en el desarrollo embrionario, por lo que la rBST actuaría como un factor de sobrevivencia embrionaria ante factores uterinos embriotóxicos (Jousan y Hansen, 2004).

#### **IV. 15. Uso de la rBST en caprinos y ovinos.**

En ovejas y en cabras, la inyección de rBST aumenta las concentraciones séricas de IGF-I y la producción de leche, similar a lo observado en bovinos (Carrillo et al., 2007; Montero et al., 2011). La eficiencia reproductiva en las ovejas tratadas con inyecciones repetidas de rbST con fines productivos, es similar a la de ovejas no tratadas (Brozos et al., 1999).

La prolificidad en los pequeños rumiantes está determinada por el número de folículos que ovulan, la tasa de fertilización y la sobrevivencia embrionaria. La tasa de ovulación puede incrementarse por un aumento del número de folículos dependientes de gonadotropinas. Así, en ovejas, la sobrealimentación energética (flushing) incrementó la tasa de ovulación mediante el aumento de folículos sensibles a la FSH (Scaramuzzi et al., 2006). En las ovejas tratadas con rBST, aunque esta hormona favorece el desarrollo folicular, no aumenta la tasa de ovulación (Joyce et al., 1998).

En ovejas superovuladas aumentó la proporción de embriones transferibles en ovejas tratadas con somatotropina porcina (Folch et al., 2001). Además, ovejas fértiles tratadas con rBST el día del estro tuvieron embriones que alcanzaron etapas más avanzadas de desarrollo, comparadas con las ovejas testigo; pero, el mismo tratamiento no tuvo efecto en ovejas subfértiles (Mejía et al., 2012).

Según Carrillo et al. (2007), el tratamiento con rBST 5 días antes de retirar la esponja con FGA aumenta la prolificidad en ovejas (1.64 vs 1.25), lo que puede deberse a los efectos de la rBST en el desarrollo embrionario y no en la tasa de ovulación, la cual no es afectada por la somatotropina en ovejas (Joyce et al., 1998; Scaramuzzi et al., 1993). Montero et al. (2011) señalan que el porcentaje de óvulos fertilizados ( $85.7 \pm 0.03$  vs  $62.0 \pm 0.04$ ), la proporción de

embriones que alcanzó la etapa de blastocisto ( $68.7 \pm 0.05$  vs  $42.5 \pm 0.05$ ) y el número de células de los blastocistos ( $92 \pm 6$  vs  $75 \pm 6$ ), fue mayor en las ovejas tratadas con rBST 5 días antes de retirar la esponja de FGA, respecto a las testigo. Esto coincide con un aumento en las concentraciones séricas de IGF-I e insulina. Estos resultados pueden explicar en parte un incremento de la prolificidad en ovejas que recibieron rBST 5 días antes de retirar el progestágeno (Carrillo et al. 2007). Así, los niveles altos de rBST, IGF-I e insulina pueden favorecer el porcentaje de fertilización y la sobrevivencia embrionaria, y esto se reflejó en un aumento de la prolificidad.

En cabras en anestro, la inyección de rBST 5 días antes de retirar el progestágeno mejoró la respuesta estral y la tasa de gestación (60.3 vs 33.9 %). El resultado en la respuesta estral (73.5 vs 51.7 %) es novedoso y puede ser provocado por el efecto del IGF-I y la insulina en el desarrollo folicular. Además, en las cabras las concentraciones de IGF-I e insulina aumentaron significativamente 1 día después de la inyección de rBST y permanecieron altas hasta el día 12 postratamiento (Martínez et al., 2011).

## **V. Materiales y Métodos**

**Primer etapa:** Se utilizaron 15 cabras de las razas Alpina y Saanen, pertenecientes al Rancho "Cerro de Agua" (Galeana, N.L.).

**Segunda etapa:** Se utilizaron 17 cabras de diferentes razas (Nubio n= 9, Saanen n= 1 y Alpina n= 7), provenientes del Rancho "Mary" (Higuera, N.L.).

### **V. 1. Localización del experimento**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el km. 17.5 de la carretera Zuazua-Marín en Marín, Nuevo León. La situación geográfica del rancho corresponde a los 25° 54' latitud Norte y 99° 58' longitud Oeste, a una altitud de 451 msnm. El clima es extremo, la temperatura a la sombra en el verano de 18°C llegando hasta 43°C y en el invierno de 10° C hasta -2°C. La temperatura media anual es de 25° C (INFDN, 2005). Mientras que la ubicación geográfica de la FAUANL corresponde a los 25° 53' latitud Norte y 100° 02' longitud, a una altura de 410 msnm (INEGI, 1983).

### **V. 2. Manejo de los animales**

Se seleccionaron como hembras donadoras, aquellos animales que hayan presentado parto en la época reproductiva anterior, presentando un descanso posparto de por lo menos 5 meses antes de iniciar el tratamiento superovulatorio, así mismo se eligieron hembras que no hayan sido tratadas previamente con FSH y que muestren celo regular cada 21 días, además de estar libres de cualquier anomalía en su tracto reproductivo. En tanto las hembras receptoras, se eligieron de

acuerdo a su conformación física, sin deberán presentar defectos físicos y deberán contar con buena conformación pélvica, tener más de 60 días posparto; además de no contar con historial de abortos y presentar ciclos estrales regulares de 21 días.

### **V. 2.1. Condición corporal (CC)**

La condición corporal fue considerada como un factor importante, ya que será monitoreada durante el transcurso del trabajo como un indicador del estado de salud del animal. Se utilizará la clasificación descrita por Arranz (2002).

### **V. 2.2. Manejo sanitario**

Las hembras donadoras y receptoras se sometieron 30 días antes del tratamiento hormonal a un manejo sanitario, que consistió en la aplicación de vitaminas A, D y E a razón de 1 ml /animal con una concentración de 500 000, 75 000 y 500 U.I. respectivamente. Así mismo, se desparasitará internamente con Closantel oral a una dosis de 1 ml por cada 20 Kg. de peso vivo.

### **V. 3. Sincronización donadora/receptora**

La sincronización de estros se llevó a cabo mediante la inserción de dispositivos con 0.3 g de progesterona (CIDR®, Pfizer, NY, USA) durante 7 días, paralelo a la aplicación única de 5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Pfizer, NY, USA). Las hembras receptoras recibieron 350 UI de gonadotropina corionica equina (eCG) al momento del retiro del CIDR®.

#### **V. 4. Tratamiento superovulatorio y fecundación**

El tratamiento superovulatorio consistió para todos los tratamientos en la administración de 8 dosis iguales de 25 mg de FSHp (Folltropin-V®, Bioinche, Belleville, Canada) con 12 horas de intervalo (8am- 8pm). La octava inyección de FSHp sólo se administró en aquellas hembras que 24 horas después de retirado el dispositivo, aun no presentaban síntomas de estro. Las cabras fueron asignadas en 3 tratamientos, haciendo un bloqueo mediante condición corporal y peso, esto para tener grupos homogéneos y así evitar alguna alteración de resultados, los animales tratados fueron los siguientes:

- ❖ **T0:** 11 cabras sin la aplicación de rBST (Boostin-S®, Intervet, Mexico) (grupo control),
- ❖ **T1:** 10 cabras a las que se les aplicaron 100 mg de rBST
- ❖ **T2:** 11 cabras con la aplicación de 200 mg de rBST.

En los tratamientos 1 y 2, la administración de rBST se realizó vía subcutánea e inmediatamente después de haber detectado el estro.

#### **V. 5. Detección de estros y fecundación**

La detección de estros se comenzó a partir de la remoción de los dispositivos, realizándose en forma continua y se dio por concluida 72h posteriores al retiro del dispositivo. Para la detección de estros, se utilizó un macho vasectomizado. Las cabras se inseminaron vía Laparoscopia a tiempo fijo, 51h en promedio después del retiro del CIDR®.

## **V. 6. Recolección, búsqueda, clasificación y transferencia de embriones**

La recolección de embriones se realizó por la técnica de Laparotomía al 7º día retirado el dispositivo, utilizando la técnica quirúrgica descrita anteriormente. Una vez recolectado el lavado uterino, se comenzó la búsqueda y clasificación de los embriones en base al criterio del Manual del IETS (International Embryo Transfer Society). Se utilizó un microscopio binocular marca Carl Zeiss estereo con videocámara y monitor marca Sony. Los embriones de calidad excelente y buena se transfirieron en fresco mediante la técnica semi-quirurgica (descrita anteriormente).

## **V. 7. Diseño experimental**

Las cabras fueron asignadas con bloqueo de CC y PV en tres tratamientos, donde las variables a evaluar fueron: porcentaje de celos, intervalo retiro-estro (IRE), número de cuerpos lúteos (CL), número de embriones recolectados (ER), número de embriones transferibles (ET). Las variables fueron analizadas por medio de un análisis de varianza, utilizando el Statistical Package for Social Sciencies (IBM SPSS Release 18. SPSS Inc., Chicago, IL, USA), a través de un modelo de Bloques Divididos, donde se determinó el efecto del tratamiento.

## VI. Resultados y Discusión

Los resultados de la primer etapa se presentan en la tabla 2, donde se puede observar que para evitar variaciones en cuanto al efecto del PV y CC, se logro estandarizarlos.

**Tabla 2.** Resultados del efecto de la rBST en cabras donadoras en época de anestro estacional. (medias  $\pm$  EE).

VARIABLE	CONTROL	100 mg rbST	200 mg rbST
<b>N</b>	6	4	5
<b>PV(kg)</b>	48.9	54.3	47.0
<b>CC</b>	2.8	2.8	2.9
<b>%ESTROS</b>	83.3	100.0	100.0
<b>I.R.E.(h)</b>	28.8 $\pm$ 0.9	28.9 $\pm$ 2.3	27.4 $\pm$ 1.0
<b>I.R.S.(h)</b>	51.3 $\pm$ 0.1	51.7 $\pm$ 0.7	51.1 $\pm$ 0.1
<b>NCL</b>	3.2 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>
<b>ER</b>	2.5 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>	7.0 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>
<b>%ER</b>	100.0 <sup>b</sup>	83.3 <sup>b</sup>	63.6 <sup>a</sup>
<b>MORULA</b>	3.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>
<b>BLASTOCISTO</b>	0.0 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	6.0 <sup>b</sup>
<b>%ET</b>	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>

*a,b = Valores con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (P < 0,05).*

*PV= Peso vivo; CC= condición corporal; I.R.E= intervalo retiro-estro; I.R.S= intervalo retiro-servicio; NCL= número de cuerpos lúteos/animal; ER= embriones recolectados/animal; %ER= porcentaje de embriones recolectados; %ET= porcentaje de embriones transferibles.*

El porcentaje de estros fue menor en el grupo control 83.33% (5/6) comparado con el grupo de 100mg y 200mg de rbST, en los cuales se obtuvo el 100% de estros (4/4 y 5/5 respectivamente). Estos resultados fueron superiores a los reportados por Rivas et al (2010), donde se obtuvo un 50 % de estros, pero con una condición corporal más baja (1.6). Pero concuerda con lo reportado por Meza et. al. (2008), donde observaron que el nivel nutricional afecta los procesos involucrados en el desarrollo folicular y tasa ovulatoria de los rumiantes, a través de cambios en PV y CC. Para el IRE, todos los grupos se mostraron homogéneamente; sin embargo, últimamente se han realizado investigaciones con protocolos cortos de sincronización,

donde se han obtenido diferentes IRE, el cual va a depender del protocolo a utilizar, por ejemplo, Menchaca et al (2007) encontraron valores de IRE de 30.4 32.5, 33.1 para eCG y Benzoato de estradiol respectivamente; estos valores fueron mayores a los observados en el presente estudio, donde el IRE mayor fue de  $28.86 \pm 2.27$  h. La inseminación artificial se llevó a cabo a tiempo fijo, el grupo que se IA a un tiempo menor ( $51.1 \pm 0.1$  h) fue el de 200mg rBST y el de mayor tiempo fue el de 100mg rBST ( $51.7 \pm 0.7$  h). La recomendación para la IATF mediante laparoscopia, es de 48 a 54h después del retiro de la fuente de progestágeno, obteniendo índices de preñez de 49.4 a 63.7% (Menchaca y Rubianes, 2007). En este estudio, la IATF no fue mayor a las 52h para ningún de los grupos, ya que estudios recientes, demuestran que la ovulación ocurre a las 56-58h en promedio después de haber retirado la fuente de progesterona (Menchaca et. al. 2007, Fatet et. al. 2011), dándole tiempo suficiente para que se lleve a cabo la capacitación espermática y fecundación.

El NCL no mostró diferencia significativa entre los distintos tratamientos, sin embargo, se observa que presentan un efecto positivo, conforme la dosis de rBST se incremento. Estos valores fueron menores a los obtenidos en ovejas, en donde se obtuvo hasta 4.5 mas de NCL en las ovejas que se les suministro rBST en comparación del testigo (Zarco et al. 2011) y los reportados por Montero-Pardo et al (2011), pero ambos estudios concuerdan que el uso de la rBST aumenta el NCL.

Las variables en las que se observó una diferencia significativa fueron para el ER y % ER. La cantidad de ER se incremento, conforme la dosis de rBST se incremento, dando como resultado para el grupo control un total de  $2.50 \pm 2.12$ ,  $5.00 \pm 3.54$  para el tratamiento de 100mg de rBST y  $7.00 \pm 4.95$  embriones recolectados para el grupo de 200mg de rBST. Estos resultados concuerdan a los reportados por Montero-Pardo et al. (2011), Zarco et al. (2011) y Navarrete et

al. (2008). Esto se puede deber a la aceleración del desarrollo embrionario dado por el efecto de la rBST, en este trabajo se puede observar que en el grupo control se obtuvieron solamente mórulas, sin embargo; los animales tratados con rBST se observó la presencia de una mayor cantidad de blastocitos. Para embriones transferibles fue del 100 por ciento para todos los grupos; se observó una uniformidad de la calidad en los embriones obtenidos de los grupos de 100 y 200mg de rBST, esto pudiera estar relacionado con la interacción de la disminución de las secreciones de IFNT reportado por Zarco et al. (2011) donde mencionan que al suministrar la rBST al momento del estro, hay una reprogramación de la expresión génica del IFNT disminuyendo sus secreciones, dando como resultado una mayor proporción de embriones en una etapa avanzada de desarrollo al 6 día.

En cuanto a la segunda etapa, los resultados no fueron favorables para poder evaluar el efecto de la rBST ya que las cabras no respondieron al tratamiento de superovulación, los resultados observados se describen a continuación (Tabla 3)

**Tabla 3.** Resultados del efecto de la rBST en cabras donadoras al final de la época de anestro estacional (medias  $\pm$  EE).

TRAT	CONTROL	100 mg rbST	200 mg rbST
<b>n</b>	6	5	6
<b>PV(kg)</b>	41.5	43.3	42.4
<b>CC</b>	2.7	2.8	2.7
<b>%ESTROS</b>	100.0 (6/6)	60.0 (3/5)	83.3 (5/6)
<b>I.R.E.(h)</b>	23.3 $\pm$ 6.2	27.7 $\pm$ 6.0	25.4 $\pm$ 4.0
<b>NCL</b>	1.5 $\pm$ 1.0a	1.2 $\pm$ 1.3a	3.0 $\pm$ 0.7a
<b>NF</b>	0.8 $\pm$ 1.3a	1.0 $\pm$ 1.4a	0.7 $\pm$ 1.3a

*a,b = Valores con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (P < 0,05).*

*PV= Peso vivo; CC= condición corporal; I.R.E= intervalo retiro-estro; NCL= número de cuerpos lúteos/donante; NF= número de folículos/donante.*

La CC fue menor a 3.0 para todos los tratamientos, en investigaciones recientes han demostrado la importancia de la CC y el efecto de la alimentación en la reproducción y sobre todo en programas MOET (Holtz 2005, Scaramuzzi et al. 2006, Carneiro et al. 2011, Lehloenya 2013, Nunes y Salgueiro 2011). Es bien sabido que el nivel nutricional afecta los procesos involucrados en el desarrollo folicular y tasa ovulatoria de los rumiantes, particularmente a través de cambios en peso vivo (PV) y condición corporal (CC) y la influencia de la nutrición en la función ovárica se clasifica como: 1) De largo plazo o efecto estático, en el cual hembras con mayores PV lograrán mayores tasas ovulatorias (Meza–Herrera et al., 2004; Scaramuzzi et al., 2006; Meza–Herrera et al., 2007); 2) de mediano plazo o efecto dinámico, donde aumentos en el PV o CC en semanas previas y durante el empadre promoverán mayor eficiencia ovárica, medida como la cantidad total de folículos y cuerpos lúteos presentes en el ovario (Meza–Herrera et al., 2004 y 2008); 3) de corto plazo o efecto agudo, donde un suplemento estratégico de proteína o energía puede afectar positivamente la función reproductiva sin cambios en el PV o la CC (Scaramuzzi et al., 2006). Dichos efectos nutricionales son mediados por cambios en los niveles de hormonas metabólicas y de la superfamilia de factores de crecimiento (Meza–Herrera et al., 2006). Las concentraciones séricas de la hormona del crecimiento (GH) fluctúan en respuesta al estado nutricional, pudiendo deprimir la síntesis y secreción de gonadotropinas (FSH y LH) y afectar la eficiencia reproductiva (Scaramuzzi et al., 2006). Según lo descrito, esta puede ser la razón del por que nuestros resultados fueron negativos en esta etapa. Tanto el % estros y el IRE en estos resultados fue variado, observando valores de desviación estandar elevados lo cual puede estar relacionado a una menor actividad ovárica, paralelo a disminuciones en los niveles séricos de IGF-I y en consecuencia un bloqueo en las hormonas gonadotropicas inhibiendo el éxito del

tratamiento superovulatorio (Meza-Herrera et al. 2009). Sin embargo; podemos observar un comportamiento favorable para los tratamientos de 100 y 200mg de rBST, observando un claro incremento de NCL al aumentar la dosis, los cuales pueden estar ligados al aumento de IGF-I y disminuciones del INFT, tanto IGF-I como el INFT (bajas concentraciones) ejercen un efecto estimulador en la proliferación y mitogénesis de células tecaes y de la granulosa, favoreciendo la formación de folículos preovulatorios (Davidson et al., 2002). Los IGF-I también son potentes estimuladores de la secreción folicular de esteroides y ejercen un efecto autocrino que potencia la acción de FSH en las células de la granulosa; en las células de la teca su efecto es paracrino y actúa de manera sinérgica con LH (Scaramuzzi et al., 2006), teniendo como resultado final una mayor respuesta en la tasa de ovulación. Lo anterior describe el mecanismo de interacción positiva de la rBST en los resultados observados.

## **VII. Conclusión**

Después de los resultados obtenidos, se concluye que la rBST tiene un efecto positivo en la cantidad y calidad de embriones obtenidos en programas de superovulación en cabras, considerando importante el tomar en cuenta el estado nutricional, antes, durante y después de un programa MOET para obtener resultados favorables.

## VIII .Bibliografía

- Alberio R., Iovanitti B., Vívoli, C. 1993. Superovulación de ovejas Merino Australiano por medio de FSH ovina o porcina. Revista Argentina De Producción Animal. 13 supl. 1: 59 .
- Ali, A. 2006. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. Small Ruminant Research. 72: 33-37.
- Armstrong, D.T., Pfitzner, A.P., Warnes, G.M., Seamark, R.F. 1983. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats. Journal of Reproduction and Fertility. 67: 403-410.
- Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Seamark RF. 1983. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats. Journal Reproduction and Fertility. 67: 403-410.
- Arranz, L.O. 2002. Guía práctica de ganado ovino de leche. INEA-EXCMA. España. p.34.
- Badinga L, A. Guzeloglu, and W. W. Thatcher. 2002. Bovine somatotropin attenuates phorbol ester-induced prostaglan- din F2 $\alpha$  production in bovine endometrial cells. Journal of Dairy Science, 85: 537-542.
- Baldassarre, H. 2007. Assisted reproduction in goats: artificial insemination to cloning. Revista Brasileña de Reproducción Animal. 31:274-282.
- Bari F, Khalidb M, Haresign W. 2003. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. Theriogenology Volume 59: 1265-1275.
- Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC. 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. Zuchthyg. 24: 101-115.

- Baril G, Remmy B, Leboeuf B, Vallet JC, Beckers JF, Saumande J. 1992. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. 8th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 126 (abstr.).
- Baril G, Vallet JC. 1990a. Effect of seasons on embryo production in dairy goat hand mated or cervically inseminated after superovulated treatment. 6th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 118 (abstr.).
- Baril G, Vallet JC. 1990b. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. *Theriogenology* 34: 303-311.
- Baril, G., Brebion, P., Chesné, P. 1995. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. FAO. Italia. 19-105.
- Baril, G., Chemineau, P., Cognié, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P., Vallet, J.C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Et. FAO Ed.de FAO: Production et santé animales. FAO Ed., No. 83.
- Bilton R J, Moore NW. 1976. In Vitro culture, storage and transfer of goats embryos. Australia. *Journal of Biology Science*. 29: 125-129.
- Block, J., and P. J. Hansen. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67:1518-1529.

Brebion P, Baril G, Cognie Y, Vallet JM. 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.* 41: 331-339.

Brebion P, Baril G, Cognie Y, Vallet JM. 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.* 41: 331-339.

Brozos, C. N., Ph. Saratsis, C. Boscós, S. C. Kyriakis, and C. Alexopoulos. 1999. The effect of bovine somatotropin (bST) administration on reproduction, progesterone concentration during lactation and LH secretion during estrus, in dairy ewes. *Animal Reproduction Science* 56: 177–187.

Carrillo, F., J. Hernández-Cerón, V. Orozco, J. A. Hernández, and C. G. Gutiérrez. 2007. A single dose of bovine somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization increases prolificity in sheep. *Animal Reproduction Science.* 102: 31-37.

Chemineau P, Procureur R, Cognie Y, Lefevre PC, Locatelli A, Chupin D. 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology* 26: 279-290.

Chemineau, P., Baril, G., Leboeuf, B., Maurel, M.C., Roy, F., Pellicer-Rubio, M.T., Malpoux, B., Cognie, Y., 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 54, 129–142.

- Chemineau, P., Daveau, A., Cognié, Y., Aumont, G., Chesneau, D., 2004. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology* 4, 12, 11p.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59:171-188.
- Corteel JM, Lebouef B, Baril G. 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Research* 1: 19-35.
- Costine, B.A., Inskip, E.K., Wilson, M.E. 2005. Growth hormone at breeding modifies conceptus development and postnatal growth in sheep. *Journal of Animal Science* 83:810–815.
- Davidson, R. T., C. Chamberlain S., T. Bridges S., and L. Spicer J. 2002. Effect of follicle size on in vitro production of steroids and insulin-like growth factor IGF-I, IGF-II and the IGF-binding proteins by equine ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 66: 1640–1648.
- Delgadillo, J.A., Fitz-González, G., Duarte, G., Véliz, F.G., Carrillo, E., Flores, J.A., Vielma, J., Hernández, H., Malpoux, B., 2004. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reproduction Fertility and Development* 16, 471–478.
- Donaldson L. 1984. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryo correlated with total embryos. *Theriogenology* 21: 517-524.

- Driancourt MA, Lorentz R, Chupin D, Webb R, Wilmut Y. 1988. Survival of ovine embryos stored at 4 °C for 24 hours. *Theriogenology* 30: 441-446.
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211–1239.
- Eckery, D.C., Moeller, C.L., Nett, T.M., Sawyer, H.R. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biology of Reproduction*. 57:507–513
- Evans G, Armstrong DT. 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *Journal Reproduction and Fertility*. 70: 47-53.
- Evans G, Holland MK, Nottle HB, Sharpe PH, Armstrong DT. 1984. Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination. In *Reproduction in sheep*. Eds. Lindsay DR, Pearce DT. Aust. Acad. Sci. and Aust. Wool Corp., Canberra. pp 313- 315.
- Evans, A.C.O., 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction of Domestic Animals* 38, 240–246.
- Fabre-Nys, C., 2000. Le comportement sexuel des caprins: contrôle hormonal et facteurs sociaux. *INRA Productions Animales* 13 (1), 11–23.
- Fatet, Alice, Pellicer-Rubio, M.A., Leboeuf, B. 2011. Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*. 124:211–219.

- Fieni F, Buggin M, Tainturier D, Beckers JF, Bach-Lijour B, Bruvas JF, Daubie M. 1990. L'insemination artificielle intra-uterine, transperitoneale chez la chevre. *Recueil de Medicine Veterinaire* 166: 479-484.
- Flores-Foxworth G, Mc Bride BM, Kraemer DC, Nuti LC. 1992. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology* 37: 213 (abstr.).
- Folch, J., J. P. Ramón, M. J. Cocero, J. L. Alabart, and J. F. Beckers. 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 55: 1777-1785.
- G.F. Carneiro. 2011. Goat reproductive biotechnology in Brazil. *Small Ruminant Research*. 98: 157-163.
- Gama, L.T., Bressan, M.C. 2011. Biotechnology applications for the sustainable management of goat genetic resources. *Small Ruminant Research*. 98:133-146.
- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Cueto M. 2010. Cryotips: A simple vitrification technique for sheep and goat embryos. 36th Annual Conference of the IETS/23rd Annual Meeting SBTE. Córdoba, Argentina. January 9-13.
- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Silvestre P, Cueto M. 2008. Vitrificación de embriones ovinos en tips. *Memorias de las Primeras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA*. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. 24-26 de septiembre. Buenos Aires, Argentina.

- Gibbons A, Traldi A, Silva ROC, Catto DR, Pugliesi D, Cueto M, Pereyra Bonnet. 2009. Eficiencia reproductiva de embriones caprinos vitrificados en tips de micropipetas. Memorias del VI CONGRESO ALEPRyCS, XV CONGRESO NACIONAL AMTEO y XXIV CONGRESO NACIONAL AMPCA. Querétaro, Mexico (CD-ROM) p 81.
- Goel AK and Agrawal KP: Ovulatory response and embryo yield in Jakhrana goats following treatments with PMSG and FSH. *Tropical Animal Health and Production*. 2005, 37: 549-58.
- Gong J. G., D. M. McBride, T. A. Bramley, and R. Webb. 1994. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Journal of Endocrinology* 143: 157-164.
- González R, García Vinent JC, Gibbons A, Cueto MI. 1991. Laparoscopic embryo transfer in Merino Sheep in Patagonia (Argentina). XXIV World Vet. Congress, Río de Janeiro, Brasil.
- González-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: 1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes, A. 2007. Avances en transferencia de embriones en pequeños rumiantes. *Advances in embryo transfer in small ruminants. Acta of Science Veterinary*. 35:773-780.
- Gonzalez-Bulnes, A., Baird, D.T., Campbell, B.K., Cocero, M.J., Garcia-Garcia, R.M., Inskip, E.K., Lopez-Sebastian, A., McNeilly, A.S., Santiago-Moreno, J., Souza, C.J., Veiga-

- Lopez, 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.
- Gutierrez C. G., I. Aguilera, H. Leon, A. Rodríguez, and J. Hernández-Cerón J. 2005. The metabolic challenge of milk production and the toll it takes on fertility. *Cattle Practice* 13: 5-11.
- Gutierrez C. G., I. Aguilera, H. Leon, A. Rodríguez, and J. Hernández-Cerón J. 2005. The metabolic challenge of milk production and the toll it takes on fertility. *Cattle Practice* 13: 5-11.
- Hernández-Cerón J., M. G. Mendoza, S. Morales, and C. G. Gutierrez. 2000. A single dose of recombinant bovine somatotrophin improves fertility in dairy cattle. *Reproduction and Fertility Abstract Series*. 25: Abstr. 140.
- Heyman Y, Vincent C, Garnier V, Cognie Y. 1987. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Veterinary Research*. 24: 83-85.
- Holtz, W. 2005. Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research* 60: 95–110.
- International Embryo Transfer Society 1990. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Eds. Stringfellow DA, Seidel SM. 2° ed. USA, Champaign. pp 79.
- Izadyar, F., H. T. A. Van Tol, W. G. Hage, and M. M. Bevers. 2000. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone

addition during in vitro development. *Molecular Reproduction. Development* 57: 247-255.

Jousan, F. D., and P. J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of Reproduction* 71: 1665-1670.

Jousan, F. D., and P. J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of Reproduction*. 71: 1665-1670.

Joyce, I. M., M. Khalid, and W. Haresign. 1998. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulation rate. *Theriogenology* 50: 873-884.

Le Gal F, Baril G, Vallet JC, Lebouef B. 1993. In vivo and In vitro survival of goat frozen embryos with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology* 40: 771-777.

Lehloenya Khoboso, C. 2013. Preliminary results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goats. Short communication. *Small Ruminant Research* 113(2013) 171-174

Lewalski H, Soonen A, Meinecke-Tillman S, Meinecke B. 1991. Transcervical intrauterine embryo transfer in sheep. 7th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Cambridge, 1: 160 (abstr.).

- Lucy, M. C., J. C. Byatt, T. L. Curran, and R. J. Collier. 1994. Placental lactogen and somatotropin: binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biology of Reproduction*. 50: 1136-1144.
- Martínez AG, Valcarcel A, Furnus CC, De Matos DG, Iorio G, De Las Heras MA. 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research* 63: 288–296.
- Martínez-Álvarez L.E., Hernández-Cerón J., González-Padilla E., Perera-Marín G. and Valencia J. 2005. Serum LH peak and ovulation following synchronized estrus in goats. *Small Ruminant Research* Volume 69, Issue 1, Pages 124-128.
- Martínez, A. M., C. G. Gutiérrez, H. Y. M. Domínguez, y J. Hernández-Cerón. 2011. Respuesta estral y tasa de preñez en cabras en anestro estacional tratadas con progestágenos y somatotropina bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2: 221-227.
- Mc Kelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25: 855-865.
- Mejía, O., M. Palma-Irizarry, J. Rosas, V. Madrid-Marina, J. Valencia, and L. Zarco. 2012. Administration of recombinant bovine somatotropin (rbST) at the time of breeding in superovulated fertile and subfertile ewes. *Small Ruminant Research* 102: 51–56.
- Menchaca, A. and Rubianes, E. 2002. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*. 57(5):1411-1419.

- Menchaca, A. and Rubianes, E. 2007. Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reproduction of Domestic Animals*. 42:590-593.
- Menchaca, A., Miller, V., Salveraglio, V., Rubianes, E. 2007. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. *Animal Reproduction Science*. 102:76–87.
- Meza-Herrera, C.A., Guerra-Garcia, M., Sánchez-Torres-Esqueda, MT., Gallegos-Sánchez, J., Torres-Hernandez, G., Pro-Martinez, A. 2009. IGF-I y actividad ovárica de cabras en condición corporal divergente y con un suplemento de proteína no degradable en rumen. *Agrociencia* v.43 n.3 México abr./may. 2009
- Meza-Herrera, C.A., Hallford, D.M., Ortíz, J.A., Cuevas, R.A., Sanchez, J.M., Salinas, H., Mellado, M., Gonzalez-Bulnes, A. 2008. Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non-LH mediated pathways in goats. *Animal Reproduction Science*. 106:412-420.
- Meza-Herrera, C. A., T. Ross, D. Hallford, D. Hawkins, and A. Gonzalez-Bulnes. 2007. Effects of body condition and protein supplementation on LH secretion and luteal function in sheep. *Reproduction of Domestic Animals*. 42: 461–465.
- Meza-Herrera, C. A., T. Ross, D. Hawkins, and D. Hallford. 2006. Interactions between metabolic status, pre-breeding protein supplementation, uterine pH, and embryonic mortality in ewes: Preliminary observations. *Tropical Animal Health Production*. 38: 407–413.

- Meza-Herrera, C.A., J. M. Sanchez S., J. G. Chavez-Perches, H. Salinas, and M. Mellado. 2004. Protein supplementation, body condition and ovarian activity in goats. Preovulatory serum profile of insulin. *South African Journal of Animal Science* 34(Suppl 1): 223–226.
- Montero-Pardo, A., Hernández-Cerón, J., Rojas-Maya, S., Valencia, J., Rodríguez-Cortez, A., Gutiérrez, C.G. 2011. Increased cleavage and blastocyst rate in ewes treated with bovine somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization. *Animal Reproduction Science* 125:69–73.
- Moore ER. 1980. Procedures and results obtainable in sheep and goats. In: *Current Therapy. Theriogenology*. Ed. Morrow DA, Saunders WB. pp 89-95.
- Morales-Roura, J. S., L. Zarco, J. Hernández-Cerón, and G. Rodríguez. 2001. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 55: 1831-1841.
- Moreira, F., F. F. Paula-Lopes, P. J. Hansen, L. Bandinga, and W. W. Thatcher. 2002b. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 57: 895-907.
- Moreira, F., L. Bandinga, C. Burnley, and W. W. Thatcher. 2002a. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 57: 1371-1387.

- Mueller J. 1993. Utilización de la inseminación artificial y la superovulación con transferencia de embriones en el mejoramiento genético de ovinos. *Comunicación Técnica del INTA CD Producción Animal*. 323: 1-8.
- Navarrete-Sierra, L.F., Cruz-Tamayo, A.A., González-Parra, E.I., Piña-Aguilar, R.E., Sangines-García, J.R., Toledo-López, V., Ramón-Ugalde, J.P. 2008. Effect of recombinant growth hormone (rbST) application on superovulatory response and embryo viability in hair ewes. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 18:175–179.
- Nunes, J.F., Salgueiro, C.C.M. 2011. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminant Research* 98: 176-184
- Pershing, R. A., M. C. Lucy, W. W. Thatcher, and L. Badinga. 2002. Effects of BST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF system in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85: 3260–3267.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B., Whan-Khadijah, W.E. 2008. Estrus synchronization and superovulation in goats: A review. *Journal and Biological Sciences*. 8 (7): 1129- 1137.
- Rivas-Muñoz, R., Carrillo, E., Rodríguez-Martínez, R., Leyva, C., Mellado, M., Gerardo Véliz, F. 2010. Effect of body condition score of does and use of bucks subjected to added artificial light on estrus response of Alpine goats. *Tropical Animal Health and Production*. 42(6):1285-1289.
- Sánchez-Dávila, F., Bernal Barragan, H., Del Bosque González, SA, González-Gómez, A., Olivares Saenz, E., Padilla Rivas, G., Ledezma Torres, RA. 2013. Superovulación y

calidad embrionaria con FSHp en ovejas de pelo Katadhin durante la estación reproductiva. *Ecosistemas y Agroecosistemas Tropicales*, Vol. , Pag.0-0,

Santiago-Miramontes (De), M.A., Rivas-Munoz, R., Munoz-Gutierrez, Malpaux, B., Scaramuzzi, R.J., Delgadillo, J.A., 2008. The ovulation rate in anoestrous female goats managed under grazing conditions and exposed to the male effect is increased by nutritional supplementation. *Animal Reproduction Science* 105, 409–416.

Scaramuzzi, R. J., K. Campbell B., A. Downing J., R. Kendall N., M. Khalid, M. Muñoz–Gutierrez, and A. Somchit. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction and Nutrition Development*. 6: 339–354.

Scaramuzzi, R. J., N. R. Adams, D. T. Baird, B. K. Campbell, J. A. Downing, J. K. Findlay, K. M. Henderson, G. B. Martin, K. P. McNatty, and A. S. McNeilly. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction and Fertility Development* 5: 459-478.

Simões, J., Almeida, J.C., Valentim, R., Baril, G., Azevedo, J., Fontes, P., Mascarenhas, R., 2006. Follicular dynamics in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*. 95, 16–26.

Spencer, T. E., R. C. Burghardt, G. A. Johnson, and F. W. Bazer. 2004. Conceptus signal for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 537-550.

- Spicer, L J., E. Alpizar, and S. E. Echternkamp. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production In vitro 1. *Journal of Animal Science*. 71: 1232-1241
- Stringfellow DA, Riddell KP, Zurovac O. 1991. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. *New Zealand Veterinary Journal*. 8-17.
- Tervit HR, Goold PG, Mc Kenzie RD, Clarkson DT. 1983. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. *New Zealand Veterinary Journal*. 31: 67-70.
- Torres S, Sevellec C. 1987. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reproduction and Nutrition Development*. 27: 859-863.
- Traldi A, Silva ROC, Catto DR, Pugliesi D, Pereyra Bonnet F, Gibbons A. 2009. Goat embryos survival vitrified in micropipette tips compared to fresh embryos. *Annais del XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. MG: Brasil (CD-ROM). ISSN1984-871. p. 404.*
- Vallet JC, Baril G, Rougier F, Chupin D, Procureur R, Corteel JM. 1987. Feasibility and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. 3rd Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 60 (abstr.).
- Vallet JC, Baril G. 1990. Effect of time of laparoscopic intrauterine insemination in superovulated dairy goats. 6th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 188 (abstr.).

- Vallet JC, Casamitjana P, Brebion P, Perrin J. 1991. Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. Recueil de Medicine Veterinaire, Special Reprod. des ruminants 1: 293-230.
- Vasconcelos, J. L, S. Sangsritavong, S. J. Tsai, and M. C. Wilt- bank. 2003. Acute reduction in serum progesterone concen- trations after feed intake in dairy cows. Theriogenology 60: 795-807.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. 1976. Deep freezing of sheep embryos. Journal of Reproduction and Fertility. 46: 151-154.
- Wolff M, Gibbons A, Cueto M, Willems P, Arrigo J. 1994. Results of artificial insemination with frozen semen in Australian Merino ewes multiovulated with FSHp. IV World Merino Conference. Montevideo, Uruguay. pp 269 (abstr.).
- Zarco, L., Mejía, O., Palma-Irizarryb, M., Rosasd, J., Madrid-Marinac, V., Valenciad, M.J. 2012. Administration of recombinant bovine somatotropin (rbST) at the time of breeding in superovulated fertile and subfertile ewes. Small Ruminant Resesearch. 102(1) :51-56.

## IX. Anexos

### Anexo 1. Grados de clasificación de embriones

**Grado I:** Excelente, embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme. El desarrollo embrionario corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles y la zona pelúcida está intacta.

**Grado II:** Bueno, hay algunas imperfecciones triviales, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas. Su forma puede ser ligeramente irregular.

**Grado III:** Regular, el embrión posee defectos definidos: detritus celulares, forma irregular, color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida. Pocas células degeneradas, vesículas y presencia de blastómeros desprendidos.

**Grado IV:** Malo, el embrión posee severos defectos: los correspondientes al grado III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. Incluye a los estados hasta 8 células y la degeneración. Esta categoría de embriones no es transferible.