

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



TESIS

**EFFECTO DE LA RAZA Y DE eCG SOBRE LA RECOLECCIÓN DE
OVOCITOS Y DE EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO* EN CABRAS
JÓVENES DURANTE LA ESTACIÓN REPRODUCTIVA**

QUE PRESENTA

MVZ. GABRIELA LISSET MONTES QUIROZ

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

JUNIO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**EFFECTO DE LA RAZA Y DE eCG SOBRE LA RECOLECCIÓN DE
OVOCITOS Y DE EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO* EN CABRAS
JÓVENES DURANTE LA ESTACIÓN REPRODUCTIVA**

QUE PRESENTA

MVZ. GABRIELA LISSET MONTES QUIROZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

GRAL. ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JUNIO 2018

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



EFFECTO DE LA RAZA Y DE eCG SOBRE LA RECOLECCIÓN DE OVOCITOS Y DE EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO* EN CABRAS JÓVENES DURANTE LA ESTACIÓN REPRODUCTIVA

Aprobación de Tesis por el comité particular de:

MVZ. Gabriela Lisset Montes Quiroz



Dr. Fernando Sánchez Dávila

Director



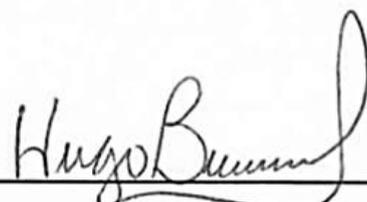
MC. David Domínguez Díaz

Co-Director



Dr. Rubén Cervantes Vega

Co-Director



Dr. Hugo Bernal Barragán

Co-Director



Dr. Rogelio A. Ledezma Torres

Co-Director

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, el cual me ha dado fortaleza para continuar cuando he estado a punto de caer; por ello, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy:

Mis papas: José Mario y Ely

Mis hermanos: José Mario y Karla Janeth

A toda la familia Quiroz

Mis abuelos: Félix[†], Agustina[†] y Ricarda[†], sé que no están físicamente, pero se que me cuidan y guían mis paso desde arriba, espero que estén orgullosos de mí, así como yo lo estoy de ustedes.

A mi Director y Co- Directores de tesis quienes participaron en mi desarrollo profesional durante todo este tiempo, compartiendo sus conocimientos, experiencias y formar parte de lo que ahora soy, gracias por ser mis guías, grandes personas, mi respeto y admiración para ustedes.

A mis amigos, colegas y todas las personas que estuvieron involucradas de alguna manera, por estar siempre ahí cuando los necesite, son parte importante de este logro.

“Si puedes imaginarlo puedes lograrlo, si puedes soñarlo, puedes hacerlo realidad”

William Arthur Ward

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este camino.

Gracias infinitas a mis padres **José Mario Montes y Elidia Quiroz** por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y mi coraje para conseguir mis objetivos.

Muy particularmente al **Dr. Fernando Sánchez Dávila**, por haber confiado en mí, espero haber cumplido sus expectativas, esta aventura comenzó hace 4 años, y créame que estoy agradecida de que Dios lo haya puesto en mi camino, gracias por inculcar en mí el deseo por la investigación, por su apoyo incondicional, por sus consejos, por estar siempre ahí, por sus valiosos conocimientos y por ser firme en los momentos que se requería. A la familia **Sánchez Tamez** por abrirme las puertas de su hogar, Dios los bendiga. Dr. No me queda nada más que decir gracias por TODO, ya cumplí mi segundo objetivo profesional ahora sigue el próximo, sé que lo lograre, y espero que celebrarlo también con usted. Gracias infinitas por ser mi director de tesis, amigo y jefe, de las tres facetas he aprendido grandemente, ya que mucho de lo que soy ahora se lo debo a usted, por tanto no me queda más que decir Gracias!.

M. C. David Domínguez Díaz, gracias por haber aceptado ser parte de este proyecto, usted fue un elemento clave para poder llevar a cabo este trabajo le

agradezco mucho, ya que sé que era algo nuevo para usted, y sin embargo siempre estuvo ahí para ayudarnos, gracias por brindarnos su tiempo y sus conocimientos, por aclarar mis dudas, y más que nada el tenerme paciencia, le agradezco a Dios y a la vida por haberlo puesto también en mi camino, por ser mi guía y por brindarme su amistad. Médico le estoy sumamente agradecida, lo estimo mucho, cuente siempre con mi apoyo, sabe que aquí estoy para lo que necesite.

Dr. J. Rubén Cervantes Vega, que le puedo decir, es una persona ejemplar usted siempre ha sido mi incondicional apoyo, gracias por siempre estar al pendiente de una servidora, por sus invaluable consejos, por sus palabras de aliento, que no me dejaron caer en momentos difíciles, espero algún día llegar a hacer como usted y espero haber cubierto sus expectativas, gracias por sus consejos, por otorgarme algo de sus vastos conocimientos, siempre con la disposición de ayudar, es un gran maestro, sin su apoyo este trabajo no hubiese sido posible, le estoy profundamente agradecida, así mismo le agradezco a Dios y a la vida por haberlo puesto en mi camino, y por todo lo que viene, Gracias!

Al **Dr. Hugo Bernal Barragán**, doctor gracias por formar parte este proyecto, y de muchos otros, gran persona, doy gracias a Dios de tener la dicha de conocerlo, catedrático ejemplar, nunca cambie, gracias por TODO, por siempre estar al pendiente del trabajo y siempre brindarme una mano, muchas Gracias!

Dr. Rogelio A. Ledezma Torres, doctor, toda esta aventura comenzó con usted, hace ya 5 años, espero este orgulloso de hasta donde he llegado, yo estoy orgullosa de su gran amistad, gracias por haber inculcado en mí el gusto por la reproducción, espero hasta ahora haber cumplido sus expectativas, le estoy

sumamente agradecida por haberme brindado algo de sus conocimientos, fueron y son piezas clave de lo que soy ahora como persona, siempre estaré agradecida de que Dios los haya puesto en mi camino, siempre estaré ahí para lo que necesite, por tanto no me queda más que decir Gracias!

Dr. Juan Villarreal Arredondo, muchas gracias por formar parte de este proyecto, gracias por siempre brindarme su apoyo, les estamos sumamente agradecidos, sin el apoyo de usted, y del Centro de Biotecnología Reproductiva de la UGRNL, este trabajo no hubiese sido posible. Muchas gracias, cuente siempre conmigo!

Mi familia de Maestría por 2 años, aunque yo sé que lo serán para toda la vida, mis compañeros, mis herman@s, todos con la misma incertidumbre pero con el mismo sueño y objetivo, que les puedo o que nos puedo decir que ya no sepamos, iniciamos siendo algunos conocidos y algunos desconocidos, cada quien con su historia de vida, al principio sufrimos, nos enfermamos, pasábamos hambres, estrés, algunos quisimos desertar, pero nos dábamos ánimos unos con otros y con el tiempo fuimos creando un lazo muy fuerte que nos ayudó a salir adelante, nuestros días de estudios, nuestros festines (después que nos llegó la beca, evidentemente), nuestras reuniones, siempre las llevaré como un grato recuerdo. Le agradezco a Dios y a la vida por haber puesto a cada uno de ustedes en mí camino, ya que todo pasa por alguna razón, no existen las casualidades, ya que de cada uno de ustedes me dejó un aprendizaje de vida:

MC. Valeria Garza, (la Vale), que te puedo decir, por alguna razón cree un vínculo especial contigo, talvez porque de alguna razón nos parecemos y pensamos igual, te admiro, porque supiste sobrellevar tu faceta de mamá y de ama de casa y terminar este logro académico, obviamente con dificultades

(sabemos de lo que hablo), pero todo salió bien, **Lucero Ortiz Tello (Lu)**, que te puedo decir en nuestro caso ya nos conocíamos de la licenciatura, sé que eres una persona con alma muy buena, sencilla y con la virtud de brindar tu ayuda a quien lo necesite, a comparación de todos los demás, tú fuiste quien iba mejor en cuanto a tu investigación, como todo, pasaron cosas que marcaron nuestro paso por posgrado, pero aun así, no te diste por vencida, te deseo todo lo mejor, y todo el éxito del mundo, **Linda Hermida Abundis (Li)** así como Lu, nos conocemos desde licenciatura, eres una persona buena onda, amistosa, alegre, entre muchas otras virtudes, en tu caso, el camino hasta culminar en este logro no fue nada fácil, pasaste por cosas que no estuvieron en tus manos, más sin embargo supiste salir adelante a pesar de todas las adversidades y de todas esas personas que no confiaron en ti, sé que te ira muy bien en la vida, ya que eres muy luchona, **Rosa Arzola (Rouse)**, una de las más pequeñas de la generación, Rosa eres una persona súper sencilla, muy humilde, sé que batallamos al inicio y estuvimos a punto de saltar del barco, pero decidiste ser valiente y seguir, tu investigación no es fácil de entender y sin embargo le echaste y le estas echando todos los kilos, mucha suerte en todo lo que emprendas, **Alma Aguirre**, de las mayores del grupo, eres el alma del grupo, súper carismática, sé que por cuestiones de salud y que no estuvieron en tus manos tuviste que suspender tus estudios, pero sin embargo eres y seguirás siendo parte fundamental en nuestra generación, un placer tratarte y conocerte bien, espero que lo que el camino te depare sea lo mejor para ti, te queremos y pues sí, nosotros somos el sixpack ! y como todo en la vida no podían faltar los niños foráneos **Luis C. Peña Acosta**, un grato placer coincidir contigo en esta vida, de las pocas personas que he conocido que emanan paz, eres súper

inteligente y muy centrado en lo que quieres de tu vida, como todo buen estudiante no tuviste problemas con terminar el posgrado y presentar en tiempo y forma, espero que la vida te conceda todo tus sueños, te voy a echar mucho de menos, **Rubén López**, mi Rubén, como solías decir tu a la gente, forme un lazo especial contigo, talvez por trabajar en la misma área, con especies diferentes, pero a fin de cuentas lo mismo, creo que eres un ser poco comprendido, pero sé que eres muy bueno, sé que para ti fue difícil por tu historia de vida, pero siempre quiero que recuerdes que eres bueno, que puedes y debes confiar en ti, así como nosotros confiamos en ti, sé que tu paso por posgrado no fue talvez lo que esperabas y no por ti, sino por tu inexperiencia, por falta de apoyo y de alguien que te guiara adecuadamente, pero estoy segura que esto fue una gran aventura para ti, tómalo como una gran experiencia de aprendizaje, sé que vas a lograr todo lo que te propongas, porque así eres tú, ánimo, vive la vida, que solo hay una, te queremos Rubén, te extraño y te voy a extrañar, pero sé que la vida nos volverá a juntar. Y pues solo me queda decirles que **LO LOGRAMOS!!**.

A mis compañeros tesistas médicos **MVZ. Eduardo Elizondo Tamez, MVZ. Diana Aimé Rodríguez Miranda y MC. Selene Guadalupe García Montero**, quienes hicimos un gran equipo de trabajo, gracias por su apoyo incondicional, por sus levantadas temprano, por sus idas a Marín, con ustedes pase muchas horas de felicidad así como también de momentos difíciles, pero siempre estuvieron ahí, espero que la vida les conceda mucha salud y les conceda todos sus sueños, **GRACIAS!**

A mis compañeros ingenieros agrónomos **Ing. Reyna Lucia Calvillo Guzmán e Ing. Esteban Campos Badillo**, por su valioso apoyo y colaboración, tanto en el

trabajo de laboratorio como en los traslados, sé que fue cansado, pero gracias a su apoyo se pudo lograr este trabajo, gracias Esteban por hacer muy amenas las horas de trabajo.

Son varias las personas que han formado parte de este trabajo a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo en el trabajo de campo, ánimo y compañía en los buenos y malos momentos, por compartir su tiempo conmigo, gracias por estar siempre pendiente del desarrollo de la tesis, y por sus palabras de aliento:

MVZ. Diana Salas

MVZ. Debanhi Gerardo García

MVZ. Liliana Sánchez Rangel

MVZ. Paola Palomino

MVZ. Marlene Díaz Alvarado

MVZ. Yuriana Macías

Gracias especiales al **Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria**, a ambas facultades, **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** y **Facultad de Agronomía**, al **Laboratorio de Reproducción** de la Unidad Académica Marín y muy en especial al **Centro de Biotecnología Reproductiva** de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León.

ABREVIATURAS

AOL	Aspiración de ovocitos por laparoscopia
BSA	Albumina de suero bovino
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
COC	Complejo cumulus-ovocito
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EFG	Factor de crecimiento epidermal
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IA	Inseminación artificial
IETS	Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones
LH	Hormona luteinizante
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
MOET	Múltiple ovulación y transferencia de embriones
PEIV	Producción de embriones <i>in vitro</i>
SFB	Suero fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviducto
SSPS	Statistical Package for the Social Sciences
TCM	Medio de cultivo tisular
TRA	Tecnologías de reproducción asistida
UI	Unidades Internacionales

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
INDICE DE TABLAS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Situación de la caprinocultura Mundial	4
2.1.1. Población mundial del ganado caprino	5
2.1.2. Producción de leche	6
2.1.3. Producción de Carne	6
2.1.4. Situación de la caprinocultura nacional	7
2.2. Antecedentes de fertilización <i>in vitro</i> en pequeños rumiantes.....	7
2.3. Metodologías de estimulación ovárica en pequeños rumiantes.	10
2.4. Factores que afectan la respuesta a la estimulación ovárica	12
2.5. Factores extrínsecos	15
2.5.1. Fuente y pureza de las gonadotropinas.....	15
2.5.2. Protocolo de administración de las gonadotropinas	16
2.5.3. Variabilidad asociada con el uso de progestágenos.....	17

2.6.	Factores intrínsecos.....	19
2.6.1.	Presencia de un folículo dominante.....	20
2.6.2.	Presencia de un cuerpo lúteo	22
2.7.	Metodologías para recolección de ovocitos en pequeños rumiantes ..	23
2.7.1.	Aspiración de ovocitos mediante laparotomía.	24
2.7.2.	Aspiración de ovocitos mediante laparoscopia.....	25
2.7.3.	Técnica de aspiración transvaginal guiada por ultrasonido	26
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1.	Lugar del estudio.....	29
3.2.	Animales experimentales	29
3.3.	Protocolo de estimulación ovárica.....	29
3.4.	Aspiración de ovocitos mediante laparotomía.....	30
3.5.	Maduración <i>in vitro</i>	32
3.6.	Fertilización <i>in vitro</i>	32
3.7.	Cultivo <i>in vitro</i>	33
3.8.	Análisis Estadístico	33
4.	RESULTADOS	35
4.1.	Folículos totales y post aplicación por raza y tratamiento	35
4.2.	Tamaño de folículos por raza y tratamiento	36
4.3.	Tasa de aspiración y calidad de los ovocitos por raza y tratamiento ..	38
4.4.	Producción de embriones <i>in vitro</i> por raza y por tratamiento	40
5.	DISCUSIÓN	42

6. CONCLUSIONES	47
7. LITERATURA CITADA	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Efecto de la raza y eCG, sobre el número de estructuras ováricas en cabras jóvenes, durante la época reproductiva (Medias \pm EE).....	36
2. Efecto de la raza sobre la tasa de recuperación y la calidad de ovocitos en cabras jóvenes, dentro de estación reproductiva.....	39
3. Efecto de la eCG sobre la tasa de recuperación y calidad de ovocitos en cabras jóvenes dentro de la estación reproductiva.....	39
4. Efecto de la raza sobre los embriones producidos <i>in vitro</i> en cabras jóvenes, dentro de estación reproductiva.....	40
5. Efecto de la eCG sobre el porcentaje de embriones producidos <i>in vitro</i> en cabras jóvenes, dentro de la estación reproductiva.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efecto de la raza sobre el tamaño de los folículos en cabras jóvenes (media \pm SE) (P=0.003).....	37
2. Efecto de la dosis de eCG sobre el tamaño de los folículos en cabras jóvenes (media \pm EE) (P <0.001).....	37

RESUMEN

El presente estudio es de los primeros en cabras en llevar a cabo PEIV en México. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la raza y la eCG sobre la respuesta ovárica y producción de embriones *in vitro* durante la estación reproductiva en cabras juveniles. Se utilizaron un total de 29 cabras, se dividieron en 3 tratamientos, a las cuales se les aplicaron diferentes dosis de eCG (T1: 500 UI, T2: 100 UI y T3 o testigo 0 UI). Se realizó ultrasonografía transrectal previo a la aplicación de la hormona, y 24 h posterior a la aplicación, para determinar efecto de la hormona, y se realizó aspiración folicular 24 h post aplicación de la hormona, mediante laparotomía, para posteriormente llevar a cabo el proceso *in vitro*. Las cabras de la raza Alpina presentaron mayor cantidad y tamaño de folículos ($P= 0.003$) que las de otras razas. El efecto de la dosis de eCG, 24 horas post aplicación, fue significativo sobre la cantidad de folículos en las hembras del T1 ($P=0.02$) y T2 ($P<0.05$), así mismo en cuanto al tamaño de los folículos ($P<0.001$) para las cabras del T2, en comparación al testigo. La calidad de los ovocitos fue deficiente, encontrándose la mayor cantidad de desnudos ($P=0.003$) en las cabras Saanen, así mismo se encontró diferencia ($P=0.02$) en ovocitos Grado III, en los T1 y T2. La producción de embriones *in vitro* fue mejor para la raza Alpina ($P=0.003$). Los T1 y T2 tuvieron mejor producción de embriones 7 días post FIV total ($P=0.004$) y el T2, obtuvo diferencia significativa ($P=0.03$) en cuanto a la obtención de estadios de mórulas, sin embargo la calidad de los embriones fue 3 o pobre según la clasificación descrita por la IETS, concluyendo que la cantidad y tamaño de folículos se vio afectada por la aplicación de eCG y la raza, asimismo, sobre la calidad de los ovocitos y producción total de embriones, mas no sobre la cantidad

1. INTRODUCCIÓN

Para mejorar la ganancia genética en cabras y superar la restricción reproductiva que se presenta en algunas regiones y razas, se ha fomentado la adaptación de técnicas de reproducción asistida (TRA). Estas tecnologías implican el control del estro y la ovulación, inseminación artificial (IA), la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET), la producción de embriones *in vitro* (PEIV), y la criopreservación de gametos y embriones (Paramio e Izquierdo 2014).

La producción *in vitro* optimiza la generación de embriones y se traduce en un menor tiempo desde la implementación hasta el nacimiento de las crías en comparación con la inseminación artificial y la transferencia de embriones tradicional (Padilha *et al.* 2014). Esta técnica tiene algunas ventajas como la fiabilidad (Cognié *et al.* 2003), la reproducibilidad (Stangl *et al.* 1999), la posibilidad de recolectar ovocitos de hembras hormonalmente estimuladas o no (Morton *et al.* 2005a), juveniles (Baldassarre y Karatzas, 2004) seniles (Baldassarre *et al.* 2007), hembras no fértiles, prepúberes, gestantes, lactantes e incluso casos postmortem (Paramio e Izquierdo, 2016). Durante la producción *in vitro*, los ovocitos en estadio de vesícula germinal obtenidos de terneras y corderas prepúberes progresan a través de la meiosis a metafase II (MII) en tasas similares a los ovocitos de animales adultos (O'Brien *et al.* 1996). Además, después de la fecundación, estos ovocitos son capaces de dirigir eventos en la embriogénesis temprana (O'Brien *et al.* 1996). Por lo tanto se ha planteado la posibilidad de utilizar hembras pre púberes y juveniles como donantes de embriones en programas de mejoramiento acelerado, con el objetivo de reducir

el intervalo generacional (Ptak *et al.* 1999), esto a través de la estimulación hormonal para aumentar el número de folículos ováricos y ovocitos (Morton *et al.* 2005b), para obtener ovocitos que se desarrollen en forma sincrónica (Armstrong *et al.*, 1997) y con esto se incrementa el desarrollo de ovocitos *in vitro* (Morton *et al.* 2005b).

Las gonadotropinas que se han utilizado para superovular cabras adultas son la hormona estimulante del folículo porcino u ovino (FSH) (Lehloenya, 2013), la gonadotropina coriónica equina (eCG) (Goel y Agrawal 2005), y/o un régimen denominado “one-shot” (FSH+ eCG) (Baldassarre *et al.* 2002). La eCG tiene algunas ventajas como lo es una administración única y bajo costo (Pendleton *et al.*, 1992); siendo su efecto principal incrementar la cantidad de folículos reclutados, además de aumentar el diámetro y desarrollo de los folículos grandes durante una onda de crecimiento folicular (Uribe-Velásquez *et al.*, 2008).

Asimismo, la eCG se ha utilizado en casi todos los programas de sincronización del estro en cabras, siendo las dosis que varían en función a la respuesta que se quiere tener en cuanto al crecimiento folicular. La utilización de eCG en cabras, abre la posibilidad de recolectar y madurar ovocitos y poder acelerar el progreso genético en esta especie, siendo importante desarrollar la técnica para su implementación en las poblaciones caprinas de pie de cría de las diferentes razas que se explotan en diferentes latitudes.

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la raza y de la gonadotropina coriónica equina (eCG) sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones *in vitro* dentro de la estación reproductiva en cabras juveniles.

1.1. Objetivos

1.1.1. Evaluar el efecto de la raza y la eCG (0, 500 y 1000 UI) sobre el número y tamaño de folículos antes y después de la aplicación de la hormona.

1.1.2. Evaluar el efecto de la raza y la eCG (0, 500 y 1000 UI) sobre la tasa de recuperación y calidad de los ovocitos.

1.1.3. Evaluar el efecto de la raza y la eCG (0, 500 y 1000 UI) sobre el porcentaje y calidad de los embriones producidos *in vitro*.

1.2. Hipótesis

La aplicación de eCG dentro de la estación reproductiva, provoca diferencias en la respuesta ovárica y ovocitos recolectados, así como de embriones producidos *in vitro* en cabras jóvenes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Situación de la caprinocultura Mundial.

Las cabras estuvieron entre los primeros animales de granja que se domesticaron (MacHugh y Bradley, 2001). Según lo indicado por la evidencia arqueológica, se han asociado con el hombre en una relación simbiótica de hasta 10,000 años (Ensminger y Parker, 1986).

Las cabras se diseminaron por todo el mundo debido a su gran adaptabilidad a las diversas condiciones ambientales y a los diferentes regímenes nutricionales bajo los cuales fueron desarrolladas y posteriormente mantenidas. Probaron ser útiles al hombre a lo largo de sus diferentes etapas debido a su productividad, tamaño pequeño y que no competían con él para el alimento (Mahmoud, 2010). La mayor parte de la población caprina del mundo se encuentra en países en vías de desarrollo, y la producción se realiza principalmente en áreas marginales y bajo condiciones ambientales adversas, con prácticas de manejo que no han cambiado al paso de las generaciones (Peacock y Sherman, 2010). Las cabras se emplean para varios propósitos como lo es la leche, carne, fibra, piel, incluso trabajo (Debouf *et al.*, 2004). La capacidad de adaptación de las cabras a diferentes ambientes (Avilés, 2002) puede explicar el reciente avance de las cabras en nuevas áreas, por lo que en la actualidad el desarrollo de la crianza caprina es relativamente más intenso en las condiciones extremas de sistemas extensivos de ganadería (Morand-Fehr *et al.*, 2003), esto debido a mecanismos de adaptación, como la capacidad de caminar largas distancias, el

comportamiento para seleccionar las plantas o fracciones vegetales más nutritivas, la digestión eficiente de las fracciones menos nutritivas ricas en fibras debido a un intenso ciclo de la urea, etc. Para los productores de cabras, esta especie exige poco en cuanto a los alimentos porque ellas consumen arbustos, y una amplia gama de vegetación que el ganado y las ovejas no aceptan.

Además, que para la crianza de las cabras generalmente se requiere menos inversión en comparación con el ganado vacuno u ovino (Morand-Fehr *et al.*, 2004). En la actualidad existen más de 500 razas de cabras reconocidas en todo el mundo, de las cuales más del 90% son consideradas razas locales (FAO, 2007). Sin embargo, la clasificación de la raza en todo el mundo, particularmente en el caso de las cabras, es aproximada, ya que muchos países no tienen la tradición de clasificar a los animales por raza, sino por su distribución geográfica, mientras que otros nombres, como criollo, se utiliza como designación extranjera (Lanari *et al.*, 2003). Cerca de un tercio tiene un estatus desconocido, mientras que tres razas (Saanen, Anglo-Nubia y Boer) se encuentran en más de 50 países (FAO, 2007).

2.1.1. Población mundial del ganado caprino

El número de cabras en el mundo es de 1002, 810, 368, millones (FAOSTAT, 2017). El mayor número se encuentra en el continente Asiático, con: 580, 703, 222 millones, seguido por el continente Africano con: 374, 380,445 millones, el continente Americano con 35, 640,927, Europa con: 16, 534,309 y el menor número de cabras se encuentra en Oceanía con solo 3, 992,930 millones,

presentando Asia un 58.9 % de la producción total del mundo, y China presenta la mayor población, esto en cuanto a población por país.

2.1.2. Producción de leche

En cuanto a la producción de leche, podemos mencionar que en el año 2016 se obtuvieron un total de 15, 262 116 toneladas de leche, en el mundo (FAOSTAT, 2017). El continente con la mayor producción es Asia, donde se produjeron un total de 8, 043, 749 toneladas de leche, seguido de África, Europa, el continente Americano se encuentra en la 4^{ta} posición con una producción de 751, 823 toneladas de leche y en última posición se encuentra Oceanía. En cuanto a los países que producen leche, se puede mencionar que India presenta una producción de más de 3 millones de toneladas.

2.1.3. Producción de Carne

La FAO estima que el consumo mundial de carne de cabra representa alrededor del 5% del consumo total de carnes rojas, lo que significa más de 5.2 millones de toneladas anuales (FAO, 2009). Haciendo mención que Asia presenta la mayor producción con un 73.2 % del total. Dentro de los 10 países con mayor producción de carne de caprino se encuentra China con una producción de 4, 113, 646 toneladas en el año 2016 (FAOSTAT, 2017).

2.1.4. Situación de la caprinocultura nacional

En México, la producción caprina se desarrolla en unas 350,000 unidades de producción, con una población cercana a 8, 755, 443 millones de cabezas (FAO STAT, 2017) que se distribuyen fundamentalmente en cuatro zonas: Árida y Semiárida 39.7%, Centro Bajío 21.4%, Región Mixteca 26.4% y Zona Tropical 12.4% (SAGARPA, 2010). La producción de carne de caprino en canal para el año 2017, fue de 39, 659 toneladas (SIAP, 2017), y para lo que va del año 2018, cifras de Enero mencionan que va una producción total de 3, 153 toneladas de carne de caprino (SIAP, 2018).

En cuanto a la producción por estados, podemos mencionar que en el estado de Zacatecas, se producen 1, 986 toneladas. Hablando de la producción de leche de cabra para el año 2017 se obtuvo un total de 162, 322 toneladas (SIAP, 2017), y para lo que va del año 2018, cifras de Enero mencionan que va una producción total de 12, 715 litros de leche (SIAP, 2018). Dentro de los Estados de la República que producen la mayor cantidad de litros de leche de cabra, se encuentra Guanajuato, que hasta lo que va del año 2018 ha obtenido un total de 18, 001 litros; aunado a lo anterior, se puede mencionar que Nuevo León se encuentra en el noveno lugar con una producción a lo que va del año de 1, 541 litros.

2.2. Antecedentes de fertilización *in vitro* en pequeños rumiantes

El conocimiento y uso de las tecnologías reproductivas ha aumentado a nivel mundial a lo largo de la segunda mitad del siglo XIX en la mayoría de las especies de mamíferos domésticos. Las tecnologías de la primera generación

(sincronización del estro, recolección del semen, congelación del semen e inseminación artificial) ahora se usan comúnmente en la reproducción de las especies domésticas. La segunda generación de estas técnicas reproductivas se ha introducido y su uso ha aumentado de forma prometedora hasta principios de los noventa. Esta generación incluyó técnicas basadas en embriones, es decir, superovulación de hembras, recuperación de embriones, congelación y transferencia a receptoras (Mermillod *et al.*, 2006).

Desde que Brackett y sus colaboradores (1982) informaron el primer nacimiento de un ternero después de llevar a cabo la técnica de fertilización *in vitro*, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios para desarrollar esta técnica en animales de granja, debido a la posible aplicación de esta tecnología a la producción animal. En cabras, el primer cabrito nacido mediante fertilización *in vitro* de ovocitos aspirados fue informado en 1985 por Hanada y el primer cordero en 1986 por Cheng y sus colaboradores. A pesar de los muchos estudios realizados sobre la producción de embriones *in vitro* en los últimos 30 años, los resultados obtenidos son todavía bajos e inconsistentes (Paramio e Izquierdo, 2016). En cabras y ovejas, hay relativamente pocos estudios en esta área, pero el porcentaje de blastocistos oscila entre el 20 y 30% aproximadamente (Paramio e Izquierdo, 2014). En ovejas, Crozet y sus colaboradores (1993) después de llevar a cabo la técnica de FIV y cultivo *in vivo* (en conejas pseudopreñadas) obtuvieron 67 y 62% de embriones de ovocitos aspirados y madurados *in vitro*, respectivamente. Además, estos investigadores obtuvieron el nacimiento de un cordero normal y saludable del procedimiento de FIV. Más tarde, este grupo informó una tasa de gestación del 50% y el nacimiento de 26 corderos de 124 cigotos de ovocitos mediante esta técnica.

En cabras, Younis y sus colaboradores (1991) y un año después, DeSmedt y sus colaboradores (1992) informaron que el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la metafase II *in vitro* fue del 90% aproximadamente y también comentaron que se podían alcanzar altas tasas de fertilización con ovocitos madurados *in vitro*, aunque un alto porcentaje de cigotos mostraban asincronía en la formación pronuclear y alta fertilización poliespermica. Crozet *et al.* (1993) informaron el nacimiento del primer cabrito de un ovocito madurado y fertilizado *in vitro* y Cognié y sus colaboradores (1995) informaron del primer cabrito nacido después de haber llevado a cabo el procedimiento *in vitro*. La producción de embriones *in vitro* es una metodología de varios pasos que comprende los siguientes procedimientos: (i) Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos recuperados directamente de folículos, (ii) Fertilización *in vitro* (FIV) o co-incubación de espermatozoides con ovocitos madurados *in vitro* y (iii) cultivo *in vitro* (CIV) de cigotos hasta la etapa de blastocisto. En esta etapa, el blastocisto podría transferirse directamente a una hembra receptora o criopreservarse para futuro uso.

De acuerdo con la Asociación Europea de Transferencia de Embriones (AETE), en cabras y ovejas, el número de embriones transferibles fue 406 y 265, respectivamente, Francia es el país con el mayor número registrado. Los datos de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) confirmaron esta tendencia a la actividad embrionaria en todo el mundo. La baja actividad comercial de embriones de los pequeños rumiantes observada en Europa también se refleja en los datos de la IETS. Según la IETS en el año 2016, solo trece países informaron la transferencia de embriones en ovejas con Australia liderando el camino con más de 1107 lavados y más de 5000 embriones

recolectados. Sudáfrica, México y Argentina informaron más de 100 lavados cada uno. En cuanto a embriones producidos *in vivo* en el caso de caprinos lideran los Estados Unidos con un total de 253 lavados, seguido por Nueva Zelanda, con un total mundial de 465 lavados, obteniendo un gran total de 3100 embriones transferibles. En cuanto a embriones producidos *in vitro* podemos mencionar que solo se obtuvieron un gran total de 207, de los cuales solo se transfirieron 98 (IETS, 2016). Hay pocas investigaciones sobre tecnologías de reproducción asistida en pequeños rumiantes, como se había mencionado anteriormente en comparación con otras especies de ganado tales como bovinos y cerdos. Sin embargo, en los últimos años, se han realizado investigaciones importantes en estudios de embriones en pequeños rumiantes debido a la creciente importancia de estos animales en países con rápido desarrollo económico como China e India y también por el creciente interés en los pequeños rumiantes, principalmente en las cabras, como animales para expresar proteínas recombinantes en la leche (Paramio e Izquierdo 2014).

2.3. Metodologías de estimulación ovárica en pequeños rumiantes.

En los pequeños rumiantes, la emergencia de un folículo antral grande ocurre en diferentes ondas durante el ciclo reproductivo, de dos a cuatro en cabras (De Castro *et al.*, 1999) y de dos a tres en ovejas (Evans *et al.*, 2000). La selección de folículo (s) ovulatorio (s) puede ocurrir durante la última onda folicular, mientras que los otros folículos se vuelven atrésicos (De Castro *et al.*, 1999). Se pueden recuperar ovocitos competentes de estos folículos para la producción de embriones *in vitro* antes de que ocurra la atresia.

La competencia de desarrollo de los ovocitos aumenta con el tamaño folicular, y una estrategia para mejorar el número de embriones por hembra se basa en una presión de selección decreciente durante la foliculogénesis para maximizar el número de folículos antrales grandes (Souza-Fabjan *et al.*, 2014). Se han evaluado diferentes protocolos de estimulación hormonal para mejorar la cantidad, la calidad y la capacidad de desarrollo de los ovocitos de hembras sometidas a aspiración folicular (Gibbons *et al.*, 2008). La estimulación hormonal antes de la recolección de ovocitos se utiliza para aumentar el número de folículos ováricos y ovocitos recuperados (Morton *et al.*, 2005b) obtener ovocitos en una fase de desarrollo sincrónica (Armstrong *et al.*, 1997) e incrementar el desarrollo de ovocitos *in vitro* (Morton *et al.*, 2005b). Para la sincronización, se han usado diferentes protocolos tanto en ovejas como en cabras y la mayoría de ellos se basan en tratamientos de sincronización del estro, principalmente progesterona o dispositivos intravaginales que contienen progesterona (por ejemplo, CIDR-G, esponjas) . Por lo general, los dispositivos se aplican durante 9-11 días junto con una dosis luteolítica de PGF2 α o un análogo, al momento del inicio del tratamiento con gonadotropina. Por lo tanto, los folículos más pequeños presentes en el ovario al final del tratamiento con progestágenos pueden ser estimulados por la administración de gonadotropinas exógenas purificadas como FSH o eCG, aumentando la supervivencia del folículo (Texeira *et al.*, 2011).

Esta estrategia debe usarse en momentos precisos durante el surgimiento de ondas foliculares, cuando la supervivencia del folículo depende de la FSH. Por lo tanto se evaluaron dos estrategias principales en pequeños rumiantes. La primera se refiere a la administración de gonadotropina antes de la aspiración

folicular por AOL en un momento aleatorio del ciclo reproductivo (Stangl *et al.*, 1999). Sin embargo, esto parecía no satisfactorio con respecto a la prevención de la atresia (Jablonka-Shariff *et al.*, 1996), ya que este evento pudiese haber ocurrido para una población folicular. La segunda y más utilizada estrategia en la actualidad representa la asociación del tratamiento con progestágenos y las gonadotropinas. Su liberación constante y continua está garantizada por la administración de esponjas intravaginales impregnadas de progestágeno y/o progesterona (fluorogestona, medroxiprogesterona acetato o liberación controlada del fármaco interno) que inhiben la secreción endógena de LH, permitiendo la regresión del folículo (s) dominante (s) por atresia.

Se han evaluado diferentes intentos de estimulación hormonal para mejorar la cantidad y calidad de los ovocitos de las hembras sometidas a la AOL (Gibbons *et al.*, 2008), las gonadotropinas que se han utilizado para superovular cabras adultas son la hormona estimulante del folículo porcino u ovino (FSH) (Lehloenya, 2013) la gonadotropina coriónica equina (eCG) (Goel y Agrawal, 2005), y/o un régimen denominado “one-shot” (FSH+ eCG) (Baldassarre *et al.*, 2002).

2.4. Factores que afectan la respuesta a la estimulación ovárica

Los protocolos que se llevan a cabo para la superovulación se utilizan ampliamente para mejorar el número de crías de hembras seleccionadas (Morand-Fehr y Boyazoglu, 1999). En los pequeños rumiantes, las técnicas de superovulación generalmente incluyen la administración de un tratamiento con

gonadotropinas superovulatorias, durante los últimos días de un tratamiento con algún dispositivo, el cual, contiene un progestágeno.

Las gonadotropinas exógenas se han utilizado para este fin, ya que los primeros estudios (hace 60 años) mostraron su efectividad para inducir gestaciones múltiples (Casida *et al.*, 1944, citado por González-Bulnes *et al.*, 2004). Los primeros tratamientos superovulatorios incluyeron el uso de gonadotropina coriónica equina (eCG), sin embargo altas dosis de eCG causaron una respuesta ovulatoria baja y muy variable y una gran incidencia de quistes ováricos en la producción de embriones (Cran, 1983). Por lo tanto, la eCG fue reemplazada posteriormente por extractos hipofisarios que contienen FSH. Sin embargo, estas preparaciones también contenían LH y otros factores no identificados que afectan la producción de embriones (Murphy *et al.*, 1984). Una alta variabilidad en la tasa de ovulación en respuesta a la superovulación, y un número variable y bajo de embriones transferibles recuperados, entre tratamientos y entre individuos en el mismo grupo de tratamiento son los principales factores limitantes para el uso práctico de la superovulación (González-Bulnes *et al.*, 2004). Esta variabilidad se ha relacionado clásicamente con factores extrínsecos (fuente, pureza de las gonadotropinas y el protocolo de administración) e intrínsecos (raza, edad, nutrición y estado reproductivo, Baril *et al.*, 1993).

La administración de tratamientos con gonadotropinas superovulatorias induce un gran aumento en el número de folículos que crecen en etapas preovulatorias. La administración de FSH en los protocolos superovulatorios clásicos, con inyecciones cada 12 h, comienza a modificar la población folicular entre las 12 y 24 h después de la primera dosis. Los cambios en la población folicular en pequeños rumiantes en respuesta a la superovulación pueden estar

relacionados con un aumento en el número total de folículos ≥ 2 mm, debido a un mayor reclutamiento de folículos durante las primeras 36 h de tratamiento y una tasa de regresión más baja desde las 24 h. La mayoría de los folículos crecen en diámetro de 2 a 5 mm de 12-24 a 48 h y alcanzan la etapa preovulatoria entre las 48 y 60 h (González-Bulnes *et al.*, 2004). El patrón de crecimiento difiere con las preparaciones de FSH y el protocolo de administración; sin embargo, una característica regular de los folículos que ovulan en diferentes protocolos superovulatorios es su tamaño más pequeño en comparación con los folículos ovulatorios no estimulados, como se describió por primera vez por Driancourt y col. (1991). Los tratamientos superovulatorios inducen el crecimiento de un gran número de folículos, pero el suministro de grandes cantidades de gonadotrofinas exógenas, necesarias para lograr una respuesta superovulatoria, ejercen, al mismo tiempo, efectos perjudiciales. La respuesta a los tratamientos superovulatorios se asocia con una alta incidencia de alteraciones en el desarrollo folicular, maduración del ovocito y de los mecanismos de la ovulación, de forma similar a la de otros rumiantes (Kafi y McGowan, 1997).

Además, algunos de los folículos estimulados para crecer por la FSH exógena pueden estar en las primeras etapas de la atresia. La administración de la gonadotropina exógena permite el arresto de la atresia temprana y el crecimiento de estos folículos (González-Bulnes *et al.*, 2002d). Sin embargo, aunque los folículos atrésicos pueden promoverse para crecer, su desarrollo es inadecuado, lo que lleva a fallas ovulatorias (Rubianes *et al.*, 1997), que pueden explicar la variabilidad observada en la tasa de ovulación. Algunas de estas alteraciones son comunes a todos los tratamientos superovulatorios, pero algunos factores

como la fuente de la preparación de gonadotropinas, su pureza y el protocolo de administración influyen en la respuesta final (González-Bulnes *et al.*, 2004).

2.5. Factores extrínsecos

2.5.1. Fuente y pureza de las gonadotropinas

Los primeros estudios sobre la influencia de las preparaciones de gonadotropinas en la respuesta ovárica describieron una gran variación asociada con la preparación comercial de FSH. Esta variabilidad es intrínseca a los agentes superovuladores en la industria del embrión, debido a factores variables como el lote de gonadotropinas usado (Wollen *et al.*, 1985) y, principalmente, el contenido de LH ampliamente variable (Lindsell *et al.*, 1986) que disminuye la respuesta ovulatoria (Torres *et al.*, 1987).

La detección ecográfica del desarrollo folicular en hembras tratadas con FSH comercial que difiere en el contenido de LH, ha demostrado que las preparaciones con alto contenido de LH aumentan la pérdida de folículos ováricos, en comparación con la FSH purificada, estimulando un mayor número de ellos para crecer sin ventaja porque presentan regresión durante el tratamiento o no pueden ovular (González-Bulnes *et al.* 2000a). El aumento en el número de folículos atrésicos puede estar relacionado con los aumentos en las concentraciones de LH en plasma, que causan una alteración en el mecanismo que previene la atresia (Nöel *et al.* 1994), o una saturación de los receptores de LH en células de la teca y/o de la granulosa (Boland *et al.*, 1991). Aunque se requiere una mínima concentración de LH para la ovulación, altas concentraciones de la misma, durante periodos prolongados antes del aumento

de LH en vaquillas (Torres *et al.*, 1987) y ovejas (Driancourt *et al.*, 1990) alteran el pico de LH (Taft *et al.*, 1996) y/o la capacidad de los folículos para ovular, sin cambios en los procesos previos de reclutamiento y crecimiento (Rubianes *et al.*, 1995), por tanto estas observaciones han favorecido el uso de gonadotropinas altamente purificadas. Sin embargo, cantidades excesivamente bajas de LH al final del tratamiento también indujeron tasas de ovulación más bajas. Aunque algunos autores no informan diferencias (Wright *et al.*, 1981), otros indican que los tratamientos con LH pura, durante un tratamiento superovulatorio con una relación conocida de FSH/LH disminuyen la variabilidad en la respuesta ovulatoria (Cognié, 1999).

2.5.2. Protocolo de administración de las gonadotropinas

Informes de finales de la década de 1980 e inicios de 1990 mostraron que la respuesta superovulatoria estaba estrechamente relacionada tanto con el número de inyecciones (Rexroad y Powell, 1991) como con el protocolo utilizado (dosis constantes o decrecientes; Hoffman *et al.*, 1988).

En estudios preliminares, realizados, para comparar por análisis de varianza (ANOVA) la eficacia de los tratamientos superovulatorios decrecientes y constantes mostraron rendimientos muy similares. Sin embargo, la tasa media de ovulación y el promedio de embriones recuperados y viables es mayor en el grupo tratado con dosis decrecientes. Esto puede deberse a diferencias en el patrón de desarrollo del folículo durante la estimulación escalonada de la FSH en comparación con un régimen constante (González-Bulnes *et al.*, 2002c). El número de folículos en crecimiento mejoró en las ovejas tratadas con dosis

decrecientes. Este hecho condujo a un mayor número de folículos ovulatorios, con el aumento de la capacidad de ovulación, por lo que la tasa de ovulación también fue más alta (18.2 cuerpos lúteos (CL) vs. 9.0 CL para dosis constantes).

Se puede hipotetizar que el uso de dosis decrecientes de FSH se acerca más a los cambios endocrinos en la secreción pituitaria durante la fase folicular de los ciclos de estruales no estimulados. La concentración de FSH disminuye después de la luteólisis, suprimida por la secreción creciente de estradiol e inhibina de los folículos preovulatorios (Baird y Mc Neilly, 1981), siendo mínimo 1-2 días antes del estro (Miller *et al.*, 1981). De esta forma, las concentraciones de FSH disminuyen más durante la fase folicular temprana en ovejas con altas tasas de ovulación (Avdi *et al.*, 1997). La administración de dosis altas de FSH exógena en la fase folicular temprana puede provocar atresia de los folículos grandes (López-Sebastián *et al.*, 1999), lo que explicaría la alta incidencia de fallas en la ovulación descrita para dosis constantes (González-Bulnes *et al.*, 2000a).

2.5.3. Variabilidad asociada con el uso de progestágenos

Los protocolos para la ovulación múltiple, incluyen la administración de un tratamiento superovulatorio de FSH durante los últimos días de un tratamiento con progestágenos. La administración de progestágenos deprime la secreción de LH (Goodman y Karsh, 1980) y, mantenidos durante 14 días en ovejas y 16 días en cabras, podrían asegurar la aparición espontánea de la luteólisis antes de la extracción del progestágeno y permitir con ello, la inducción del celo, el aumento de LH y la ovulación en de una manera controlada independientemente de la temporada o la etapa del ciclo cuando se aplica (Robinson, 1967).

Sin embargo, los tratamientos con progestágenos han sido identificados como agentes causales de alteraciones tanto a nivel sistémico, en patrones de liberación de LH (Scaramuzzi *et al.*, 1988), como a nivel ovárico, en patrones de crecimiento y dominancia folicular (Leyva *et al.*, 1998). Las concentraciones plasmáticas de progesterona aumentan durante las primeras 48 horas después de la inserción del dispositivo (Greyling *et al.*, 1994), comienzan a disminuir posteriormente y alcanzan concentraciones demasiado bajas para simular la actividad del cuerpo lúteo al final del tratamiento (Robinson, 1967). De esta forma, el protocolo con progestágenos no suprime la LH hasta el nivel alcanzado durante la fase lútea (Kojima *et al.*, 1992) y conduce a un desarrollo folicular inadecuado, con folículos estrogénicos grandes persistentes (Flynn *et al.* 2000). La persistencia de folículos envejecidos en su fase estática o atresia temprana se ha descrito principalmente durante fases lúteas con bajos niveles de progesterona; la ovulación de estos folículos produjo una disminución de la fertilidad (Viñoles *et al.*, 2001) en algunos estudios, pero no en otros. El mismo efecto se describió en bovinos (Mihm *et al.*, 1994) y estudios posteriores establecieron una relación con alteraciones en la competencia del desarrollo del ovocito (Mihm *et al.*, 1999) y/o alteraciones del ambiente uterino (Binelli *et al.*, 1999). Estos efectos se incrementan en los protocolos de superovulación en los que concentraciones insuficientes del progestágeno al final del tratamiento inducen una alta variabilidad en el inicio del estro y el pico de LH entre animales en el mismo grupo de tratamiento (Gaston-Parry *et al.*, 1988), causando error de sincronización entre el tratamiento superovulatorio y la ovulación (Scudamore *et al.*, 1993), fallas ovulatorias (Kafi y McGowan, 1997) y anomalías en la capacidad

de desarrollo de los ovocitos o en las alteraciones de los procesos normales de fertilización y desarrollo temprano de los embriones (Greve *et al.*, 1995).

2.6. Factores intrínsecos

Los principales factores de las hembras que afectan la respuesta superovulatoria están relacionados con la raza, la edad, la nutrición y el estado reproductivo. La genética se identificó tempranamente como un factor que puede contribuir a la variabilidad ovulatoria (Bindon *et al.*, 1986) y, como regla general, las razas prolíficas muestran mejores respuestas superovulatorias (Dufour *et al.*, 2000). Sin embargo, las diferencias no son tan extremas entre razas no prolíficas (Picazo *et al.*, 1996).

En contraste, se ha descrito una alta variabilidad entre individuos de la misma raza, incluso con gemelos (Wiemer *et al.*, 1988). Sin embargo, en ganado, estas diferencias en la respuesta no son tan altas en el mismo animal en tratamientos sucesivos (Monniaux *et al.*, 1983). La influencia de la edad en los rendimientos superovulatorios es clara y está determinada por el hecho de que la edad afecta la tasa de ovulación espontánea natural (Theriez *et al.*, 1971) y los mejores resultados embrionarios se encontrarán aproximadamente a los 6 años (Torres *et al.*, 1987). Las hembras prepúberes pueden ser inducidas a superovular porque los folículos son sensibles a las gonadotropinas (Driancourt *et al.*, 1990b), pero la tasa de ovulación es más baja que en las hembras adultas (Driancourt y Avdi, 1993). La relación entre la nutrición y el resultado embrionario no se ha establecido de forma manifiesta, porque las diferencias en la tasa de ovulación no han sido significativas (Doney *et al.*, 1981), pero la nutrición inadecuada

puede comprometer la competencia del folículo y por consiguiente del ovocito (O'Callaghan *et al.*, 2000), función lútea (Jabbour *et al.*, 1991) y el desarrollo de embrionario (Abecia *et al.*, 1997). Se han encontrado respuestas ovulatorias más bajas y disminución de la calidad de los embriones y los ovocitos en animales alimentados con dietas *ad libitum* en comparación con las hembras con dietas bajas y de control (Lozano *et al.*, 2003).

El estado reproductivo también tiene un papel clave en la eficacia de los tratamientos superovulatorios. La influencia de la estación y el fotoperíodo es bien conocida en las razas de latitudes altas (Gherardi y Lindsay, 1980), que afectan la viabilidad de la superovulación (Mitchell *et al.*, 2002a, 2002b), pero no hay diferencias entre los animales ciclando o en anestro en las zonas templadas (González-Bulnes *et al.*, 2003a). Debiendo mencionar, que el anestro posparto también puede disminuir la respuesta a los tratamientos superovulatorios (Driancourt y Avdi, 1993).

2.6.1. Presencia de un folículo dominante

Se ha informado que la presencia de un folículo en crecimiento en el momento de aplicar una dosis superovulatoria de eCG (Rubianes *et al.*, 1995) o FSH (López-Sebastián *et al.*, 1999) disminuye la respuesta ovárica, aunque un efecto directo sobre folículos grandes en la respuesta superovulatoria a la eCG no se ha observado cuando se realizaron estudios *in vitro* (Driancourt *et al.*, 1991). En contraste, la presencia de un folículo grande no afectó la tasa de ovulación cuando se aplicaron varias dosis de FSH al aplicarlas conjuntamente con un progestágeno (González-Bulnes *et al.*, 2000a). Esta controversia puede estar

relacionada con posibles alteraciones en los patrones de crecimiento folicular inducidos por la administración de varias dosis de FSH y/o por el uso de progestágenos (Leyva *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque la tasa de ovulación no se ve afectada, tanto el número como la viabilidad de los embriones recuperados disminuyen por la presencia de un folículo dominante (González-Bulnes *et al.*, 2002d). Entonces, el objetivo final del tratamiento superovulatorio, lograr la mayor cantidad de embriones de calidad, se ve afectado en última instancia. El efecto de la dominancia folicular en ovejas y cabras es controvertido. Los patrones de desarrollo folicular ovárico se describen mejor en ovejas y se caracterizan por la aparición de folículos antrales que crecen continuamente hasta que ovulan o se vuelven atrésicos (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Durante toda la vida reproductiva, se reclutan diferentes cohortes de folículos para reanudar el crecimiento y desarrollo en un proceso dependiente de FSH (McNeilly *et al.*, 1991).

Los folículos más grandes de la cohorte secretan altas cantidades de inhibina y estradiol, causando concentraciones disminuidas de FSH y la atresia de folículos más pequeños (Tsonis *et al.*, 1988). El mecanismo de dominancia en ovejas y cabras es diferente del reportado para las vacas (Ginther *et al.*, 1989), en el que el folículo dominante inhibe el crecimiento de otros folículos en la cohorte e impide la aparición de nuevos folículos (Fortune, 1994). En las ovejas, el folículo preovulatorio inhibe el crecimiento de otros folículos presentes en los ovarios en el momento de la emergencia. Sin embargo, la aparición de nuevos folículos en crecimiento disminuyó, pero no se inhibió, aunque se suprimió su posterior crecimiento (González-Bulnes *et al.*, 2001). El folículo dominante evita su propia regresión al cambiar su dependencia de FSH a LH (Campbell *et al.*, 1998). Sin

embargo, cuando las concentraciones de LH permanecen bajas, los folículos grandes se vuelven críticamente dependientes de FSH sin establecer la dominancia. Este efecto, inducido por la disminución de LH, explica los efectos supresores de la progesterona del cuerpo lúteo en los folículos dominantes en ovejas (Adams, 1999) y cabras (Menchaca y Rubianes, 2002). Hay una falta de dominancia durante la fase lútea del ciclo del ovino, pero después de la luteólisis, cuando la secreción de LH aumenta por la secreción incrementada de estradiol de los folículos preovulatorios (Baird, 1983), el efecto de dominancia se hace evidente (González-Bulnes *et al.*, 1999b). Los efectos supresores de la progesterona y los progestágenos (Leyva *et al.*, 1998) sobre la expresión de los efectos de la dominancia pueden explicar la falta de diferencias en la tasa de ovulación descrita anteriormente.

2.6.2. Presencia de un cuerpo lúteo

El número y la calidad de los embriones obtenidos de ovejas superovuladas con varias dosis de FSH al final de un tratamiento con progestágenos se vieron afectados no solo por la población folicular presente en los ovarios al inicio del tratamiento con FSH, sino también por la presencia o ausencia de un cuerpo lúteo (González-Bulnes *et al.*, 2002b). La ausencia de un cuerpo lúteo ejerce un efecto negativo sobre la viabilidad de los embriones al aumentar la tasa de degeneración; pero también existe una interacción con la presencia de folículos grandes, el efecto de dominancia sobre la recuperación y las tasas de viabilidad son más altos en ausencia de cuerpos lúteos.

Estas diferencias pueden ser inducidas por factores relacionados con el protocolo de sincronización. Los tratamientos con progestágenos utilizados durante los protocolos superovulatorios, como se describió anteriormente, son la causa de alteraciones en los patrones de crecimiento y dominancia folicular (Leyva *et al.*, 1998). Estos cambios se modifican por el entorno lúteo al momento de la inserción del progestágeno. La práctica común es la inserción de esponjas, las cuales contienen un progestágeno en un grupo de hembras en el que no se conoce el estadio del ciclo estral de cada una. Habría hembras con niveles supra-luteales (progestágeno de la esponja más progesterona endógena del cuerpo lúteo) y hembras con niveles sub-luteales de progestágenos (solo progestágeno de la esponja) que dependen del tratamiento. La actividad y la duración de vida de los folículos grandes se acortan cuando la esponja se aplica en presencia de un cuerpo lúteo y se alarga en ausencia de un cuerpo lúteo (Leyva *et al.*, 1998). Este hecho explicaría la mejor respuesta reportada cuando se usan dos esponjas consecutivas para sincronizar el ciclo en los protocolos superovulatorios. Sin embargo, incluso cuando se mantuvo una dosis elevada de progestágeno durante todo el tratamiento, existen diferencias entre las hembras en las que se insertó la esponja en una fase lútea temprana a media y las hembras a las que se insertó la esponja en una fase lútea media o tardía o en la fase folicular.

2.7. Metodologías para la recolección de ovocitos en pequeños rumiantes

La recolección de ovocitos de buena calidad es el primer paso para la producción de embriones *in vitro*. Estos se pueden obtener de hembras vivas o post mortem.

- Ovocitos recuperados de hembras post mortem: en estos casos, los ovocitos son obtenidos por aspiración, corte o por disección del folículo. En ovarios de cabras adultas, convencionalmente, los ovocitos se recuperan por aspiración folicular seleccionando folículos más grandes de 3 mm de diámetro (Souza-Fabjan *et al.*, 2014)
- Ovocitos recuperados de hembras vivas: las técnicas utilizadas son la aspiración de folículos después de la exposición quirúrgica del ovario mediante laparotomía, mediante la aspiración de ovocitos por laparoscopia (AOL) y mediante la técnica de aspiración guiada por ecografía transvaginal (TUGA) (Graff *et al.*, 1999).

2.7.1. Aspiración de ovocitos mediante laparotomía.

La aspiración de ovocitos mediante laparotomía, se realiza bajo anestesia general, por lo tanto, las hembras deben ser privadas de alimento y agua durante un periodo de 24 a 36 h, antes de la laparotomía. En pequeños rumiantes la sedación y anestesia eficiente se realiza con xilazina y ketamina (Avelar *et al.*, 2012). Una vez anestesiado, el animal es colocado en la clásica camilla laparoscópica (Evans y Maxwell, 1987), se rasura y desinfecta la zona abdominal inmediatamente craneal a la ubre.

El animal es colocado cabeza abajo en un ángulo aproximado de 45-60 grados respecto de la horizontal, de tal modo que los órganos digestivos se recuesten sobre el diafragma y permitan visualizar el tracto reproductivo de la hembra (Silva *et al.*, 2012). Los ovarios se exponen mediante laparotomía medio ventral, y los ovocitos se aspiran con una jeringa de 5 ml equipada con una aguja de calibre 20 (Ptak *et al.*, 1999). Sin embargo, este método presenta la desventaja de

generar adherencias, evitando repeticiones del mismo (Souza-Fabjan *et al.*, 2014).

2.7.2. Aspiración de ovocitos mediante laparoscopia

La aspiración de ovocitos mediante laparotomía, se realiza bajo anestesia general, por lo tanto, las hembras deben ser privadas de alimento y agua durante un periodo de 24 a 36 h, antes de la laparotomía. En pequeños rumiantes la sedación y anestesia eficiente se realiza con xilazina y ketamina (Avelar *et al.*, 2012). Una vez anestesiado, el animal es colocado en la clásica camilla laparoscópica (Evans y Maxwell, 1987), se rasura y desinfecta la zona abdominal inmediatamente craneal a la ubre. El animal es colocado cabeza abajo en un ángulo aproximado de 45-60 grados respecto de la horizontal, de tal modo que los órganos digestivos se recuesten sobre el diafragma y permitan visualizar el tracto reproductivo de la hembra (Silva *et al.*, 2012). Se administra de manera lidocaína local en los sitios de punción de los trócares y se realizan tres pequeñas incisiones (3-5 mm) con un bisturí. Se inserta el endoscopio en la cavidad abdominal a través de un trocar, craneal a la ubre y a la izquierda de la línea media. Este trocar está conectado a un tanque de CO₂ que permite insuflar la cavidad abdominal.

Una vez que se expande la cavidad abdominal, se inserta un segundo trocar en el lado derecho (opuesto al primero) del abdomen para la introducción de pinzas de agarre a traumáticas. Los cuernos uterinos se manipulan suavemente para permitir la visualización de cada ovario estimulado. Las pinzas de agarre a traumáticas se utilizan para estabilizar el mesovario, lo que permite al técnico

girar el ovario en diferentes direcciones para un mejor posicionamiento, visualización y aspiración del folículo. Para evitar daños, el agarre del pedículo vascular ovárico debe realizarse con cuidado y se debe evitar la torsión excesiva. El último trocar se inserta en la línea media para pasar la aguja de aspiración de los ovocitos. El objetivo es ingresar al folículo desde el costado, con la aguja en dirección paralela a la base del folículo, si no es posible, la punción debe ser perpendicular a la pared del folículo. Una vez que la aguja está dentro del folículo, se debe girar suavemente para asegurarse de que se aspire la mayor cantidad de contenido folicular posible (Baldassarre *et al.*, 1994). Todos los folículos de más de 2 mm de diámetro, visibles en la superficie de los ovarios, se aspiran con una aguja conectada a un sistema de aspiración y enjuague. Finalmente, los orificios de los trocares se tratan con una solución local de cicatrización la cual debe contener antibióticos. Este procedimiento es menos estresante, menos invasivo, tiene una duración más corta (cada sesión toma entre 10 y 20 minutos en cabras y ovejas) y puede repetirse a intervalos cortos sin afectar la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Texeira *et al.*, 2011).

2.7.3. Técnica de aspiración transvaginal guiada por ultrasonido

Así mismo como en las técnicas anteriormente descritas, está se realiza bajo anestesia general, por lo tanto, las hembras deben ser privadas de alimento y agua durante un periodo de 24 a 36 h, antes del procedimiento (Avelar *et al.*, 2012), ya que es esencial que las hembras presenten un rumen vacío para una efectiva manipulación transabdominal y rectal del tracto reproductivo.

La hembra anestesiada se coloca y se asegura en una cama de sujeción hecha a la medida en recumbencia dorsal. La mesa se inclina en un ángulo de 45°, el recto de la donante se evacua manualmente y el área perineal, cola y la base de la cola se rasuran. El área rasurada se lava a fondo con un jabón antibacteriano y se enjuaga con etanol al 70% en preparación para el procedimiento de aspiración. Se utiliza un transductor vaginal de 5 MHz y 280 mm de longitud acoplado a una unidad de ultrasonografía. Se coloca una sonda de látex sobre el transductor vaginal. Se aplica lubricante estéril en el interior y en la superficie exterior de la cubierta de la sonda de látex. El técnico, usando guantes quirúrgicos de látex, inserta los dedos medio e índice de la mano izquierda en el recto e identifica la vejiga y el ligamento intercournal del útero. Los ovarios se localizan inmediatamente de forma caudolateral a la izquierda y a la derecha del ligamento intercournal o al fondo de la vejiga, posteriormente el ovario seleccionado se inmoviliza caudalmente entre los dedos medio e índice al permitir que el ligamento ovárico suspensivo pase entre los dos dedos. El procedimiento de aspiración folicular se realiza con una aguja de acero inoxidable de lumen único de calibre 17 (280 mm de longitud). Un tapón de dos aberturas de silicona estéril, con dos tubos separados (uno conectado a la bomba de succión y el otro a la aguja de aspiración), se acopla firmemente a un tubo de centrífuga de polipropileno desechable de 15 ml estéril para la recuperación del fluido folicular y ovocitos. Una vez que se localiza el ovario y se estabiliza entre los dedos en el recto y se verifica la presión de vacío de aspiración, el transductor que contiene la aguja de aspiración se introduce en la vagina y se mantiene firme con la mano derecha del operador. La aguja de aspiración encaja en una guía de aguja que se coloca en el lado dorsal del

transductor del ultrasonido en un ángulo fijo. El ovario retraído caudalmente se coloca firmemente contra la superficie de exploración del transductor del ultrasonido, de modo que la línea de punción (que se muestra en la pantalla del monitor) corte transversalmente un folículo a través de su eje más largo.

Los folículos llenos de líquido aparecen como esferas hipoecoicas negras en la pantalla del monitor del ultrasonido. Cuando la imagen del folículo se asegura en la línea de punción, un segundo técnico prepara la punción folicular. La aguja se empuja hacia adelante con precaución a través de la cubierta de látex estéril hasta que se encuentra resistencia (aguja contra la pared anterior de la vagina). La aguja se introduce más a través de la pared anterior en un folículo posicionado con movimientos de rotación delicado. Justo antes de la punción del folículo, el segundo técnico inicia la presión negativa para evitar la pérdida involuntaria de líquido folicular. Cuando la punción se realiza correctamente, se observa un colapso lento del folículo en la pantalla del monitor del ultrasonido. Si los folículos adicionales adyacentes al primer folículo se colocan de forma óptima en la línea de punción, también se punzan sin retirar la aguja del ovario. Se mantiene la presión negativa en la línea de aspiración desde el momento en que la aguja de aspiración ingrese al ovario hasta que se retire y se enjuague con medio de recolección de ovocitos (Graff *et al.*, 1999).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en el km 17.5 de la carretera Zuazua-Marín, Marín, Nuevo León. (25° 53' N, 100° 2' O, con una altitud de 400 msnm) y en el Centro de Biotecnología Reproductiva de la UGRNL, ubicado en el km 1, General Bravo, Nuevo León (25° 36' N, 99° 13' O, con una altitud de 400 msnm).

3.2. Animales experimentales

Para la presente investigación, se tuvo la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL (acta nr. 018). El estudio se llevó a cabo en noviembre y diciembre de 2016 (época reproductiva). Se utilizaron 29 cabras jóvenes (6 Nubia, 15 Alpina y 8 Saanen), con una edad promedio de 10 meses, peso vivo de 26.2 ± 0.6 Kg y una condición corporal de 2.9 ± 0.4 (escala del 0 al 5) (Hervieu *et al.*, 1991). Se alimentaron a libre acceso con un alimento que contenía un 14 % de PC y 2.3 mega calorías de energía metabolizable.

3.3. Protocolo de estimulación ovárica

Al inicio del experimento, las cabras fueron bloqueadas por peso y CC, y asignadas a uno de los 3 tratamientos siguientes: T1: 500 UI, T2: 1000 UI IM de

Gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon® 5000, Virbac®, Guadalajara, México) y T3: testigo (0 UI), aplicándose en este caso una dosis de solución salina de 3.75 mL (NaCL al 0.9%, Solución CS, PISA, Hidalgo, México). Previo a la aplicación de la eCG y 24 h post aplicación, se realizó una ecografía transrectal (SonoScape, Modelo A5V, China con transductor L761V, 11.0-5.0 MHz) para determinar el estatus ovárico, visualizando tamaño y cantidad de folículos (FL).

3.4. Aspiración de ovocitos mediante laparotomía

La metodología que se utilizó para esta parte del estudio es la descrita por Ptak *et al.* (1999). Las hembras fueron privadas de agua y alimento por un periodo de 24 h, para realizar la laparotomía (Avelar *et al.* 2012). Las cabras se sedaron con una combinación de 0.6 mg/kg/IM de clorhidrato de xilacina (Procin®, PISA, Hidalgo, México), más una dosis única de 0.5 mL/SC de sulfato de atropina (Tropigenol, Aranda, Querétaro, México), y 20 mg/kg/IM clorhidrato de ketamina (ANESKET®, PISA, Hidalgo, México).

Posteriormente se aplicó en el sitio abdominal de la incisión una dosis única de 40 mg de clorhidrato de lidocaína vía SC (Piscaina® 1%, PISA, Hidalgo, México). Las cabras fueron colocadas en posición craneal a 45° en una camilla para laparoscópica y los ovarios fueron exteriorizados a través de una incisión medio-ventral de 5 cm para realizar la aspiración de los ovocitos a través de una jeringa de 20 ml, equipada con una aguja de 18 G.

Los ovocitos fueron recolectados de folículos de 2 a 6 mm de diámetro utilizando el medio de colección BioLife™ Advantega Embryo Collection Medium (Agtech,

Manhattan, USA), adicionado con 2 mL de heparina (Inhepar®, PISA, Guadalajara, México), el cual se encontraban en baño María a una temperatura de 38.5°C. Posteriormente el contenido de la jeringa fue pasado a filtros Emcon™, donde fue filtrado utilizando el medio de colección anteriormente descrito y posteriormente se pasó a cajas cuadrículadas de búsqueda (100x15 mm) para llevar a cabo la identificación y clasificación de los ovocitos utilizando un microscopio estereoscopio Nikon SMZ645 (Nikon Transframer, Modelo XN, Japón).

Los complejos cúmulos ovocito (COC) obtenidos, se clasificaron en cinco categorías según su homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del cúmulo (Peláez, 2011), donde los ovocitos GI (grado I) presentaban más de tres capas de células de cúmulos compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado, los GII (grado II) presentaban menos de tres capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo, los GIII (grado III) tenían una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras, los desnudos (grado IV) carecían de células de cúmulo y los degenerados (grado V) presentaban un citoplasma o núcleo con coloración clara en diferentes zonas, así mismo tenían células del cúmulo desorganizadas y de un color no homogéneo. Posteriormente a la clasificación, los ovocitos fueron lavados 3 veces en medio de maduración y fueron colocados en tubos cónicos para centrifuga de 1.5 mL para enviarlos al laboratorio del Centro de Biotecnología Reproductiva, en una transportadora de ovocitos (TO 16C, WTA, Brasil). El citado transporte duró 2 horas y se mantuvo una temperatura de 38.5°C.

3.5. Maduración *in vitro*

Llegando al laboratorio, los COC fueron nuevamente clasificados, siendo lavados 3 veces y fueron pasados en grupos de más de 2 ovocitos a microgotas de 90 µl de medio de maduración, compuesto por medio de cultivo tisular TCM-199 sin HEPES 4.5 ml, suero fetal bovino (SFB) 0.5 ml, 25 mM/ml de piruvato de sodio, Amikacina 25 µg/ml, Penicilina 25 µg/ml, 0.02 UI/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 5 µg de gonadotropina coriónica humana (hCG), 1 µg de estradiol 17β (E2 17β), 30 mM de factor de crecimiento epidermal (EGF), 0.01 mM de cisteamina, cubiertos con 3690 µl de aceite mineral. (Anguita *et al.* 2009, Urdaneta *et al.* 2004). Se incubaron a 39 °C bajo atmosfera humificada con 5 % CO₂ en aire, con máxima humedad durante 24 horas (Cox y Alfaro, 2007).

3.6. Fertilización *in vitro*

Una vez que los ovocitos fueron madurados durante 24 h, se procedió a llevar acabo la fertilización *in vitro*. Los ovocitos fueron transferidos a microgotas de 90 µl de medio de fertilización. Se utilizó un solo lote de semen, de 1 solo chivo, de fertilidad comprobada, para eliminar posibles variaciones.

Los espermatozoides motiles fueron seleccionados mediante centrifugación por el método de gradiente discontinuo de Percoll (Souza *et al.* 2013), ajustando la concentración a 4×10^6 células espermáticas por ml, añadiéndose al medio un total de 10 µl de semen.

El medio de fertilización estuvo compuesto por un total de 4694 µl de medio base suplementado con 4 mg/L de (BSA), 0.33 mM de Piruvato de Sodio, 25 µg/mL de Amikacina, 25 µg/ml de Penicilina, 20 µM de Penicilamina, 10 µM de

hipotaurina, 2 μ M de Epinefrina y 5 UI/mL de Heparina, bajo aceite mineral (Souza *et al.* 2013). Espermatozoides y ovocitos fueron co-incubados de 16 a 20 horas en un rango de 38-39 °C en atmosfera humificada con 5% de CO₂ en aire (Cox y Alfaro 2007).

3.7. Cultivo *in vitro*

De 18 a 20 horas post inseminación, los posibles cigotos fueron desnudados por pipeteo para separarlos de células espermáticas y remanentes de células del cúmulo. Fueron transferidos a microgotas de 90 μ l de medio de cultivo compuesto de 5 ml de medio base suplementado con 2.77 mM de Myo-Inositol, 0.34 mM de Tris-Citrato de Sodio y 2 mM de Glutamina, bajo aceite mineral en atmosfera humificada con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N a 38.5 °C (Gardner *et al.* 1994).

Transcurridas las 24 h, se determinó el porcentaje de segmentación, el día 6 después de la FIV se realizó una lectura previa y fue en el día 7 post FIV cuando se llevó a cabo la evaluación morfológica y categorización de acuerdo al manual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS).

3.8. Análisis Estadístico

Para la cantidad de folículos antes y después de la ecografía, se utilizó un ANOVA, donde se evaluó el efecto de la raza y de la dosis de eCG así como su interacción; para las variables de ovocitos recuperados, la calidad de los mismos y la producción de embriones, se utilizó una χ^2 , utilizando el programa (SPSS-

IBM, versión 22, 2013); se consideró una diferencia significativa al nivel de $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Folículos totales y post aplicación por raza y tratamiento

Las cabras fueron bloqueadas por peso y CC, y asignadas a uno de los 3 tratamientos siguientes: T1: 500 UI, T2: 1000 UI IM de Gonadotropina coriónica equina (eCG) y T3: testigo (0 UI), aplicándose en este caso una dosis de solución salina de 3.75 ml.

Previo a la aplicación de la eCG y 24 h post aplicación, se realizó una ecografía transrectal para determinar el estatus ovárico, visualizando tamaño y cantidad de folículos (FL). Se obtuvo un efecto principal de la raza sobre la presencia de folículos totales y post aplicación de eCG ($P= 0.003$), encontrándose que las hembras Alpinas presentaron una cantidad mayor de folículos, siendo diferentes a las hembras Saanen; e intermedios para las hembras Nubias (ver Tabla 1).

Para el efecto de la aplicación de eCG, solamente se tuvo un efecto sobre la respuesta a la cantidad de folículos después de la aplicación de la hormona, tendiendo a ser estadísticamente diferentes entre las cabras Alpinas y Nubias ($P=0.02$) y no se presentó un efecto de la interacción entre ambos factores.

En cuanto al efecto de la dosis de eCG, no se presentó efecto sobre el total de folículos, sin embargo, 24 horas post-aplicación, fue significativo sobre la cantidad de folículos en las hembras a las que se les aplicaron 500 ($P=0.02$) y 1000 UI ($P<0.05$) los cuales fueron 7.3 ± 0.7 ; 7.0 ± 0.6 folículos en promedio respectivamente en comparación al testigo, el cual obtuvo en promedio 5.0 ± 0.6 folículos.

Tabla 1. Efecto de la raza y eCG, sobre el número de estructuras ováricas en cabras púberes de 10 meses, durante la época reproductiva (Medias \pm EE).

Raza	No. hembras	Total Folículos	Folículos pre eCG	Folículos post eCG
Alpina	15	177/15 (11.8 \pm 0.9) ^a	69/15 (4.6 \pm 0.4)	108/15 (7.2 \pm 0.5) ^a
Nubia	6	55/6 (9.1 \pm 1.3) ^b	19/6 (3.1 \pm 0.6)	36/6 (6.0 \pm 0.6) ^a
Saanen	8	74/8 (9.2 \pm 1.3) ^b	32/8 (4.0 \pm 0.6)	42/8 (5.3 \pm 0.6) ^b
Total		306	120	186
Tratamiento (UI eCG)				
500	9	98/9 (10.9 \pm 1.2)	32/9 (3.5 \pm 0.6)	66/9 (7.3 \pm 0.7) ^a
1000	10	116/10 (11.6 \pm 1.1)	46/10 (4.6 \pm 0.5)	70/10 (7.0 \pm 0.6) ^a
Testigo	10	92/10 (9.2 \pm 1.1)	40/10 (4.2 \pm 0.5)	50/10 (5.0 \pm 0.6) ^b
Total		306	120	186

Filas con diferente superletra (a, b) son estadísticamente diferentes (P <0.02) y (P<0.05)

4.2. Tamaño de folículos por raza y tratamiento

Por otra parte, en la gráfica 1, se presentan los resultados del efecto de la raza sobre el tamaño de los folículos, obteniéndose que, en las cabras Alpinas, se presentó un crecimiento mayor de folículos en comparación a las Nubias y Saanen respectivamente (P=0.003). Para el efecto de la dosis de eCG, se presentó un efecto significativo (P<0.001) sobre el tamaño de los folículos, siendo superior para las hembras que recibieron 1000 UI en comparación a las que se les aplicó 0 UI (testigo) y 500 UI (ver gráfica 2).

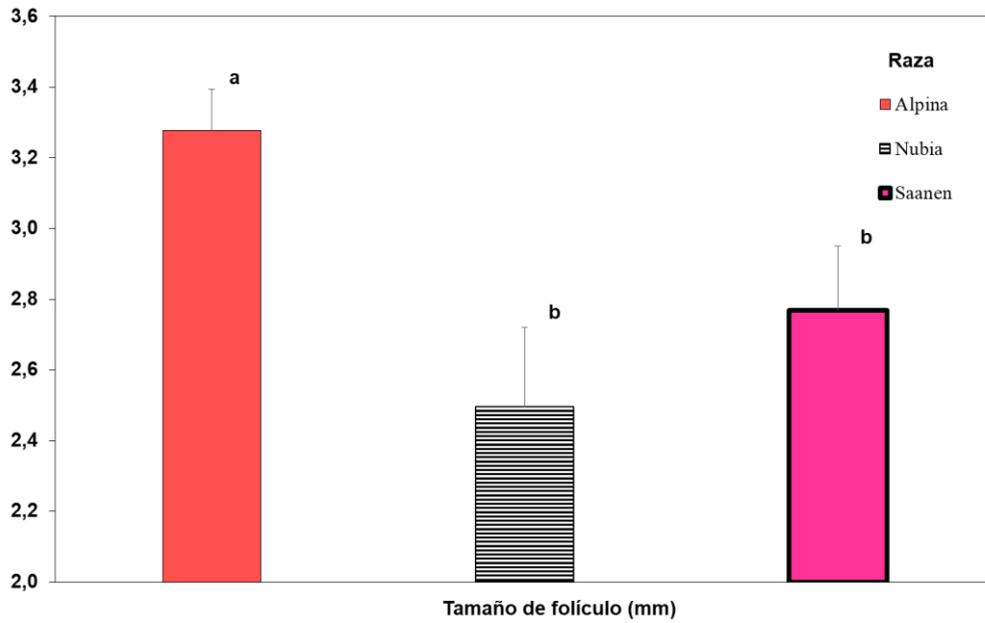


Figura 1. Efecto de la raza sobre el tamaño de los folículos en cabras jóvenes (media \pm SE) (P = 0.003).

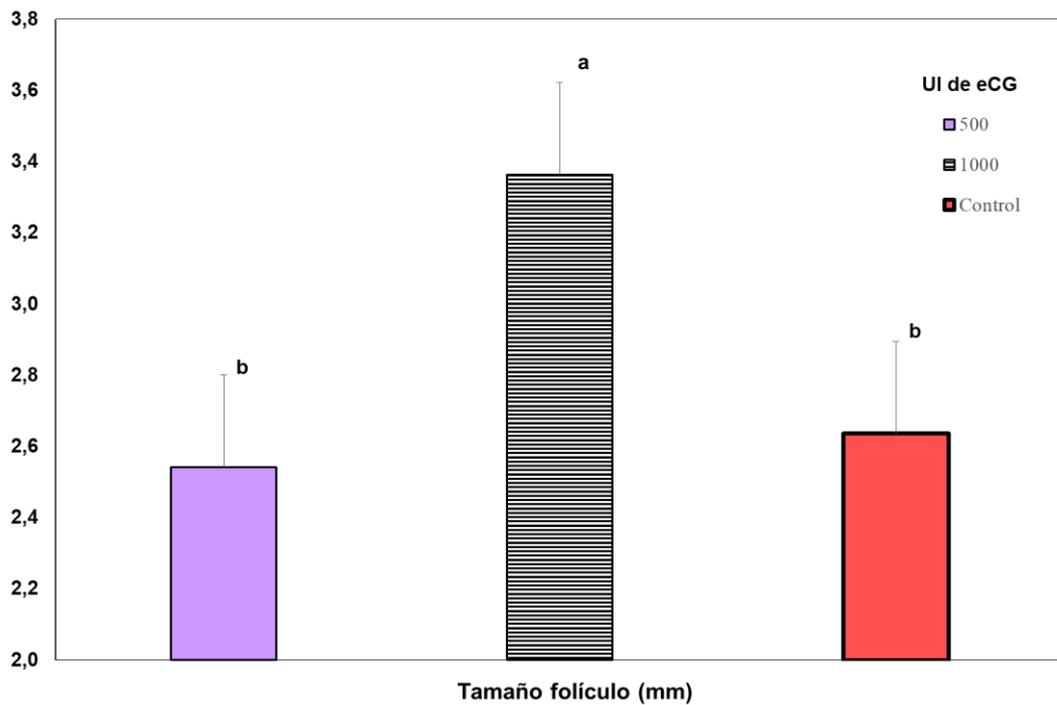


Figura 2. Efecto de la dosis de eCG sobre el tamaño de los folículos en cabras jóvenes (media \pm EE) (P < 0.001).

4.3. Tasa de aspiración y calidad de los ovocitos por raza y tratamiento

Para llevar a cabo la aspiración folicular, las cabras fueron colocadas en posición craneal a 45° y los ovarios fueron exteriorizados a través de una incisión medio-ventral de 5 cm para realizar la aspiración de los ovocitos a través de una jeringa de 20 ml, equipada con una aguja de 18 G.

Los ovocitos fueron recolectados de folículos de 2 a 6 mm de diámetro, los complejos cúmulo ovocito (COC) obtenidos, se clasificaron en cuatro categorías según su homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del cúmulo. Para el efecto de la raza sobre la calidad de los ovocitos recolectados, no se encontraron estructuras con Grado I y Grado II, sin embargo, las estructuras Grado III aumentaron en porcentaje en las 3 razas, Alpina, Nubia y Saanen, obteniéndose 18/44 (40.9%), 11/28 (39.3%) y 8/26 (30.8%), solamente se presentó un efecto sobre el porcentaje de ovocitos desnudos, siendo superiores para las cabras Saanen en comparación a las Alpinas y Nubias ($P=0.003$) (ver Tabla 2),

Asimismo, el porcentaje de ovocitos degenerados fue igual entre razas. Para el efecto de la dosis de eCG sobre la calidad de los ovocitos se encontró muy similar a lo anterior, no se encontraron estructuras Grado I, las estructuras Grado II fueron muy pocas y sin diferencias entre los 3 tratamientos, la aplicación de eCG tendió a ser diferente sobre la presencia de ovocitos GIII, siendo superiores para las hembras que recibieron 500 y 1000 UI con un 42.5 y 37.9 % en comparación al testigo el cual solo obtuvo un 31.0 % ($P=0.02$) (ver Tabla 3).

Tabla 2. Efecto de la raza sobre la tasa de recuperación y la calidad de ovocitos en cabras, dentro de estación reproductiva

Tratamiento	Raza			Prob.
	Alpina	Nubia	Saanen	
No. Hembras	15	6	8	
No. Ovocitos recuperados/No. Folículos	44/155 (28.4)	28/73 (38.4)	26/79 (32.9)	0.921
GI (%)	0/44 (0)	0/28 (0)	0/26 (0)	0.651
GII (%)	3/44 (6.8)	1/28 (3.6)	0/26 (0)	0.752
GIII (%)	18/44 (40.9)	11/28 (39.3)	8/26 (30.8)	0.515
Desnudos (%)	17/44 (38.6) ^b	13/28 (46.4) ^b	16/26 (61.5) ^a	0.003
Degenerados (%)	6/44(13.6)	3/28 (10.7)	2/26 (7.7)	0.533

Filas con diferente superletra (a,b) son estadísticamente diferentes (P=0.003).

Tabla 3. Efecto de la eCG sobre la tasa de recuperación y calidad de ovocitos en cabras jóvenes dentro de la estación reproductiva

Tratamiento	Dosis de eCG (UI)			Prob.
	testigo	500	1000	
No. Hembras	10	9	10	
No. Ovocitos recuperados/No. Folículos	29/94 (30.9)	40/122 (32.8)	29/91 (31.9)	0.912
GI (%)	0/29 (0)	0/40 (0)	0/29 (0)	0.780
GII (%)	0/29 (0)	2/40 (5.0)	2/29 (6.9)	0.310
GIII (%)	9/29 (31.0) ^b	17/40 (42.5) ^a	11/29 (37.9) ^a	0.02
Desnudos (%)	16/29 (55.2)	16/40 (40.0)	14/29 (48.3)	0.259
Degenerados (%)	4/29 (13.8)	5/40 (12.5)	2/29 (6.9)	0.299

Filas con diferente superletra (a,b) son estadísticamente diferentes (P=0.02).

4.4. Producción de embriones *in vitro* por raza y por tratamiento

El proceso *in vitro* del presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología Reproductiva (CBR) de la Unión Ganadera de Nuevo León. En cuanto a los resultados obtenidos sobre la producción de embriones *in vitro* de acuerdo a la raza, se puede ver en la tabla 4; que las cabras Alpinas respondieron mejor en el número total de embriones 7 días post FIV/Segmentación ($P=0.003$), siendo los valores más bajos para las cabras Saanen, debiendo mencionar que para las demás variables, no se presentaron diferencias estadísticas.

Tabla 4. Efecto de la raza sobre los embriones producidos *in vitro* en hembras cabras jóvenes, dentro de estación reproductiva.

Variable	Raza			Prob.
	Alpina	Nubia	Saanen	
No. Hembras	15	6	8	
Ovocitos MIV/Total ovocitos recuperados (%)	38/44 (86.4)	25/29 (86.2)	24/26 (92.3)	0.514
Segmentación/Ovocitos MIV (%)	15/38 (39.5)	11/25 (44.0)	16/24 (66.7)	0.204
Producción total 7 días post FIV/Segmentación (%)	12/15 (80.0) ^a	6/11 (54.5) ^b	1/16 (6.3) ^c	0.003
Mórula/Producción Total (%)	4/12 (33.3)	3/6 (50.0)	0/1 (0)	0.499
Blastocisto inicial/Producción Total (%)	4/12 (33.3)	2/6 (33.3)	1/1 (100.0)	0.620
Blastocisto/Producción Total (%)	4/12 (33.3)	1/6 (16.7)	0/1 (0)	0.421

Filas con diferente superletra (a,b,c)son estadísticamente diferente ($P<0.05$).

Por otra parte, para el efecto de la eCG, se presentó que, en la dosis de 500 UI, hubo una mejor respuesta para la producción total de embriones a los 7 días post FIV/Segmentación, seguido por las hembras que recibieron 1000 UI y los porcentajes más bajos para las hembras del tratamiento testigo (P=0.004). Asimismo, para las cabras que recibieron 1000 UI de eCG, se presentó el mayor porcentaje de embriones en estadio de mórula, tendiendo a ser diferente (P=0.03) en comparación a las cabras del tratamiento testigo y de 500 UI (ver Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la eCG sobre el porcentaje de embriones producidos *in vitro* en cabras jóvenes, dentro de la estación reproductiva.

Variable	Dosis eCG UI			Prob.
	Testigo	500	1000	
No. Hembras	10	9	10	
Ovocitos MIV/Total ovocitos recuperados (%)	25/29 (86.2)	35/40 (87.5)	27/29 (93.1)	0.985
Segmentación/Ovocitos MIV (%)	17/25 (68.0)	13/35 (37.1)	12/27 (44.4)	0.906
Producción total 7 días post FIV/Segmentación (%)	4/17 (23.5) ^c	9/13 (69.2) ^a	6/12 (50.0) ^b	0.004
Mórula/Producción Total (%)	1/4 (25.0) ^b	2/9 (22.2) ^b	4/6 (66.6) ^a	0.03
Blastocisto inicial/Producción Total (%)	3/4 (75.0)	3/9 (33.3)	1/6 (16.7)	0.721
Blastocisto/Producción Total (%)	0/4 (0)	4/9 (44.4)	1/6 (16.7)	0.204

Filas con diferente superletra (a,b,c)son estadísticamente diferente (P<0.05).

5. DISCUSIÓN

En general, en este estudio se presentó un efecto de la eCG sobre la producción de embriones *in vitro* de acuerdo a la dosis que se aplicó y en función de la raza. Es de los primeros trabajos desarrollados en cabras para la obtención de ovocitos y fertilización *in vitro* en México

Considerando que la aplicación de la gonadotropina coriónica equina cumplió su función de estimular la población folicular, que fue uno de los objetivos de este estudio. Considerando que son múltiples los factores que puedan afectar la respuesta a la población y desarrollo folicular, que en nuestro estudio se obtuvo un efecto de la raza sobre la presencia de folículos totales y post aplicación de eCG, encontrándose que las hembras Alpinas presentaron una cantidad mayor de folículos, en comparación con las Nubias y Saanen y es acorde a lo reportado por Rahman *et al.* (2014). La respuesta de cada animal donante al tratamiento hormonal se ve afectada por factores intrínsecos, como la raza, la edad, la condición corporal, el estado reproductivo, así como por factores extrínsecos, como el tipo de gonadotropina, el grado de pureza, dosis aplicada y protocolo (Naqvi *et al.*, 2001). Sin embargo, la aplicación de eCG puede causar variaciones en la respuesta folicular debido a diferencias genéticas entre razas (Quintero-Elisea *et al.* 2011). Se puede considerar que la respuesta a la eCG va a estar en función de la prolificidad, ya que se ha reportado que cabras prolíficas presentan un mayor número de ondas foliculares, y responden mejor a la aplicación exógena de hormonas superovuladoras, tal como lo reporta Baril *et al.* (1989).

Cabe señalar que las dosis utilizadas de eCG tuvieron un efecto menor al promedio reportado por la literatura, en cuanto a folículos encontrados 24 horas

post aplicación de la hormona. La causa de esta baja respuesta pudiera ser que las hembras no estaban en la misma fase del ciclo estrual y presentando una población folicular aleatoria, lo cual hace que la respuesta a la eCG sea diferente. Se considera importante que en estudios subsecuentes se evalúe la aplicación de eCG en cabras sincronizadas, para poder uniformizar la onda folicular (Bruno-Galarraga *et al.*, 2015).

Esto mismo va en la dirección de los resultados obtenidos para el tamaño de los folículos, tanto para el efecto de la raza como de la dosis de eCG, ya que se observó un aumento en el tamaño folicular, pudiendo esto deberse a que la eCG crea condiciones para el crecimiento folicular mediante la unión a los receptores en los folículos de FSH y LH (Baruselli *et al.*, 2004). Estos hallazgos concuerdan con lo mencionado por Salehi *et al.* (2010) quienes demostraron que la administración de eCG causó crecimiento y desarrollo de los folículos pequeños presentes en los ovarios. Así mismo el tratamiento con gonadotropina coriónica equina en ganado lechero resultó en menos folículos atrésicos, reclutamiento de folículos más pequeños (≤ 5 mm) con un aumento de la tasa de crecimiento, y crecimiento constante de folículos medianos (6-8 mm) y grandes (≥ 9 mm) (Pacala *et al.*, 2010). En el presente trabajo, la tasa de recuperación de ovocitos, estuvo dentro del rango normal a lo mencionado por Abdullah y sus colaboradores (2008) que va de un 30 a un 80%.

En cuanto a los resultados obtenidos sobre la calidad de los ovocitos, donde no se obtuvieron o fue muy bajo el número de ovocitos Grado I y II y sin embargo se observó un aumento en el número de ovocitos desnudos en los 3 tratamientos, pudiera deberse a una inadecuada aspiración de ovocitos, debido a que se requiere una presión de aspiración constante que varía de 50 a 100

mmHg (Rodríguez *et al.*, 2006), conduciendo a una pérdida de células del cúmulo en un 5% de los ovocitos totales recuperados. Sin embargo, no se sabe si estos ovocitos son desnudados al azar por la fuerza del sistema de aspiración o porque se originaron de folículos ya en camino de atresia que debilita las conexiones celulares (Souza-Fabjan *et al.*, 2016). En cuanto al incremento en ambos casos de estructuras con Grado III, pudiera ser que la FSH desencadena la proliferación de las células del cúmulo en fase preantral precoz, previniendo la atresia e induciendo la síntesis de los receptores de la hormona luteinizante (LH), así como la expresión de hormonas esteroideas (Richards *et al.*, 2002).

Para este estudio, desde un punto de vista funcional, la calidad del ovocito pudo coincidir con su competencia de desarrollo, la comunicación mantenida entre el ovocito y las células del cúmulo a través de una extensa red de uniones gap y otros mecanismos de comunicación celular, que permite la transferencia de dos vías de pequeñas moléculas como los micro ARN y ARN mensajeros (Sasseville *et al.*, 2009). Esto es extremadamente importante para obtener una alta calidad de ovocitos, capaz de soportar la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario (Souza-Fabjan *et al.*, 2016).

Resultados indican que la extensión y la integridad de la capa de células del cúmulo son factores determinantes en la maduración *in vitro* de ovocitos de cabra (Lihua *et al.*, 2010). La interacción entre el ovocito y sus células del cúmulo circundantes es crítica para el mantenimiento de la competencia de desarrollo de ovocitos (Eppig, 1991). Esto es importante en nuestro estudio, donde se encontraron estructuras de baja calidad, Grado III, las cuales tenían solo 1 capa de células del cúmulo, e inclusive se encontraron altas tasas de desnudados.

Las células del cúmulo desempeñan un papel importante en la regulación de la maduración del núcleo y el citoplasma en el ovocito (Tanghe *et al.*, 2002) y en la protección de los mismos contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000). El estrecho contacto entre las células del cúmulo y el ovocito a través de las uniones gap, permite el intercambio bidireccional de moléculas (Tanghe *et al.*, 2002). Por lo tanto, cualquier factor que pudiera afectar dichas células, como un estado apoptótico, o ausencia de las mismas también podría reflejar una menor calidad de los ovocitos y, como consecuencia, la producción de embriones *in vitro* puede verse afectada. Además, la presencia de células cúmulo durante la maduración *in vitro* es esencial para mejorar la tasa de blastocistos (Anguita *et al.*, 2009) por lo que en nuestro trabajo esto pudo haber afectado la cantidad y calidad de estructuras embrionarias obtenidas.

Relacionado a la baja calidad de los ovocitos y así mismo la reducción de la calidad del embrión, también se ha atribuido a la actividad de LH de la eCG, ya que puede causar la reanudación precoz de meiosis en el ovocito, lo que resulta en la aneuploidía y otros problemas de desarrollo embrionario temprano (Monniaux *et al.*, 1984).

En cuanto al efecto de la dosis de eCG sobre la producción de embriones, se obtuvo que al encontrarse un mayor porcentaje de embriones 7 días post FIV en el tratamiento de 500 UI de eCG, podemos mencionar que las gonadotropinas inyectadas actúan en diferentes etapas de desarrollo, incluyendo la maduración final del ovocito y la esteroidogénesis folicular (Bar-ami *et al.*, 1994). El resultado final es un profundo efecto sobre el ovocito, el embrión temprano y sus respectivos microambientes (Greve *et al.*, 1995) por lo tanto la superestimulación ovárica en cabras puede utilizarse para aumentar el número de ovocitos

competentes para la producción de embriones *in vitro*, ya que alcanzan una adecuada maduración tanto nuclear como citoplasmática (Malhi *et al.*, 2008).

6. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo la presente investigación podemos concluir que la cantidad y tamaño de folículos se vio afectada por la aplicación de eCG y la raza, asimismo, sobre la calidad de los ovocitos y producción total de embriones, mas no sobre la cantidad.

7. LITERATURA CITADA

Abdullah, R.B., Liow, S.L., Rahman, A.N.M.A., Chan, W.K., Wan-Khadijah, W.E., Ng, S.C., 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. *Theriogenology*. 70, 765–771.

Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F., Zarazaga, L., 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Animal Reproduction Science*. 48, 209–218.

Adams, G.P., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal Reproduction and Fertility Supplement*. 54, 17–32.

Anguita, B., Paramio, M.T., Morato, R., Romaguera, R., Jimenez- Macedo, A.R., Mogas, T., 2009. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal Reproduction Science*. 116, 95-106.

Armstrong, D.T., Kotaras, P.J., Earl, C.R., 1997. Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reproduction Fertility and Development*. 9, 333-339.

Avdi, M., Chemineau, P., Driancourt, M.A., 1997. Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios sheep. *Animal Reproduction Science*. 46, 223–235.

Avelar, S.R.G., Moura, R.R., Sousa, F.C., Pereira, A.F., Almeida, K.C., Melo, C.H.S., 2012. Oocyte production and *in vitro* maturation in Caninde goats following hormonal ovarian stimulation. *Animal Reproduction*. 9, 188-194.

Aviles, F.D., 2002. Personal communication.

Baird, D.T., 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. *Journal of Reproduction and Fertility*. 69, 343–352.

Baird, D.T., McNeilly, A.S., 1981. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. 30, 129–133.

Baldassarre, H., de Matos, D.G, Furnus, C.C., Castro, T.E., Cabrera Fischer, E.I., 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science*. 35,145-150.

Baldassarre, H., Karatzas, C.N., 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*. 82/83, 255-266.

Baldassarre, H., Rao, K.M., Neveu, N., Brochu, E., Begin, I., Behboodi, E., 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction Fertility and Development*. 19, 612–616.

Baldassatre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., Karatzas, C.N., 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*. 57, 276-264.

Bar-ami, S., Zlotkin, E., Brandes, J.M., Itskovitz-Elder, J., 1994. Failure of meiotic competence in human oocytes. *Biology of Reproduction*. 50:1100-1107.

Baril, B., Casamitjana, P., Perrin, J, Vallet, J.C., 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene*. 24,101-115.

Baril, G., Brebion, P., Chesné, P., 1993. 'Manuel de Formation pour la Transplantation Embryonnaire Chez la Brebis et la Chevre, Vol. 115. (Food and Agriculture Organisation of the United Nations: Rome, Italy.) [In French.]

Baruselli, P.S., Reis, E.L., Marques, M.O., Nasser, L.F., Bo, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*. 82-83, 479-486.

Bindon, B.M., Piper, L.R., Cahill, L.P., Driancourt, M.A., O'Shea, T., 1986. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*. 25, 53–70.

Binelli, M., Hampton, J., Buhi, W. C., Thatcher, W.W., 1999. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biology of Reproduction*. 61, 127–134.

Boland, M.P., Goulding, D., Roche, J.F., 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*. 35, 5–17.

Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans J.F.D.M.A., 1982. Normal Development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. 27,145–58.

Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M., González-Bulnes, A., 2015. Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*. xxx, 1–7.

Campbell, B.K., Dobson, H., Scaramuzzi, R.J., 1998. Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *Journal of Endocrinology*. 156, 213–222.

- Casida, L.E., Warwick, E.J., Meyer, R.A., 1944. Survival of multiple pregnancies induced in the ewe following treatment with pituitary gonadotrophins. *Journal of Animal Science*. 3, 22–28.
- Cheng, W.T.K., Moor, R.M., 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*. 25,146.
- Cognié, Y., 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51, 105–116.
- Cognié, Y., Baril, G., Puolin, N., Mermillod, P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59, 171-188.
- Cognié, Y., Poulin, N., Pignon, P., Sulon, J., Beckers, J.F., 1995. Does heparin affect developmental ability of IVF goat oocytes? 11th Sci. Meet. Eur. Embryo Transf. Assoc. p., 146.
- Cox, J.F., Alfaro, V., 2007. *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 42, 83-87
- Cran, D.G., 1983. Follicular development in the sheep after priming with PMSG. *Journal Reproductive Fertility*. 67, 415–423.
- Crozet, N., DeSmedt, V., Ahmed-Ali, M.S.C., 1993. Normal development following *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology*. 39, 206.
- De Castro, T., Rubianes, E., Menchaca, A., Rivero, A., 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*. 52,399–411.
- De Smedt, V., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, M., 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*. 37, 1049–60.

Debouf, J.P., Morand-Fehr, P., Rubino, R., 2004. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research*. 51, 165–173.

Doney, J.M., Gunn, R.G., Peart, J.N., Smith, W.F., 1981. Effect of body condition on pasture type herbage intake, performance during lactation and subsequent ovulation rate in Scottish Blackface ewes. *Animal Production*. 33, 241–247.

Driancourt, M.A., Avdi, M., 1993. Effect of the physiological stage of the ewe on the number of follicles ovulating following hCG injection. *Animal Reproduction Science*. 32, 227–236.

Driancourt, M.A., Fry, R.C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S., 1990b. Granulosa cell content and production of steroids, inhibin and follicular peptides by large follicles from a range of prolific and non-prolific breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 43, 230–231.

Driancourt, M.A., Webb, R., Fry, R.C., 1991. Does follicular dominance occur in ewes? *Journal of Reproduction and Fertility*. 93, 63–70.

Dufour, J.J., Cognie, Y., Mermillod, P., Mariana, J.C., Romain, R.F., 2000. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118, 85–94.

Ensminger, M.E., Parker, R.O., 1986. *Sheep and Goat Science*, Fifth Edition. Danville, Illinois: The Interstate Printers and Publishers Inc.

Eppig, J.J., 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*. 13, 569-574.

Evans, A.C., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P., 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*. 53, 699–715.

Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney. 194 p. 7a. 636.30824; E8.

FAO, 2007. In: Richkowsky, B., Pilling, D. (Eds.), The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome.

FAO, 2009. Sheep and goats for diverse products and profits Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Flynn, J.D., Duffy, P., Boland, M.P., Evans, A.C.O., 2000. Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Animal Reproduction Science*. 62, 285–296.

FOASTAT. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>.

Fortune, J.E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 50, 225–232.

Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., Batt, A., 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acid, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*. 50, 390-400.

Gaston-Parry, O., Heasman, K., Nemorin, J.K., Robinson, T.J., 1988. A radioimmunoassay for fluorogestone acetate (FGA) and its application to the measurement of plasma FGA and progesterone in ewes treated with FGA-impregnated intravaginal sponges. *Australian Journal of Biological Sciences*. 41, 57–67.

Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., 1980. The effects of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60, 425–429.

Gibbons, A., Pereyra Bonnet, F., Cueto, M.I., Salamone, D., Catala, M., 2008. Recovery of sheep and goat oocytes by laparoscopy. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36, 223-230.

Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, L.P., 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*. 87, 223–230.

Goel, A.K., Agrawal, K.P., 2005. Ovulatory response and embryo yield in Jakhrana goats following treatments with PMSG and FSH. *Tropical Animal Health and Production*. 37, 549-558.

González-Bulnes, A., Baird, D.T., Campbell, B.K., Cocero, M.J., García-García, M.R., Inskepp, E.K., López-Sebastián, A., McNeilly, A.S., Santiago-Moreno, J., Souza, H.J.C., Veiga-Lopéz, A., 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*. 16, 421-435.

González-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Díaz-Delfa, C., García-García, R., Urrutia, B., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J., López- Sebastián, A., 2003a. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatments. *Small Ruminant Research*. 48, 9–14.

González-Bulnes, A., García-García, R. M., Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., Cocero, M., 2002b. Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dosage. *Theriogenology*. 58, 1607–1614.

González-Bulnes, A., García-García, R.M., Souza, C.J.H., Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., Cocero, M.J., Baird, D.T., 2002c. Patterns of follicular growth in superovulated ewes and influence on endocrine and ovarian response. *Reproduction in Domestic Animals*. 37, 357–361.

González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J., López-Sebastián, A., 2000a. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 54, 1055–1064.

González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M.J., Souza, C.J.H., Groome, N.P., García-García, R.M., López-Sebastián, A., Baird, D.T., 2002d. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. *Theriogenology*. 57, 1263–1272.

González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., García-García, R. M., del Campo, A., Gómez-Brunet, A., López-Sebastián, A., 2001. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on the growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Animal Reproduction Science*. 65, 265–272.

González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., Inskip, E. K., Townsend, E. C., and López-Sebastián, A., 1999b. Follicular dynamics during the oestrous cycle in dairy goats. *Animal Science*. 68, 547–554.

Goodman, R.L., Karsh, F.J., 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*. 107, 1286–1290.

Graff, K.J., Meintjes, M., Dyer, V.W., Paul, J.B., Denniston, R.S., Ziomek, C., Godke, R.A., 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology*. 51, 1099-1119.

Greve, T., Callesen, H., Hytte, P., Hoier, R., Assey, R., 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*. 43, 41-50.

Greyling, J.P.C., Kotze, W.F., Taylor, G.J., Hagendijk, W.J., Cloete, F., 1994. Synchronization of oestrus in sheep: use of different dosages of progestagen outside the normal breeding season. *South African Journal of Animal Science*. 24, 33–37.

Hanada, A., 1985. *In vitro* fertilization in goats. *Journal of Animal Reproduction*. 31, 21–6.

Hervieu, J., Morand-Fehr, P., Schmidely, P.H., Fedele, V., Delfa, R., 1991. Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternales, lombaires et caudales utilisées pour estimer l'état corporel des chèvres laitières (Body measurements explaining variations in scores for the sternal, lumbar, and caudal regions used to estimate body condition in dairy goats). *Options Méditerranéennes-Série Séminaires*. 13, 43–56.

Hoffman, K.A., Waller, S.L., Young, C.R., 1988. Once daily vs twice daily treatments with follicle stimulating hormone in ewes synchronized with different dosages of norgestomet. *Theriogenology*. 29, 261.

IETS, 2016. Statistics of Embryo Collection and Transfer in domestic farm animals. Collated by George Perry, Chairperson – IETS Data Retrieval Committee. (georgeperry2@bigpond.com).

Jabbour, H.N., Ryan, J.P., Evans, G., Maxwell, W.M., 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reproduction, Fertility, and Development*. 3, 699–707.

Jablonka-Shariff, A., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 1996. Effects of gonadotropin treatment and withdrawal on follicular growth, cell proliferation, and atresia in ewes. *Biology of Reproduction*. 55, 693–702.

Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Animal Reproduction Science*. 48, 137–157.

Kojima, F.N., Stumpf, T.T., Cupp, A.S., Werth, L.A., Robertson, M.S., Wolfe, M. W., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony do not mimic the corpus luteum in regulation in luteinizing hormone and 17 β -estradiol in circulation of cows. *Biology of Reproduction*. 47, 1009–1017.

Lanari, M.R., Taddeo, H., Domingo, E., Perez Centeno, M., Gallo, L., 2003. Phenotypic differentiation of exterior traits in local Criollo Goat population.

Lehloenya, K.C., 2013. Preliminary results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goats. *Small Ruminant Research*. 113, 171-174.

Leyva, V., Buckrell, B.C., Walton, J.S., 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*. 50, 395–416.

Lihua, L., Wenbin, Y., Wenzhong, L., Youshe, R., Fuzhong, L., Kyung-Bon, L., Smith, W.G., 2010. Effect of oocyte selection, estradiol and antioxidant treatment on *in vitro* maturation of oocytes collected from prepubertal Boer goats. *Italian Journal of Animal Science*. 90, 50-54.

Lindsell, C.E., Rajkumar, K., Manning, A.W., Emery, S.K., Mapletoft, R.J., Murphy, B.D., 1986. Variability in FSH: LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology*. 25, 167.

López-Sebastián, A., González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., Townsend, E.C., Inskeep, E.K., 1999. Effects of follicular status at treatment

on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 52, 505–514.

Lozano, J.M., Lonergan, P., Boland, M.P., O’Callaghan, D., 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*. 125, 543-553.

MacHugh, D.E., Bradley, D.G., 2001. Livestock genetic origins: goat buck the trend. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5382–5384.

Mahmoud, A.Z., 2010. Present status of the world goat populations and their productivity. *Lohmann information*. 45, 42.

Malhi, P.S., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., Singh, J., 2008. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Animal Reproduction Science*. 109, 100–109.

McNeilly, A.S., Picton, H.M., Campbell, B.K., Baird, D.T., 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement.43, 177–186.

Menchaca, A., Rubianes, E., 2002. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamic in goats. *Theriogenology*. 57, 1411–1419.

Mermillod, P., Locatelli, Y., Dalbiès-Tran, R., Uzbekova, S., Baril, G., Guignot, F., Perreau, C., Poulin, N., Touzé, J.L., Pannetier, S., Schmaltz, B., Cognié, Y., 2006. *In vitro* production of ruminant embryos: results, limits and perspectives. 2006 symposium COA/INRA scientific cooperation in agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.). pp, 59-78.

Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M.P., Roche, J.F., 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102, 123–130.

Mihm, M., Curran, N., Hyttle, P., Knight, P.G., Boland, M.P., Roche, J.F., 1999. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 116, 293–304.

Miller, K.F., Nordheim, E.V., Ginther, O.J., 1981. Periodic fluctuations in FSH concentration during the ovine estrous cycle. *Theriogenology*. 16, 669–679.

Mitchell, L.M., Dingwall, W.S., Mylne, M.J., Hunton, J., Matthews, K., Gebbie, F. E., McCallum, G.J., McEvoy, T.G., 2002a. Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Animal Reproduction Science*. 74, 163–174.

Mitchell, L.M., Silveira, M., Mylne, M.J., Matthews, K., Dingwall, W.S., 2002b. Seasonal differences in lamb birthweight do not arise from inherent differences in the oocyte and/or early embryo. *Reproduction Fertility and Development*. 14, 207–213.

Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J., 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*. 19, 55–81.

Monniaux, D., Mariana, J.C., Gibson, W.R., 1984. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70,243-253.

Morand-Fehr, P., Boyazoglu, J., 1999. Present state and future outlook of the small ruminant sector. *Small Ruminant Research*. 34,175–188.

Morand-Fehr, P., Dubeuf, J.P., Falagan, A., Le Jaowen, J.C., Boyazoglu, J., 2003. Systèmes de production de lait de Chèvre dans le Bassin Méditerranéen,

Proceedings, Hammamet (Tun.), October 26–28, 2000 EAAP Publ. No. 99, pp. 306–316.

Morand-Fehr, P., Lebbie, L.H.B., 2004. Proposals for improving the research efficiency on goats. Roundtable contribution of goats to humankind. Small Ruminant Research.

Morton, K. M., de Graaf, S.P., Campbell, A., Tomkins, L.M., Maxwell, W.M., Evans, G., 2005a. Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reproduction in Domestic Animals*. 40, 422–428.

Morton, K.M., Catt, S.L., Maxwell, W.M., Evans, G., 2005b. Effects of lamb age, hormone stimulation and response to hormone stimulation on the yield and *in vitro* developmental competence of prepubertal lamb oocytes. *Reproduction Fertility and Development*. 17, 593–601.

Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J., Humphrey, W.D., 1984. Variability in gonadotrophin preparation as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*. 21, 117–125.

Naqvi, S.M.K., Joshi, A., Das, G.K., Mittal, J.P., 2001. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Research*. 39, 199-208.

Nöel, B., Bister, J. L., Pierquin, B., and Paquay, R., 1994. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology*. 41, 719–727.

O'Brien, J.K., Dwarte, D., Ryan, J.P., Maxwell, W.M.C., Evans, G., 1996. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes

from prepubertal and adult sheep. *Reproduction Fertility and Development*. 8, 1029–1037.

O'Callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L. J., Boland, M.P., 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118, 303–313.

Pacala, N., Corin, N., Bencsik, I., Dronca, D., Cean, A., Boleman, A., Caraba, V., Papp, S., 2010. Stimulation of the reproductive function at cyclic cows by ovsynch and PRID/eCG. *Animal Science and Biotechnology*. 43, 317– 320.

Padilha, L.C., Teixeira, P.P.M., Pires-Buttler, E.A., Apparício, M., Motheo, T.F., Savi, P.A.P., 2014. *In vitro* Maturation of Oocytes from Santa Ines Ewes Subjected to Consecutive Sessions of Follicular Aspiration by Laparoscopy. *Reproduction in Domestic Animals*. 49, 243–248.

Paramio, M.T., Izquierdo, D., 2014. Assisted reproduction technologies in goats. *Small Ruminant Research*. 121, 21-26.

Paramio, M.T., Izquierdo, D., 2016. Recent Advances in *In Vitro* Embryo Production in Small Ruminants. 86, 152-159.

Peacock, C., Sherman, D.M., 2010. Sustainable goat production-some global perspectives. *Small Ruminant Research*. 89, 70–80.

Peláez, P.V. A., 2011. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pp, 18-20.

Pendelton, R.J., Youngs, C.R., Rorie, R.W., Memon, M.A., Godke, R.A., 1992. Follicle stimulating hormone versus pregnant mare serum gonadotropin for superovulation of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 8, 217.

Ptak, G., Loi, P., Dattena, M., Tischner, M., Cappai, P., 1999. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biology of Reproduction*. 61, 1568–1574.

Quintero-Elisea, J.A., Macías, U., Álvarez, F.D., Correa, A., González, A., Lucero, F.A., Soto, S.A., Avendaño, L., 2011. The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Tropical Animal Health and Production*. 43, 1567–1573.

Rahman, M.R., Rahman, M.M., Wan Khadijah, W.E., Abdullah, R.B., 2014. Comparison of superovulatory effect of Equine Chorionic Gonadotrophin and Follicle Stimulating Hormone on embryo production in crossbred (Boer × Katjang) goats. *Pakistan Journal of Zoology*. 46, 819-826.

Rexroad, C.E., Powell, A.M., 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *Journal of Animal Science*. 69, 246–251.

Richards, J.S., Darryl, L.R., Scott, O., Minie, H., Kari, H.D., Allison, E.F., Yuet, K.L., Sharma, S.C., 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*. 57,195–220.

Robinson, T. J., 1967. *The Control of the Ovarian Cycle in the Sheep*. Pp, 237–244. (Sydney University Press: Sydney, Australia.).

Rodríguez, C., Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Chamorro, C.A., de Paz, P., 2006. Ovum Pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*. 41, 106-113.

Rubianes, E., Ibarra, D., Ungerfeld, R., de Castro, T., Carbajal, B., 1995. Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*. 43, 465–472.

Rubianes, E., Ungerfeld, R., Viñoles, C., Rivero, A., Adams, G.P., 1997. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 47, 1479–1488.

Salehi, R.H., Kohrama, H., Towhidi, A., Kermani Moakhar, H., Honarvar, M., 2010). Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. *Small Ruminant Research*. 93 213–217.

Sasseville, M., Gagnon, M.C., Guillemette, C., Sullivan, R., Gilchrist, R.B., Richard, F.J., 2009. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Molecular Endocrinology*. 23,700–10.

Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in ewes. *Reproduction Fertility and Development*. 5, 459–478.

Scaramuzzi, R.J., Downing, J.A., Campbell, B.K., Cognié, Y., 1988. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. *Australian Journal of Biological Sciences*. 41, 37–45.

Scudamore, C.L., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S., 1993. The effect of two different levels of progesterone priming on the response of ewes to superovulation. *Theriogenology*. 39, 433–442.

SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Resumen Nacional, avance acumulado de la producción pecuaria año 2017.

SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Avance mensual de la producción pecuaria 2018.

Silva, J.C.B., Okabe, W.K., Traldi, A.S., 2012. From cattle to sheep: a view of the difficulties and success of commercial *in vitro* production of sheep embryos. *Animal Reproduction*. 9, 195-200.

Sousa, J.M.G., Duffard, N., Bertoldo, M.J., Locatelli, Y., Corbin, E., Fatet, A., 2013. Influence of heparin on the presence of cumulus cells during fertilization on the *in vitro* production of goat embryos. *Animal Reproduction Science*. 138, 82-89.

Souza-Fabjan, G.J.M., Panneau, B., Duffard, N., Locatelli, Y., de Figueiredo, J.R., de Figueirêdo, F.V.V., Mermillod, P., 2014. *In vitro* production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*. 81, 1141-1161.

Souza-Fabjan, J.M.C., Locatelli, Y., Duffard, N., Corbin, E., Batista, R.I.T.P., Freitas, V.J.F., Beckers, J.F., Mermillod, P., 2016. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. xxx: 1–10.

Stangl, M., Kuhholzer, B., Besenfelder, U., Brem, G., 1999. Repeated endoscopic ovum pick up in sheep. *Theriogenology*. 52, 709–16.

- Taft, R., Ahmad, N., Inskip, E.K., 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *Journal of Animal Science*. 74, 2985–2991.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Krui, F A., 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 61, 414–424.
- Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N., 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*. 63, 805–810.
- Teixeira, P.P.M., Padilha, L.C., Oliveira, M.E.F., Motheo, T.F., da Silva, A.S.L., Barros, F.F.P.C., Coutinho, L.N., Flores, F.N., Lopes, M.C.S., Bandarra, M.B., Silva, M.A.M., Vasconcelos, R.O., Rodrigues, L.F.S., Vicente, W.R.R., 2011. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*. 127, 169–175.
- Theriez, C., Desvignes, A., Thimonier, S., 1971. Amelioration de la prolificite chez les ovins. *Bull. Tech. Inf. Minn*. 157, 1–7.
- Torres, S., Cognie, Y., Colas, G., 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*. 27, 407–419.
- Tsonis, C.G., McNeilly, A.S., Baird, D.T., 1988. Inhibin secretion by the sheep ovary during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle and following stimulation with FSH. *Journal of Endocrinology*. 117, 283–291.

- Urdaneta, A., Jiménez, A., Paramio, M., Izquierdo, D., 2004. Cysteamine, glutathione and ionomicyn treatments improve *in vitro* fertilization of pre-pubertal goat oocytes. *Zygote*. 12, 277-284.
- Uribe-Velásquez, L.F., Oba, E., Souza, M.I.L., 2008. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 40, 83-88.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*. 55, 993–1004.
- Wiemer, K.E., Cassey, P.L., McFarland, C.W., Godke, R.A., 1988. Superovulatory response of split-embryo twin heifers. *Theriogenology*. 29, 328.
- Wollen, T.S., Schultz, R H., Newkirk, H.L., 1985. Use and handling of drugs and biologicals in embryo transfer. *Theriogenology*. 23, 31–43.
- Wright, R.W., Jr, Bondioli, K., Grammer, J., Kuzan, F., Menino, A., 1981. FSH or FSH plus LH superovulation in ewes following estrus synchronization with medroxyprogesterone acetate pessaries. *Journal of Animal Science*. 52, 115–118.
- Younis, I., Zuelke, K., Oliveira, M.L., 1991. *In vitro* fertilization of Goat. *Biology and Reproduction*. 44, 1177–82.