



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRANSFERENCIA DE UN EMBRION A OVEJAS RECEPTORAS
CON SERVICIO PREVIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ANA OLIVIA JIMENEZ RUIZ

ASESORES: M.V.Z. OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA

M.V.Z. JOSE DE JESUS NUÑEZ SAAVEDRA



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Mercedes:

por que me dió cosas intangibles que solo una madre puede dar.

Te amo.

A mi abuelo:

por enseñarme a amar el campo y

fomentar la que a partir de ahora será mi profesión.

AGRADECIMIENTOS

A mi extensa familia, en especial a mis madres Mercedes y Concepción y a mis hermanos Agustín y Orlando, por ayudarme a ser yo.

A la UNAM, por dejarme formar parte del proyecto cultural que constituye.

A Gregorio, por acompañarme tanto tiempo en mi camino, siempre con una sonrisa y consideración.

A Jesús, Octavio, Gerardo, Reyes y Carlos, porque además de ser mis formadores me demostraron verdadera amistad.

A Mariana, Cynthia, Gisela y Luis Gustavo, por que tengo el privilegio de conocerlos y elegirlos como hermanos de vida y esto, es digno e insuficiente de agradecer.

A Carolina, porque sin su compañía el trabajo de campo hubiera sido muy aburrido y difícil.

A Antonio Ortiz Hernández, director del CEIEPO, por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A todo el personal académico y administrativo del CEIEPO. Porque aprendí algo de cada uno de ellos. Gracias a los médicos César Flores, Ricardo Hernández, Martín Villalobos, César Tapia, José Luis Paniagua, Miguel Ángel García, Alberto Ríos y Rosa Angulo. También mi agradecimiento es para Dorita, Rodolfo, Adrián y Noé. Les debo mucho.

A los miembros del jurado, por las aportaciones hechas para mejorar el presente trabajo.

Al futbol, el deporte del hombre, que me enseñó como las cosas pequeñas te pueden dar instantes de felicidad infinita o profunda tristeza.

A todo aquel, que de manera directa o indirecta, me ayudó para estar aquí hoy.

Las ideas solo pueden ser útiles
en tanto cobren vida en
numerosas mentes.

ALEXANDER VON HUMBOLDT

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	2
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVOS.....	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1 Situación mundial de la transferencia de embriones.....	7
4.2 Factores de éxito en la transferencia de embriones en ovejas.....	10
4.3 Establecimiento de la gestación y supervivencia embrionaria.....	13
4.3.1 Luteólisis.....	16
4.3.2 Reconocimiento materno de la gestación.....	18
4.3.3 Señales químicas de origen embrionario.....	21
4.3.4 Señales químicas de origen endometrial.....	24
4.4 Mortalidad embrionaria.....	27
4.5 Inducción de partos múltiples en receptoras gestantes.....	33
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
6. RESULTADOS.....	45
7. DISCUSION.....	50
8. LITERATURA CITADA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Comportamiento del mercado mexicano de la carne ovina durante el período 1990-2000.....	9
FIGURA 2: Distribución de las importaciones de ovinos y sus subproductos cárnicos realizadas por México durante el año 2003.....	9
FIGURA 3: Control neuroendócrino del ciclo reproductivo de la oveja.....	14
FIGURA 4: Eventos mediados por los receptores hormonales que regulan la secreción de PGF ₂ α de las células endometriales.....	17
FIGURA 5: Mecanismo de reconocimiento materno de la gestación mediado por proteínas trofoblásticas.....	22
FIGURA 6: Comparación de la frecuencia de partos múltiples entre los grupos experimentales MN (monta natural) y MN*TE (monta natural más transferencia de un embrión).....	50
FIGURA 7: Efecto de la raza de la receptora en los parámetros reproductivos en los tres tratamientos.....	52
FIGURA 8: Resultados comparativos de la tasa de parición, tasa de fertilidad y cantidad de crías obtenidas entre los grupos experimentales	52
FIGURA 9: Tasa de supervivencia del embrión transferido en los grupos de transferencia de un embrión (TE) y el de monta natural previa a la transferencia de embriones(MN*TE).....	56
FIGURA 10: Distribución de las crías nacidas en el grupo MN*TE (monta natural previa a la transferencia de un embrión) de acuerdo al tipo de parto y y origen de la cría.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1: Frecuencias productivas de acuerdo a raza y grupo experimental.....	45
CUADRO 2: Distribución racial de la prolificidad y tasa de parición.....	46
CUADRO 3: Supervivencia embrionaria y tasa de parición múltiple.....	47
CUADRO 4: Supervivencia embrionaria en gestaciones producidas por transferencia embrionaria relativa al cuerpo lúteo.....	49
CUADRO 5: Tasa ovulatoria de acuerdo a la raza de la receptora.....	49

RESUMEN

JIMÉNEZ RUIZ, ANA OLIVIA. Transferencia de un embrión a ovejas receptoras con servicio previo (bajo la dirección de: Octavio Mejía Villanueva y José de Jesús Núñez Saavedra)

Utilizando un total de 73 ovejas de raza Suffolk y Dorset, divididas en 3 grupos experimentales, se compararon la fertilidad y prolificidad entre éstos. Las ovejas del grupo 1 (n=26) recibieron la monta natural de un semental fértil de su raza, a las del grupo 2 (n=23) les fue transferido por laparoscopia un embrión de su raza al cuerno ipsilateral y a las del grupo 3 (n=23) se les dió monta natural con un carnero fértil de su raza y posteriormente se les transfirió mediante laparoscopia un embrión de raza distinta a la suya en el cuerno contralateral. Al parto se registró el número y raza de los corderos nacidos, para así identificar si fueron aportados por la donadora de embriones o por la receptora y calcular la fertilidad y prolificidad. El porcentaje de fertilidad fué de 84.6, 62.5 y 73.9, mientras que el valor de prolificidad fue de 1.59, 1.0 y 1.58 respectivamente, sin que se encontraran diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($P>0.05$). La eficiencia reproductiva del rebaño utilizado en el experimento fue aceptable y el método de transferencia laparoscópica no fue detrimental sobre la supervivencia de los embriones presentes en el útero. La coexistencia de embriones nativos y transferidos se mantuvo hasta el nacimiento en el 30% de las receptoras que recibieron monta natural antes de la transferencia embrionaria.

I INTRODUCCIÓN

Actualmente, la biotecnología reproductiva ofrece cada vez más oportunidades de aprovechar al máximo los recursos genéticos de los animales domésticos y silvestres. La transferencia de embriones es una opción que consiste en la recolección de embriones de una hembra donadora para colocarlos en el aparato reproductor de varias receptoras que los desarrollen hasta el nacimiento. A poco más de 100 años de ser llevada a cabo por primera vez y de 60 años en la práctica comercial, la transferencia de embriones se ha transformado en una técnica muy precisa y común para la reproducción de rumiantes.¹⁻⁴ Esta tendencia fue acentuada en los pequeños rumiantes con la adaptación del uso de la endoscopia a partir de los años ochentas además de logros en la purificación, aplicación y dosificación de hormonas reproductivas.⁵⁻⁶

A medida que la recolección y transferencia de embriones son adoptadas en la reproducción de animales domésticos, se han hallado innumerables ventajas y problemas prácticos mayores. Estos procedimientos constituyen herramientas invaluable en la rápida examinación y transmisión de las características genéticas valiosas de hembras superiores. Además, ofrecen la posibilidad de introducir material genético en otro hato o país, con el menor riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas de entre todas las técnicas reproductivas.⁷⁻⁹

Entre los mayores inconvenientes que ofrece la adopción rutinaria de dichas técnicas se encuentran: el alto costo que alcanzan, aunque este se justifica con animales genéticamente valiosos; la variabilidad en la respuesta a la superovulación y por ende, en la recuperación de embriones; los efectos adversos postquirúrgicos que limitan la reproducción futura de esa hembra o su utilización repetida en programas de transferencia y la alta consanguinidad que acompaña el progreso genético, diseminando la expresión de genes indeseables.^{6, 10-12}

La oveja fue la primera clase de ganado en que se practicó la transferencia de embriones, reportándose por primera vez en 1934 por Warwick. Para 1955, Hunter, Adams y Rowson desarrollaron una técnica más precisa que a finales de la década de los 50's refinarían Averill, Rowson y Moore estableciendo las bases del procedimiento que hoy conocemos. A la fecha esta biotecnología, aún implica el manejo quirúrgico para contrarrestar los obstáculos que la anatomía del cérvix en esta especie impone.^{2,8,13} Además, cuando se manipula el ciclo estral de la oveja existen dos factores que a la fecha no se han controlado en su totalidad, estas son las fallas en la fertilización y la mortalidad embrionaria.¹⁴ De modo ideal la transferencia embrionaria debería saltar el primer obstáculo, puesto que la fertilización se lleva a cabo en otra hembra y el técnico evalúa la calidad y la viabilidad de los embriones resultantes de esa concepción. Pero por el contrario, el desarrollo embrionario posterior a la etapa de blastocisto compromete múltiples factores que determinan la futura gestación.¹⁵

En especies como las ovejas y las vacas, la tasa de fertilización es muy alta y cerca del 70% de las ovulaciones terminan en crías nacidas vivas y se ha comprobado que la mayoría de las muertes embrionarias ocurren antes del día dieciocho de gestación.¹⁶⁻¹⁷

Pese a lo anterior, hay pérdidas embrionarias no esperadas y que son originadas por múltiples causas. La mortalidad prenatal depende de 3 tipos de causas: intrínsecas, extrínsecas e intrínsecas adquiridas. Las causas intrínsecas del embrión constituyen las anormalidades cromosómicas, mutaciones génicas simples, división celular lenta o su incapacidad para estimular un ambiente uterino sincrónico con su desarrollo. Aquellas referidas como causas extrínsecas al embrión son los tratamientos hormonales aplicados en la madre, el estrés calórico y la subnutrición que ésta pudiera sufrir y, que en conjunto o individualmente, conducen a una alteración del perfil hormonal necesario para los cambios uterinos compatibles con la gestación. Por último, las causas intrínsecas adquiridas son resultado de la manipulación de los embriones, la exposición a procesos agresivos como la criopreservación o el contacto con mutagénicos potenciales como los medios de lavado, colorantes, crioprotectores, etc. Conocer cual de estos factores pueden ser revertidos o modificados a favor de la gestación exitosa, es de vital importancia para mejorar el desempeño reproductivo de los animales domésticos.¹⁷⁻²¹

En el momento en que un embrión es colocado en el tracto reproductivo de la receptora, es preciso que se establezca una comunicación bioquímica que adecue los cambios uterinos a las necesidades del embrión próximo a desarrollarse.

En 1982 Nancarrow y col. y en 1985 Heyman, establecieron que la presencia de más de un embrión y/o cuerpo lúteo provoca un efecto luteoprotector acentuado al requerirse mayores concentraciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para provocar la luteólisis.

Como se ha demostrado en experimentos de infusión de homogenados de embriones, transferencia de vesículas embrionarias y retransferencia de embriones cultivados *in vivo* en receptoras "custodia", el embrión es capaz de anticipar su presencia a su madre antes del reconocimiento de la gestación (día 14) e incluso revertir asincronía ligera con el medio uterino. Para ello se vale de la secreción de diversas sustancias que ejerzan efectos luteotrópicos y antiluteolíticos que culminan con el mantenimiento de la gestación.^{17, 22-28}

De forma consecuente Thatcher (1985) propuso que la cotransferencia de vesículas o tejido trofoblásticos junto con embriones normales podría aumentar la supervivencia embrionaria si la secreción deficiente por las membranas del embrión contribuye a la mortalidad embrionaria precoz.^{15,29}

Por lo tanto, el presente trabajo plantea como probable que la presencia de un embrión originado en la receptora, inicie los cambios fisiológicos necesarios para la interacción entre el medio uterino y un embrión transferido, pues este último tendría mayor dificultad de propiciarla en forma suficiente, dado su recién ingreso al tracto reproductor, y prolongarla hasta antes de la enlongación, momento en que la presión de selección que ejerce el medio uterino sobre el embrión se vuelve crítica.

II HIPOTESIS

La presencia y desarrollo de embriones previamente a la transferencia de un embrión en ovejas receptoras, aumenta la probabilidad de implantación y gestación del embrión transferido.

III OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la productividad reproductiva entre las ovejas que recibieron monta natural, un embrión transferido y aquellas a las que fue transferido un embrión pocos días después de recibir la monta natural.

Objetivos específicos

Obtener y comparar el porcentaje de fertilidad entre las ovejas receptoras de un embrión, ovejas que recibieron servicio natural y ovejas receptoras de un embrión después de la monta natural.

Obtener y comparar el valor de prolificidad de las ovejas servidas con un semental fértil y de ovejas receptoras de un embrión después de la monta natural.

Calcular y comparar la supervivencia de los embriones transferidos a ovejas que fueron servidas previamente con las que no la recibieron.

IV REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. SITUACIÓN MUNDIAL DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

Ciertamente, la industria de la transferencia de embriones en la reproducción asistida está en crecimiento. La especie en que más ha tenido impacto es en el ganado vacuno sobre todo en los bovinos productores de carne. La cantidad de transferencias de embriones bovinos estimada para 1991 a escala mundial asciende a 350,000 embriones, de estos cerca del 15% son congelados para su posterior exportación y la tasa de éxito en la obtención de terneros vivos es de un 40 a 70%. Estas cifras son tomadas con reservas porque el registro que de ellas se hace es irregular y no es reportada por todos los países que la practican. En cambio, en la oveja la tendencia a utilizarse es menor pero también se desarrolla gradualmente, sobre todo en aquellos países en que la participación pecuaria de los ovinos es más importante como Nueva Zelanda, Reino Unido, Brasil, Sudáfrica y Norteamérica. Se calcula que la transferencia embrionaria en ovinos ocupa del 5 al 10% de las registradas en los bovinos, solo que el comercio internacional de embriones es mucho mayor.^{1,30}

La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) con sede en Francia, es una de las instituciones encargadas de recuperar información sobre la industria de transferencia de embriones en diferentes especies. En su reporte del año 1997, reportó para Australia la mayor aplicación de esta técnica en ovejas, seguida por Canadá y Sudáfrica.⁹

El informe incluyó la participación de México con 25 lavados reportados, 150 embriones transferibles obtenidos, 120 embriones transferidos en fresco, 20 embriones congelados transferidos y 10 congelados para su almacenamiento. No obstante, México no aportó ningún dato de exportación de embriones que a escala mundial se calculó en 316 embriones exportados.

Estas cifras son importantes dada la situación del rebaño nacional de México que no es suficiente para abastecer la demanda de carne de borrego. En 1998 México contaba con 5'804,405 cabezas de ganado ovino de diferentes razas, la mayoría destinada al mercado de la carne, mientras que el volumen de importación de ganado ovino la supera enormemente en cuanto al valor de la importación. Figuras 1 y 2 Si a esta última cantidad le sumamos el valor agregado que adquiere la carne al convertirse en barbacoa, los ovinocultores están dejando de lado ganancias sustanciales al no satisfacer el mercado. Los programas gubernamentales activos en el sector pecuario mexicano están favoreciendo el crecimiento de los rebaños mediante la extensión de créditos para comprar animales o bien, maquinaria e insumos alimenticios o agrícolas, y al desincentivar el sacrificio de vientres. Sin embargo, se encuentran limitados en la oferta de personal capacitado en reproducción asistida que diseñen planes de repoblación usando inseminación artificial y transferencia de embriones, pues estas técnicas lograrían la diseminación a muy corto plazo tanto de machos como de hembras seleccionados. Todo ello sin contar la poca aceptación que tiene esta técnica entre los propietarios de rebaños pequeños, debido a su costo y a la poca planificación de su empresa.³¹⁻

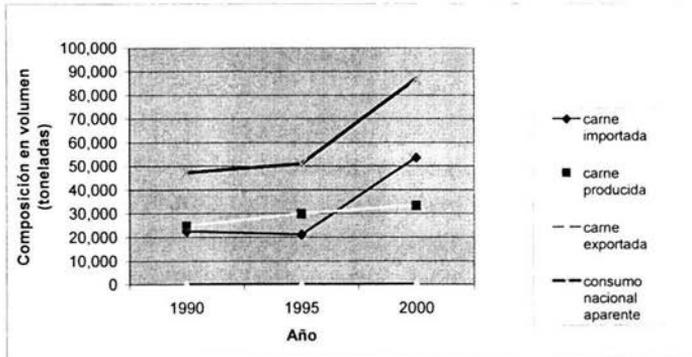


Figura 1. Comportamiento del mercado mexicano de la carne ovina durante el periodo de 1990-2000. Durante las últimas décadas la demanda de carne de borrego en México ha ido en aumento. Para satisfacer esta necesidad la producción de carne ha aumentado, sin embargo no al ritmo como lo hacen las importaciones que tratan de subsanar la deficiencia. En la gráfica vemos cómo la tendencia del consumo nacional aparente es paralela al de las importaciones en ritmo y tiempo.³¹

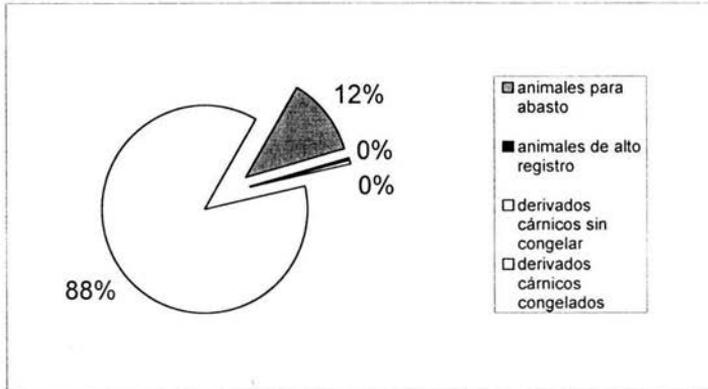


Figura 2. Distribución de las importaciones de ovinos y sus subproductos cárnicos realizadas por México durante el año 2003. Durante el año 2003 los productos importados predominantes han sido el ganado vivo destinado para abasto y derivados cárnicos congelados, en estos últimos se incluyen canales, medias canales, carne trozada sin deshuesar y deshuesada. Entre los países de origen de estos se encuentran Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos y Chile. El porcentaje de cada área en el gráfico representa la proporción del valor total en dólares de las importaciones en esta área pecuaria y que ascendió a cerca de 82 millones de dólares en ese año.³²

El costo que supone preparar las condiciones ideales para la transferencia de embriones es muy alto, pues incluye el manejo de compuestos hormonales, la contratación de personal y equipo especializado, y la selección y mantenimiento de receptoras hasta el parto, siendo este último el aspecto más costoso y propenso a fallas. Las hembras receptoras por lo general, son animales de baja calidad genética o mediocre producción de acuerdo a su fin zootécnico, pero que a partir del momento de su elección, deben entrar a un control sanitario y de bienestar estricto con el objetivo de no influir en su desempeño reproductivo y en el éxito de todo el proyecto.^{9,13}

4.2. FACTORES DE ÉXITO EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN OVEJAS.

Se requieren varias condiciones específicas para una transferencia de embriones exitosa. Entre ellas se encuentran la sincronía de donadoras y receptoras, la estimulación de más de 3 ovulaciones en las donadoras, la evaluación y clasificación adecuada de embriones recuperados y las especificaciones técnicas de la transferencia de embriones.³³

La más importante es la sincronía en los ciclos de la donadora y las receptoras que asegure la similitud entre el ambiente uterino del que es extraído el embrión al que arribará, pues el perfil hormonal de la fase lútea del ciclo estral prepara al útero para albergar al embrión. Existe cierta tolerancia de asincronía que el embrión puede soportar y que en la oveja corresponde a 12 horas, en este lapso deben generarse condiciones químicas que permitan al embrión revelar su presencia y evitar la luteólisis.^{19,24, 34-35}

Para cumplir esta condición es necesario sincronizar los ciclos reproductivos de la donadora y la receptora mediante el uso de progestágenos y gonadotropina coriónica equina (eCG). Los resultados más prometedores se han logrado con el uso de esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (FGA), sin embargo, el empleo de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona natural (CIDR) producen resultados muy parecidos con la ventaja de que la presentación del celo conductual ocurre en un lapso más corto, lo que posibilita el uso de la mayor cantidad de las receptoras preparadas.³⁶

Para la superovulación es necesario administrar hormonas gonadotrópicas que estimulen al ovario para liberar un mayor número de óvulos en comparación a los que se obtienen de forma natural en hembras intactas. La hormona folículo estimulante (FSH) ha demostrado ser la mejor opción porque además de que produce altas cantidades de gametos ovulados, también genera, después de la fertilización, mayor cantidad de embriones con calidad óptima para ser transferidos, sobretodo si se administra en dosis decrecientes y si es purificada de la misma especie a utilizar. Dada su corta vida media es necesario aplicarla en numerosas inyecciones y esto evita que las donadoras se vuelvan refractarias, es decir disminuyan su respuesta ovulatoria en tratamientos posteriores. No obstante, a pesar de reunir las características antes citadas, la tasa ovulatoria es muy variable entre especies, razas e incluso entre individuos, convirtiendo a este factor en el menos controlable. Se ha señalado que la superovulación tiene muy poco en la supervivencia de los embriones transferidos, pero afecta el grado de asincronía natural entre los embriones y el porcentaje de fertilización de los ovocitos porque son ovulados y fertilizados gradualmente.^{3,16,37-47}

Existen otros dos aspectos que permiten obtener la máxima supervivencia de los embriones transferidos y que están totalmente controlados por los técnicos a cargo: el sitio de transferencia y la edad del embrión. Por regla, se elige la porción distal de los cuernos del útero como el sitio ideal para colocar los embriones, debido a que esta provee de las condiciones necesarias para su crecimiento, recepción e implantación. A su vez, la supervivencia de embriones transferidos suele ser más alta cuando el cuerno uterino elegido es ipsilateral al cuerpo lúteo. En cuanto a la evaluación morfológica de los embriones, esta es un buen indicador de la viabilidad y edad que puede tener el embrión, pero no debe tomarse como garantía absoluta. Para controlar este aspecto, se debe asegurar que los embriones que se van a transferir no tengan anomalías importantes ni signos de degeneración y que hayan sido colectados entre los días 6-7, fecha en que naturalmente llegan al útero en la oveja, a modo que el medio no les resulte tóxico. También debe denotarse que los embriones de mayor edad que son transferidos tienen mayor probabilidad de sobrevivir, siempre y cuando lo permita la sincronía con el ciclo de la receptora.^{1,3,20, 48-53}

El método en que se realiza la colección no es un factor que afecte la viabilidad embrionaria, sin embargo, de su elección depende la tasa de recuperación de embriones y asegura a la postre que el número de embriones de buena calidad sea suficiente para utilizar todas las receptoras. La técnica quirúrgica de colección de embriones obtiene la mayor cantidad de los mismos con respecto a los cuerpos lúteos visibles (llegando en algunos casos al 100% de recuperación) si se le compara con la técnica laparoscópica. A pesar de la formación de adherencias, si se lleva a cabo cuidadosamente, permite usar a esa donadora varias veces obteniendo el mayor beneficio en cada ocasión debido a la libre manipulación de estructuras.^{9,52, 54-56}

4.3. ESTABLECIMIENTO DE LA GESTACIÓN Y SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA.

El reconocimiento materno de la gestación es sin duda el evento de mayor relevancia en la supervivencia embrionaria. Consiste en la conservación del cuerpo lúteo del ciclo estral para mantener la secreción de progesterona en niveles suficientes que aseguren la gestación del embrión que aún no se implanta. En la oveja, este proceso ocurre entre los días 12 y 13 del ciclo estral, como consecuencia de la alteración en la producción de la luteolisina uterina, es decir, que la secreción pulsátil de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) endometrial es atenuada hasta que su concentración no disminuye. Entonces aparentemente, se secretan cantidades importantes de $PGF_{2\alpha}$, pero se modifica su patrón de secreción de pulsátil a continua, lo que no provoca la destrucción del cuerpo lúteo. Una vez que los signos de involución lútea han ocurrido, el embrión será incapaz de detener o revertirlos.⁵⁷⁻⁵⁸

En general, la reproducción de los ovinos es caracterizada por tener una velocidad e intervalo generacional intermedios, esto como resultado de la combinación de estacionalidad reproductiva, duración de la gestación y aparición de la pubertad de las crías, en comparación con otras especies domésticas.

La oveja presenta cambios notables de actividad reproductiva de unas estaciones a otras, dado que su reproducción es regida por el fotoperíodo y la secreción elevada de melatonina por la glándula pineal. Su reproducción comienza cuando los días se acortan en el otoño, siendo más marcada esta estacionalidad conforme la región geográfica en que habitan se aleja del ecuador del planeta.

En cambio cuando los días son largos la hipófisis es menos activa y secreta pocas gonadotropinas, el crecimiento folicular no es estimulado, no hay conducta de celo ni ovula, a este período se le nombra anestro estacional. Figura 3

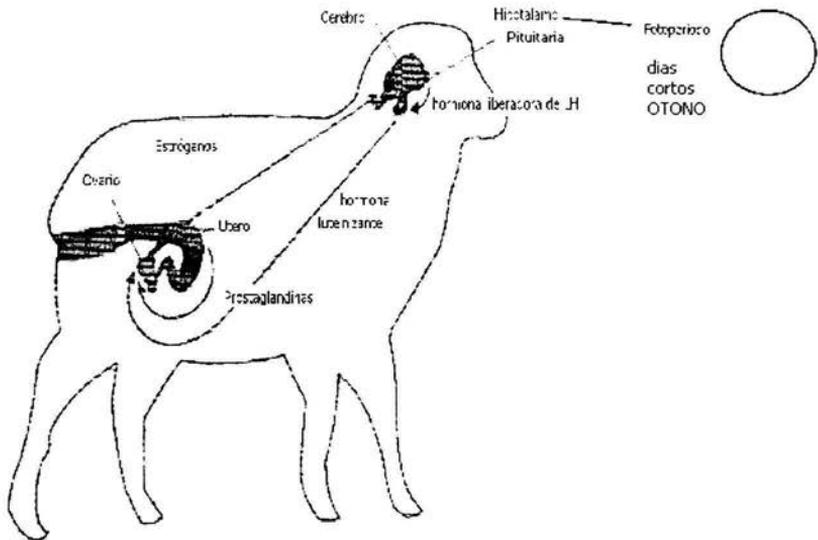


Figura 3

Control neuroendócrino del ciclo reproductivo de la oveja. En las ovejas que habitan regiones templadas, la actividad estrual comienza durante la época en que los días se hacen más cortos y es regida por el fotoperíodo y la melatonina que es una hormona pineal. Entonces el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal es desbloqueado, la retroalimentación negativa de GnRH se revierte y aumenta la frecuencia de pulsos de LH (1/hr) de baja concentración. Esto trae como consecuencia la liberación subsecuente de picos de estrógenos con cada vez mayor amplitud. El crecimiento folicular inicia y los estrógenos liberados de los folículos de Graaf alcanzan el cerebro para que este produzca hormona liberadora de LH en el hipotálamo, y a su vez se dirijan a la glándula pituitaria. En la pituitaria es inducida la liberación del pico preovulatorio de LH que provoca la ovulación y eventualmente la formación del cuerpo lúteo. Las prostaglandinas liberadas del útero detienen la producción de progesterona ovárica.
Modificado de Cumming (1979) ⁵⁹⁻⁶⁰

Durante la época reproductiva, las ovejas exhiben períodos fértiles o celos a intervalos regulares, aproximadamente cada 16-17 días (con un margen de 14-19 días). La cadena de acontecimientos que se repiten y conducen a períodos de celo regulares se conoce como ciclo estral. Simplificando las fases que lo constituyen, pueden dividirse en 2 etapas principales: la folicular (período de crecimiento folicular

compuesto por el proestro y el estro) que es relativamente corta (3-4 días) y en cuya última parte se presenta el celo; y la lútea (período del cuerpo lúteo compuesto por el metaestro y el diestro) ocupando el resto del ciclo (13 días).

La fase lútea es regida por 2 gonadotropinas hipofisarias llamadas hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Ambas son responsables del crecimiento folicular y la aromatización de estrógenos. Cuando el nivel de estrógenos (responsables de la conducta de celo) es suficientemente alto, se dispara la oleada preovulatoria de LH que es responsable de la maduración meiótica del ovocito y produce cambios en la pared del foliculo, conduciendo a la ruptura y liberación del ovocito 18 a 24 horas después (ovulación espontánea). A su vez el foliculo maduro produce inhibina que limita la secreción de FSH, evitando el crecimiento folicular adicional si existen foliculos de Graaf.

En el sitio de la ovulación se forma un cuerpo hemorrágico por la presencia de un coágulo de sangre y que 4 a 5 días después empieza a luteinizarse para formar un cuerpo lúteo sólido. El cuerpo lúteo es resultado de la proliferación y transformación de las células de la granulosa en células luteínicas por acción de LH, siendo las encargadas de secretar progesterona. El nivel de progesterona alcanza su máximo nivel después de 6 días y permanece alto en ovejas que no concibieron hasta el día 11-12, momento en que el cuerpo lúteo por acción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ disminuye su tamaño, empalidece y disminuye su producción de progesterona, permitiendo la acción de las gonadotropinas.⁶¹

4.3.1. LUTEÓLISIS.

La luteólisis juega un papel importante en la ciclicidad reproductiva de los mamíferos. Mediante la regresión del cuerpo lúteo, se detiene el dominio progestacional que posibilita la gestación y permite un nuevo ciclo, el reclutamiento folicular y la ovulación bajo la influencia hormonal de estrógenos, FSH y LH. Una condición necesaria para que ocurra la regresión del cuerpo lúteo es, que la $PGF_{2\alpha}$ de origen uterino sea liberada en una serie de picos episódicos y cortos, que duran cerca de una hora, ocurriendo 5 pulsos a lo largo de 24 horas en los días 14-15 del ciclo estral.^{27, 62-63}

Para que ocurra la luteólisis, debe ser precedida por una serie de eventos que regulen la secreción de $PGF_{2\alpha}$. El útero debe haber sido estimulado con progesterona por un mínimo de 10 días, período por el cual el endometrio no responde a la acción de los estrógenos. Entonces para el final de la fase lútea del ciclo, la progesterona disminuye su acción en el útero y la inhibición dirigida a los estrógenos cesa, siendo capaz desde ese momento de estimular la formación de receptores para oxitocina y la interacción de estos con los niveles endógenos de oxitocina ovárica y/o pituitaria. Finalmente, la activación del sistema de receptores para oxitocina aumenta la actividad de la adenilatociclasa y esta, amplifica y activa a la fosfolipasa A_2 que convierte el ácido araquidónico en $PGF_{2\alpha}$. La $PGF_{2\alpha}$ es secretada hacia la vena uterina y alcanza el ovario directamente mediante un mecanismo de transferencia a contracorriente en el pedículo útero-ovárico, sin atravesar la cama vascular pulmonar y simultáneamente, ejerce sus propiedades vasoconstrictoras, reduciendo rápidamente el flujo uterino hacia el ovario lúteo. De ese modo, se establece un circuito de retroalimentación positiva con el cuerpo lúteo, que a su vez refuerza la secreción de oxitocina para mantener la secreción

episódica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mientras disminuye la secreción de progesterona. ^{15,27,29,64-66}

Figura 4

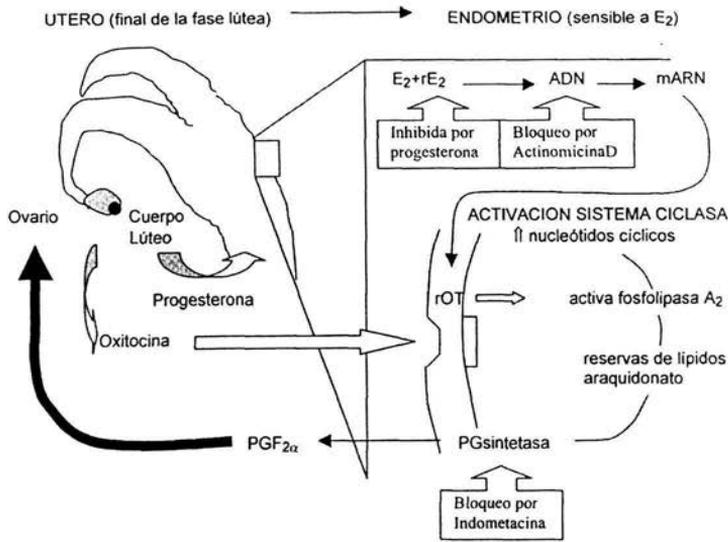


Figura 4. Eventos mediados por los receptores hormonales que regulan la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de las células endometriales. Cuando se acerca el final de la fase lútea del ciclo reproductivo de los rumiantes, el endometrio se hace más sensible a la acción de los estrógenos sumado a que la progesterona, que la bloquea, se secreta en menores concentraciones. El efecto de los estrógenos es activar el sistema nuclear y enzimático celulares para la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, esta lisa el cuerpo lúteo y detiene la producción de progesterona, estableciendo un ciclo de retroalimentación positiva. $\text{PGF}_{2\alpha}$ = prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, E_2 =estradiol, rE_2 =receptores para estradiol, rOT =receptores para oxitocina. Modificado de McCracken *et al* (1984) ²⁷

Otra interacción a considerar entre la progesterona y los estrógenos, es aquella dirigida a la formación de reservas de lípidos en las células del epitelio uterino en forma de gotas de triglicéridos y en menor proporción diacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol. Su importancia radica en que dependiendo de su volumen, la adquisición y movilización de ácido araquidónico hará posible la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en alta o baja cantidad.

La contribución de la progesterona en este patrón es la de estimular la acumulación de lípidos mientras que los estrógenos estimulan la actividad de la PGHsintetasa y otras enzimas involucradas en la transformación del ácido araquidónico en $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Además, para el día 14 del ciclo estral, la progesterona induce la expresión del ARN mensajero del sistema de la ciclooxigenasa, involucrado en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, de las células glandulares epiteliales localizadas en las regiones carunculares del útero y también, refuerza la actividad de la fosfolipasa C endometrial, que junto con las proteínas G, el diacilglicerol y el calcio conforman el segundo sistema de mensajes para la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ inducida por oxitocina. Mientras tanto, los estrógenos no parecen ser esenciales en la formación de receptores de oxitocina aunque sí son críticos en el establecimiento y continuidad del patrón episódico de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ hasta que se completa la luteólisis.⁶⁶⁻⁶⁸

4.3.2. RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN.

Aunque el período crítico en el reconocimiento materno de la gestación, es un lapso de 24 a 48 horas durante la gestación temprana en las especies domésticas, alrededor del día 12 al 13 de la gestación en la oveja, la comunicación entre el embrión y el útero que lo gesta se establece inmediatamente.⁶⁹

Durante las primeras divisiones celulares, el ovocito fertilizado libera una sustancia llamada zigotina, que a su vez estimula la producción endometrial de EPF (Factor Temprano de la Gestación) y más tarde por el mismo embrión, para modular el sistema inmune materno al deprimir la inmunocompetencia de los linfocitos desde el inicio de la gestación.⁷⁰

El factor de agregación plaquetaria (PAF) es el perfecto ejemplo de un autorregulador embrionario, pues antes de la llegada del embrión al útero ya está ejerciendo sus efectos. Se trata de un factor ovocitario que estimula la producción de plasmina y bajo su influjo el embrión se libera de la zona pelúcida y estimula la división celular. Durante la gestación temprana activa plaquetas provocando la trombocitopenia transitoria en la madre, mientras que en el proceso se liberan productos como serotonina, derivados del ácido araquidónico, histamina y factores de crecimiento. Estos subproductos participan en múltiples procesos alternos pero, cabe señalar que se ha identificado que la serotonina puede actuar directamente en el ovario para producir más progesterona. Además de su papel clásico en la activación plaquetaria, es un mensajero intercelular de gran diseminación, actúa como un potente activador metabólico de una gran variedad de células y tejidos y participa en el metabolismo de la glucosa y el lactato durante la preimplantación. Hay evidencias de que todas estas sustancias tienen bioactividad interespecífica, pues mediante transferencias de vesículas o embriones ovinos a receptoras bovinas y viceversa, despliegan el mismo efecto de alargar el ciclo estral.⁷⁰⁻⁷²

Necesariamente, cualquier estímulo embrionario que prevenga la lisis y/o que proteja al cuerpo lúteo debe suceder antes del día 12 al 15, momento en el que se espera la luteólisis natural y en el cual todavía no ocurre la implantación. Tras muchos años de investigación, se ha propuesto que la inhibición de la luteólisis es resultado de la acción conjunta de las proteínas de origen embrionario y endometrial. Dicho intercambio bioquímico no solo contribuye al mantenimiento de la gestación, sino que también a la tolerancia inmunológica y a los cambios que el endometrio sufrirá para nutrir a un embrión.¹⁷

La naturaleza de las señales embrionarias es diversa e inicia cuando toma lugar la expansión del trofoblasto, cuando la división celular es acelerada y aumenta la masa celular total con potencial secretorio.⁷³ El embrión manifiesta su presencia a través del llenado de los cuernos uterinos por la expansión de sus membranas, al moverse en el tracto materno y de modo más importante, por segregar sustancias que establecen una comunicación local entre el cuerno uterino y su ovario ipsilateral, para que de ese modo altere la síntesis endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y otros de sus productos. Se ha concluido que el embrión es autónomo en la gestación temprana pues el oviducto puede nutrir a un embrión de una especie que no sea la propia. Su sola presencia o la de sus membranas, retrasa el descenso de la concentración periférica de progesterona asociada con la luteólisis, detiene la dinámica folicular mientras reduce el ambiente estrogénico, alargando así el ciclo estral a pesar de su pérdida precoz, y aumenta la irrigación del endometrio uterino que esta en su proximidad. Pero, el ambiente materno no resulta un sitio permisivo en el que el embrión se instala, sino que en él ocurren cambios rápidos impulsados por el estado endocrino de la madre. Entonces el embrión debe acoplarse a él acelerando o disminuyendo su tasa de crecimiento de modo tal, que no le resulte tóxico, abrasivo y/o no se pierda el glicocálix epitelial uterino antes del período de adhesión.^{15,74}

Los embriones de todos los animales domésticos son capaces de sintetizar y secretar esteroides, prostaglandinas y polipéptidos durante la preimplantación.⁷⁵ De entre esta gama de sustancias, la proteína trofoblástica tipo 1 es la señal embrionaria de mayor importancia para el reconocimiento materno de la gestación en los rumiantes. Este hecho no le resta importancia funcional al resto de los compuestos que la acompañan, los cuales pueden ejercer sus efectos en diferentes etapas de la gestación e incluso desde la ovulación.

4.3.3 SEÑALES QUÍMICAS DE ORIGEN EMBRIONARIO.

El producto secretorio con mayor importancia funcional del embrión ovino es la proteína trofoblástica ovina tipo 1 (oTP-1), también llamada trofoblastina o interferón tau (IFN τ). Esta proteína consiste en 3 a 4 isoformas polipeptídicas no glicosiladas, con 19 000 a 20 000 Mr de peso y potencial isoeléctrico de 5.3 a 5.8. Perteneció a una subfamilia de los interferones (IFN), de modo más específico a los IFN ω (α II), por ello exhibe sus actividades típicas antivirales, antiproliferativas e inmunosupresoras además de inhibir la vía de síntesis de la PGF $_{2\alpha}$. La oTP-1 se secreta en dos etapas: la primera comprende del día 11 al 16 para evitar la luteólisis del ciclo estral y la segunda abarca del día 25 al 40 de gestación con el objeto de crear el cuerpo lúteo gestacional, cuya función se extiende por lo menos al día 50 en que la síntesis placentaria de progesterona es suficiente para mantener por sí misma la gestación hasta término. La cantidad estimada en que el embrión de 16 días secreta esta sustancia se calcula entre 100-500 μ g en un período de cultivo *in vitro* de 36 horas. Su mecanismo antiluteolítico consiste en actuar como una hormona parácrina con acción local sobre el endometrio uterino, en que aumenta la expresión de 11 proteínas, entre ellas de la microglobulina endometrial β_2 , para así bloquear enzimáticamente la segunda vía de síntesis de PGF $_{2\alpha}$ a nivel del mensajero inositol fosfato/diaglicérol e inhibir la fosfolipasa A $_2$ y la actividad de la cicloendoperoxidasa. Simultáneamente estimula el complejo receptor unido a la fosfolipasa A $_2$, a la 2'5'oligoadenilatosintetasa y el metabolismo del ácido araquidónico, así controla los mensajeros y los sustratos necesarios para sintetizar prostaglandinas y receptores de oxitocina. Dado que en los rumiantes la expansión trofoblástica no es tan rápida como en otras especies, el incremento a nivel celular de 2'5'oligoadenilatosintetasa parece también cumplir con efectos antiproliferativos

hasta que el embrión tenga contacto con el útero por la elongación membranaria.

Figura 5 Se ha comprobado que la potencia de su efecto antiviral corresponde a 10^7 - 10^8 de unidades relativas/ mg de proteína contra un gran rango de virus. Por otro lado debilita el sistema inmune materno contra el embrión al aumentar la presencia de antígenos de superficie MHC clase I y del mediador antiviral Mx. Sin embargo ninguno de los eventos antes descritos ocurre una vez formados los receptores endometriales para oxitocina.^{25,29,57,64,68,76}

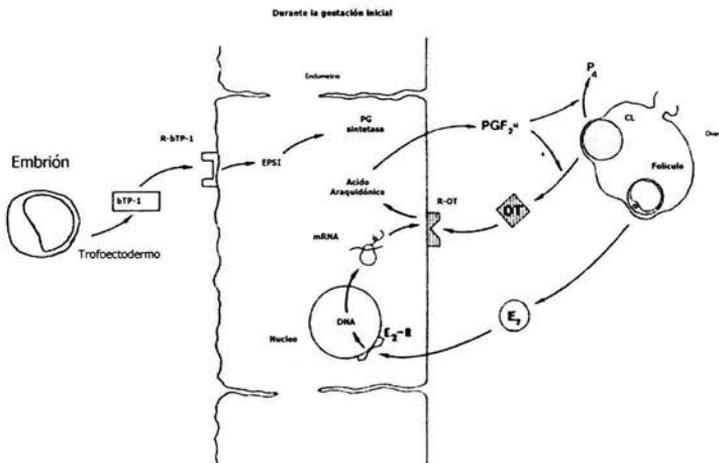


Figura 5 Mecanismo de reconocimiento materno de la gestación mediado por proteínas trofoblásticas. En esquema se muestra el diálogo existente entre el embrión, en este caso bovino, el endometrio y el ovario para regular la secreción de $PGF_{2\alpha}$ y el mantenimiento del cuerpo lúteo. CL=cuerpo lúteo, bTP-1= complejo proteína trofoblástica bovina, OT=oxitocina, P_4 =progesterona, E_2 =estradiol, ROT= receptor de oxitocina, RbTP-1=receptor de bTP-1, EPSt=inhibidor de la prostaglandin sintetasa endometrial. Adaptado de Thatcher *et al* (1989)¹⁵

Otras de las proteínas secretadas por el embrión son aquellas producidas por las células binucleadas del trofoctodermo que migran hacia el endometrio, conocidas como glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) y la proteína B específica del embarazo. Estas alcanzan niveles muy altos del día 21 a 24 después del celo y no regresan a sus concentraciones basales hasta después del día 50 postparto.

Se ha especulado que estas cumplen con un papel de protección del embrión ante el sistema materno, enmascarando los antígenos del trofoblasto y evitando la identificación de los mismos para su rechazo. Dentro de esta familia de compuestos, también se encuentran proteínas de alto peso molecular que contienen un componente lactoaminoglicano, esta naturaleza química puede asociar su función con la adhesividad y protección del embrión, sea contra las proteasas endógenas del lumen uterino o al conformar una barrera inmunoprotectora. El plasminógeno activado en plasmina parece tener la función de sublisis de la zona pelúcida en el desnudamiento, mientras que la enzima activadora del plasminógeno parece tener un papel adhesivo útil en la migración celular durante el período de preimplantación.

Las prostaglandinas de origen embrionario, en particular la prostaglandina E tipo 1 y 2 (PGE₁ y PGE₂), también han destacado una acción luteoprotectora. Se ha sugerido, a partir de la protección experimental del cuerpo lúteo mediante la infusión de PGE₁ y PGE₂, que las prostaglandinas E embrionarias secretadas a partir del día 13 de gestación en la oveja atenúan la acción de la PGF_{2α} por un período corto y temprano. No obstante, es imposible atribuir a estas sustancias un papel primordial en el reconocimiento materno de la gestación debido a los resultados variables en los reportes que hasta la fecha se han presentado.⁶⁷

4.3.4 SEÑALES QUÍMICAS DE ORIGEN ENDOMETRIAL.

Las secreciones uterinas adquieren singular importancia en los rumiantes, en quienes la placentación no es invasiva sino del tipo epiteliocorial con implantación tardía, pues proveen de un medio nutritivo y de soporte para el embrión al menos en la primera parte de la gestación. Además, la evidencia experimental indica que el endometrio tiene mayor habilidad para compensar la asincronía espontánea entre el embrión y el útero que la desplegada por el embrión, a pesar que es el blastocisto el que dicta el cambio del microambiente en el que estará en contacto.^{16,26,77}

En la gestación temprana la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no es suprimida, sin embargo la secreción de PGE_2 aumenta como resultado de metabolismo endometrial, pues así regula la proporción y concentración de estas prostaglandinas. La PGE_2 de origen materno al igual que los catecoestrógenos, tiene un efecto lúteoprotector limitado en el cerdo, oveja y vaca, que puede ser resultado del estímulo directo de la secreción de progesterona por las células lúteas, provoca la liberación de norepinefrina en los nervios simpáticos perivascuales, ejerce un efecto inmune directo sobre los linfocitos maternos en la interface materno-fetal y además tiene un efecto vasodilatador en la cama vascular uterina.^{66,70}

El factor temprano de la gestación (EPF) también es una sustancia relevante en el reconocimiento materno de la gestación. Constituye la respuesta más temprana entre la madre y el producto, inicialmente es producida por el oviducto pero poco después el embrión también la secreta, relacionándole con funciones de inmunosupresión. Existen otras proteínas acarreadoras de origen oviductual que han demostrado tener actividad mitótica similar al suero fetal.^{70,77}

Además, el organismo materno secreta factores de crecimiento bajo influjo de progesterona, entre los que se incluyen el factor de crecimiento transformador (TGF α y β 1), el epidermal (EGF), el parecido a insulina (IGF tipo I y II), el derivado de plaquetas tipo A y el factor de crecimiento tipo sarcoma de Kaposi. Todos ellos funcionan como presuntos inductores del mesodermo, algunos comparten receptores y dictan el patrón de desarrollo temprano del embrión. Su función es estimular la síntesis de proteínas tanto en la masa celular interna como en las células del trofoectodermo, influyendo en fenómenos básicos como la compactación, la formación del blastocisto, la activación enzimática de las aromatasas y la alta diferenciación de células del disco embrionario y del útero en el caso del IGF, o en la decidualización e implantación en el caso de EGF y TGF α .^{1,78}

La sustancia conocida como inhibidor intracelular endometrial de la prostaglandinsintetasa (EPSI), es secretada por el sistema materno de la vaca en respuesta a la secreción del embrión de bTP-1. Este hecho indica que de alguna manera el bTP-1 regula la secreción de PGF_{2 α} de modo indirecto a través de ese inhibidor.¹⁵

También hay secreciones uterinas que participan en la transformación epitelial para la nutrición del futuro feto, cuya actividad se desarrolla por lo general a mediano y largo plazo. Entre ellas se encuentran la uteroferrina que participa en el transporte del hierro; enzimas y polipéptidos asociados al retinol responsables de la nutrición del embrión, la diferenciación y proliferación celular y la morfogénesis; el sorbitol de origen endometrial acompañado de su enzima reductora aldosareductasa están presentes en la superficie epitelial para nutrir al embrión por lo menos hasta que el corión sea capaz de producirlo y componentes de la cascada proteolítica como el plasminógeno, inhibidores de plasmina/tripsina/proteasa/uroquinasa que

están implicados en la remodelación tisular para la implantación. A su vez, enzimas como la fosfolipasa alcalina endometrial pudieran estimular la secreción de las glándulas uterinas (histotrofo) o participar en la reabsorción de metabolitos y en el metabolismo transcelular del epitelio endometrial. Por último, el útero segrega sustancias dirigidas al rol inmunosupresor, de las cuales se han identificado esteroides, glicoproteínas específicas de la gestación, el sistema de la poliaminoxidasa, el mismo EPF, entre otros que en particular disminuyen la citotoxicidad de los linfocitos maternos. Se ha demostrado que la progesterona retrasa la infiltración leucocitaria al útero y promueve la síntesis y/o liberación de inmunosupresores endometriales como los antes citados, y que estas funciones son más potentes cuando los animales se encuentran gestantes.^{27, 70-72}

No obstante, la relación madre-embrión no es la única forma de comunicación bioquímica que posibilita la supervivencia embrionaria, sino que también hay intercambio de sustancias entre los embriones que ocupan el mismo útero. La producción de proteínas dirigidas al reconocimiento materno de la gestación, por dos o más embriones perfectamente sincronizados, puede agilizar la respuesta materna y reforzar los mensajes químicos si en algún momento, la secreción de alguno de ellos fuera insuficiente para garantizar la gestación. Por otro lado, cualquier diferencia en la etapa de desarrollo entre dos o más embriones podría significar la muerte del menos avanzado, si es que este resulta incapaz de revertir la asincronía e incompatibilidad con el ambiente que forman la madre y los embriones más desarrollados. Otro aspecto que estimula la competencia entre dos embriones y que compromete la supervivencia de uno o de ambos, es que las ovulaciones hayan ocurrido en un solo ovario y de ese modo se generen fallas migratorias al mismo cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo.^{17,19,27,74,79}

4.4 MORTALIDAD EMBRIONARIA

La mortalidad embrionaria es uno de los aspectos en los que más se ha puesto atención y sin embargo, todavía no se conoce con exactitud la cantidad de factores involucrados en ella y sus interacciones para producirla o evitarla. Se considera que la mortalidad prenatal es un proceso natural en los mamíferos, por el cual el organismo materno regula su capacidad para producir crías en un ambiente favorable que les ofrezca mayores probabilidades de sobrevivir. Es por ello que en especies polítopas como la cerda, la pérdida prenatal se calcula entre 30 y 40%, siendo que en esta especie las fallas de fertilización son muy raras.

La transferencia embrionaria tiene múltiples ventajas para su aplicación en la reproducción asistida en animales domésticos. Por si misma, la transferencia de embriones puede reducir las pérdidas embrionarias asociadas con fallas en la fertilización y al desarrollo aberrante de embriones defectuosos (equivalentes al 40% del total), sin embargo, las dificultades que limitan su uso práctico tienen que ver con el costo-beneficio que conlleva este procedimiento.^{29,80}

Tomando en cuenta los resultados alentadores que se obtienen con la reproducción asistida, la transferencia de embriones no debe considerarse como la panacea. Es cierto que las tasas de preñez han ido en constante aumento conforme se definen las condiciones de operación óptimas de esta técnica y que esto indica que existen factores deletéreos que pueden ser revertidos, no obstante, no debe olvidarse que la gestación, sobre todo en su fase inicial, es un ambiente muy delicado y que al manipularlo, el hombre determina cierto grado de su deterioro. De hecho es bien aceptado por la comunidad científica que no existe ningún factor manipulable que mejore consistentemente la supervivencia embrionaria, porque cada factor establece un complejo sistema de interacciones con el medio materno, las capacidades del embrión y otros factores.^{18,70,81}

Uno de los problemas asociados a cualquier manejo reproductivo es la incidencia inevitable de mortalidad del producto. Las pérdidas prenatales se han clasificado en 3 categorías principales nombradas falla en la fertilización, mortalidad embrionaria y mortalidad prenatal que pueden deberse a desórdenes maternos o embrionarios. En las últimas dos categorías, las cuales se hacen más importantes en la transferencia de embriones puesto que las fallas de fertilización fueron superadas por la hembra donadora y la selección de embriones transferibles, la ocurrencia se ha valorado en 2 períodos: la pérdida previa a los días 17-18 es llamada mortalidad embrionaria y aquellas que ocurren en el período del día 18 al término se refieren como mortalidad o pérdida fetal. Sin embargo, es muy difícil distinguir la falla en la fertilización propiamente dicha de la muerte precoz del cigoto, pues muchas veces esta última se debe a una fertilización anormal. Mucho se ha mencionado de la pérdida del producto en una ley de "todo o nada" en la que se involucra la interrupción abrupta del embarazo por la muerte del(os) embrión(es) y que muchos autores atribuyen al efecto materno o a alteraciones en la secuencia de maduración de los ovocitos. Pero, la falla embrionaria tiende a tratar a los embriones o fetos como individuos, resultando en la pérdida parcial de la preñez o disminución en la prolificidad si es que existía más de un embrión. En la especie bovina, la falla embrionaria es indistinguible de la materna cuando ya ocurrió la placentación, ya que la pérdida de un producto conlleva a la de un posible segundo porque son contenidos en una sola placenta anastomosada. Por esta razón, otra clasificación útil en la distinción de los factores que conducen a la mortalidad y supervivencia embrionaria es aquella que divide las pérdidas en basales e inducidas. Cuando la mortalidad embrionaria es calculada en un rebaño manejado en buenas condiciones de manejo, se asume que las causas que las provocan no se asocian a algún factor ambiental o nutricional, sino que se deben a la incapacidad de los gametos para ser fertilizados o al sistema materno útero-tubárico, que soporta el desarrollo de los futuros embriones, a esto se le conoce pérdida embrionaria basal. Por el contrario,

bajo ciertas circunstancias puede detectarse un incremento en la mortalidad debido a factores detrimentales genéticos o ambientales y a este se le llama pérdida embrionaria inducida.^{20,81-85}

En múltiples estudios realizados en rumiantes, se ha demostrado que la mayor parte de las pérdidas del producto ocurren antes o durante el período crítico del reconocimiento materno de la gestación, es decir, en las 2 o 3 primeras semanas de la gestación. Dichas estimaciones comprenden la mortalidad prenatal del 6-40% del total de cigotos de un rebaño comercial con asistencia reproductiva mínima y cerca de 27% de las pérdidas fetales posteriores al diagnóstico ultrasonográfico de la gestación en el día 17-19 del empadre (que se ajustan a 20-30% durante el primer mes). Usando el trasplante embrionario estas corresponden al 61% del total de embriones transferidos de los cuales del 23-79% perecieron antes de la implantación y alrededor de 19-26% para el día 30 en ovejas. Mientras que en vacas la falla en la fertilización y mortalidad embrionaria alcanzan del 30 al 40% de reducción en la eficiencia reproductiva y que en adultas que ya han parido previamente el total se debe a mortalidad embrionaria. En estas especies la tasa de fertilización es óptima cuando el 70% de las ovulaciones terminan en nacimientos vivos, pero en la oveja se han reportado tasas de fertilización del 85-95% cuando las condiciones del semental son favorables.^{16-17,71,81-82,85-88}

Por otro lado las pérdidas fetales que ocurren en la embriogénesis media (días 30 a 40) al término son muy pequeñas y que por lo general se deben a deficiencias minerales, abortos infecciosos o tasas de ovulación mayores a 3 en razas no prolíficas.⁸⁶

De tal forma que, muchos investigadores han desarrollado el concepto de crear a la "receptora universal", como un coadyuvante que reduzca las pérdidas embrionarias que hacen económicamente inaceptables los resultados hasta ahora obtenidos. Además, podría solucionar algunos casos de vacas repetidoras u ovejas improductivas que no pueden quedar gestantes por fallas en la fertilización, imbalances hormonales y ciclos de duración irregular. La importancia en la que se basa el desarrollo de esta nueva tecnología radica en que la hembra, o ambiente materno, contribuye en mayor medida en la variación del nivel de pérdida, ya que participa desde la fertilización hasta el destete de la cría desplegando efectos genéticos y uterinos-no genéticos. La receptora universal es la hembra en que se van a transferir embriones y que ha recibido algún tratamiento que mejore la probabilidad de que ese embrión llegue a término. Entre los numerosos intentos de mejorar las condiciones prestadas por la receptora se encuentran: la infusión intrauterina de homogenados de embriones, vesículas trofoblásticas, interferones y oTP-1 natural o recombinante al momento de la transferencia embrionaria, así como, la administración de progesterona en los primeros días de gestación o de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), su agonista la Buserelina o gonadotropina coriónica humana (hCG) en el inicio de la fase lútea previa a la transferencia; y que en general han aumentado las tasas de gestación. 15,21,68,70,73,76,85-86,89-91

De modo paralelo, se ha llevado a cabo en bovinos el uso de la transferencia de embriones en hembras receptoras que ya han sido servidas, generalmente por inseminación artificial, para aumentar la frecuencia de partos múltiples, obteniendo mejoras en los parámetros reproductivos de esas hembras.⁹²

Si fuera posible aplicar este procedimiento en ovinos de manera exitosa, se obtendrían dos grandes beneficios: aumentar la supervivencia del embrión transferido y por ende, el porcentaje de éxito de dichas transferencias y, en segundo lugar, optimizar el uso reproductivo de la receptora, es decir que además de gestar el embrión transferido continúe su función reproductiva de modo normal. Ambas razones atraerían a su vez una mayor rentabilidad del procedimiento pues, al obtener mayor número de crías de valor genético alto se recuperan en mayor grado los recursos económicos invertidos y además, se justifica aún más la manutención de la receptora ya que simultáneamente se obtendrían crías de ella cuando en un programa convencional de transferencia eso no es esperado. Mantener una oveja receptora improductiva no solo es parte del fracaso del programa de transferencia, sino que además, complica en mayor grado dejarla gestante, poniendo en riesgo los parámetros reproductivos esperados en ese año y la duración del empadre. La dificultad radica, de acuerdo con varias investigaciones realizadas en esta especie, en desequilibrios hormonales y del transporte de gametos debidos al uso de progestágenos y alteraciones del ciclo por la muerte tardía (después del día 12), persistencia y reabsorción del embrión. Finalmente, cabe la posibilidad de que al aplicar esta técnica se produzcan trillizos, porque no esta bajo control la tasa ovulatoria y fertilización de la receptora. Los trillizos siempre atraen consecuencias negativas para el productor, puesto que la crianza se torna difícil y se obtienen corderos de bajo peso al destete.^{12,21,81,85-86,93-96}

Otra dificultad que aún no se tiene controlada es la determinación del momento en que ocurren las pérdidas embrionarias, pues cuando estas ocurren de modo muy precoz no afectan el ciclo estral de la receptora. Varios autores concluyeron que la opción más adecuada es el registro del retorno a estro por encima de las mediciones plasmáticas de progesterona (<0.05 ng/ml más allá del día 18) o bien, la combinación de ambas.^{12,38,81,85,97}

La razón de esta preferencia es que si el retorno es menor a 19 días de la transferencia el embrión, este se encontraba ya moribundo al momento de la transferencia y nunca se dio el reconocimiento materno de la gestación, mientras que si se encuentra en el rango de los 19 a 64 días se debe a mortalidad embrionaria tardía, teniendo una ventana de error de detección a los 30-36 días en que posiblemente la detección de estro previa fue defectuosa. Mientras tanto la medición de progesterona es muy imprecisa ya que la muerte prematura no puede detectarse por el aporte del cuerpo lúteo antes de la luteólisis y una muerte tardía no tendrá luteólisis inmediata por lo que los niveles se mantendrán altos hasta que la reabsorción se complete y el cuerpo lúteo de gestación, que es más resistente a la luteolisina, cese sus funciones.²³

La fertilización natural acompañada de la transferencia de un embrión ajeno es acorde con muchas observaciones hechas a lo largo de las últimas décadas. Por ejemplo, se ha notado que la sola presencia del embrión, sus homogenados o de sus membranas, extienden la duración de la fase lútea, lo que podría dar oportunidad a los embriones transferidos o al propio de desplegar las señales químicas adecuadas en tiempo y cantidad. Este fenómeno es debido a que dentro de ellos se encuentran las sustancias necesarias para comunicarse con el ambiente materno, y en el caso de las vesículas embrionarias y los embriones intactos la capacidad secretora es aún activa, siendo interespecífica entre el bovino y ovino.
15,26-28

Es por esta interespecificidad de las proteínas trofoblásticas y la semejanza en el efecto de asincronía, los mecanismos de control hormonal, el reconocimiento de la gestación y la supervivencia embrionaria, que no deberían esperarse resultados diferentes de la transferencia de embriones en receptoras servidas por monta natural realizadas en ovinos. Además, cuando se transfieren dos embriones

al mismo oviducto, se obtiene una mejor supervivencia que cuando cada embrión es transferido de forma bilateral, lo que ha sugerido la existencia de una clase de sinergia entre los dos embriones. Si a ello le sumamos que en las ovejas las ovulaciones dobles son muy frecuentes y que se ha demostrado que la presencia de dos cuerpos lúteos hace necesaria la secreción de mayores cantidades de $PGF_{2\alpha}$ para que se lleve a cabo la luteólisis, en esta especie obtendríamos un factor protector adicional que, se vería enfatizado por la presencia de dos embriones que acumulen sus secreciones para proteger a estos cuerpos lúteos.^{3,21,27-28,98}

4.5. INDUCCIÓN DE PARTOS MÚLTIPLES EN RECEPTORAS GESTANTES.

La inducción de gestaciones múltiples en receptoras de embriones fue dirigida inicialmente al mayor conocimiento de la fisiología de la gestación en bovinos, cerdos y ovinos. Esto es debido a que la transferencia de ovocitos fertilizados, permite la evaluación independiente de las contribuciones del genotipo de la madre y sus crías en la supervivencia prenatal, el período de gestación, el peso al nacimiento y la supervivencia neonatal, evitando las fallas en la fertilización.⁹⁹

Más tarde la investigación en esta área se enfocó a las ventajas que podría atraer a la producción de carne bovina y en las granjas lecheras, siempre y cuando se lograra estandarizar resultados satisfactorios por esta técnica y considerando que la incidencia natural de partos gemelares en bovinos asciende de 1 a 5%. La obtención de más de una cría por ciclo en el bovino sería conveniente por la producción de más kilos de carne por gestación en el caso del ganado de carne, mayor producción láctea en ganado lechero y por supuesto, la obtención de mayor cantidad de crías de hembras genéticamente superiores.^{79,100}

Sin embargo, existieron inconvenientes productivos en la adopción de esta tecnología como por ejemplo, el aumento en la incidencia de distocias dentro de los ranchos ganaderos, consecuentemente, la extensión del ciclo reproductivo de la madre y los días abiertos en ganado lechero y el aumento en la mortalidad de los terneros, así como también, la mayor probabilidad de freemartinismo en las crías y que estas tuvieran un bajo peso al nacimiento reduciendo aún más su probabilidad de supervivencia. Además debe considerarse que cualquier operación destinada al aumento en la presión de selección en la hembra, en este caso la transferencia de embriones, traerá como consecuencia la manutención de una gran cantidad de hembras y la reducción de la disponibilidad en el número de vientres de reemplazo.^{22,100}

Se han utilizado diferentes protocolos de transferencia de embriones para la inducción de gestaciones múltiples: la transferencia bilateral de dos embriones, la transferencia unilateral de dos embriones, la transferencia de un embrión a hembras que fueron montadas por un semental y la transferencia de un embrión a hembras que fueron inseminadas artificialmente. De entre ellas, las más exitosas en producir más de un producto son las que incluyen el servicio fértil previo a la transferencia (40 a 60% en la tasa de parición y 30-70% de producción de gemelos), para ello es necesario un alto porcentaje de fertilidad a la inseminación artificial.^{79,92,101-103}

Las razones propuestas para que la sola transferencia de dos embriones no sea tan efectiva en la producción de más de una cría, a pesar de alcanzar porcentajes de fertilidad más altos, son que la disponibilidad de dos ovocitos fertilizados en un ambiente uterino favorable no es la única premisa en la supervivencia de dos embriones en coexistencia, sino que también son importantes el "límite de la capacidad materna" (calculado por Dickinson *et al* en 1962)

relacionado con el peso y número de crías que el útero de cada especie o raza puede nutrir y la mortalidad por sobrepoblación en el cuerno uterino ipsilateral al CL después de la transferencia bilateral.^{79,102}

En este campo, la participación de la especie ovina se encuentra limitada, siendo representada por algunos estudios de presensibilización uterina con espermatozoides y algunos experimentos dirigidos a la edad máxima del embrión en que éste puede conducir a la transferencia exitosa.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ La mayor parte de ellos no tiene mayor relación a la inducción de partos múltiples, ya que consisten en la recuperación del aparato reproductivo pocos días después de la fecha esperada de la implantación para su estudio histológico. Sin embargo, Moor y Lawson (1966) lograron gestaciones a término en ovejas apareadas naturalmente sometidas a la transferencia sincrónica de embriones de 13 y 14 días de edad. Los resultados de este experimento mostraron un mayor porcentaje de parición con respecto a la transferencia practicada en condiciones similares a ovejas que no habían recibido monta natural. No obstante, el mayor número de crías obtenidas correspondió a la monta natural y solo una oveja parió tanto una cría concebida por la monta natural como una cría transferida.

Resumiendo los resultados de todas los experimentos realizados en la inducción de partos múltiples mediante transferencia de embriones tenemos que, no existe ningún efecto en la supervivencia de los embriones transferidos y la producción de "gemelos" de la raza de madre o de los productos que gesta. No existe efecto si el depósito de embriones es contralateral, ipsilateral, bilateral o unilateral cuando se ha dado un servicio fértil a la receptora previamente, ni debido a la tasa ovulatoria de esta última, pues se ha comprobado que de forma natural, el porcentaje de ovulación múltiple calculada de 4 a 13% no culmina en la producción de más de un producto en todos los casos. Por el contrario, el manejo sanitario

adecuado del hato, una mayor cantidad de partos experimentados por la receptora, la prolificidad racial y la secreción embrionaria de productos relacionados con el reconocimiento materno de la gestación y su acumulación, sí son determinantes para la producción de "gemelos", llamados así aunque no estén necesariamente relacionados genéticamente.^{66,79,100-101,103,106-108}

V MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (C.E.I.E.P.O.) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El Centro se encuentra localizado en el poblado de Tres Marías, que corresponde al municipio de Huitzilac del noroeste del estado de Morelos, con las coordenadas geográficas de 19° 13' norte, 99° 14' longitud oeste y 2810 msnm. La región se caracteriza por un clima templado semifrío, siendo el más húmedo de los climas subhúmedos, con verano fresco y largo, precipitación promedio anual de 1724.6 mm y temperatura media anual de 9.9°C, clasificado como C (w²) (w) (b') i de acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por Enriqueta García.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Los animales experimentales utilizados fueron ovejas adultas de biotipo cárnico de las razas Suffolk y Dorset. Ambas razas cuentan con prolificidad media, correspondiendo de 1.4 a 1.8 para Dorset y de 1.4 a 1.7 para Suffolk. La tasa ovulatoria reportada para la raza Dorset es de alrededor de 1.6 y para la raza Suffolk oscila entre 1.2 a 1.7¹¹²⁻¹¹³ Las ovejas fueron seleccionadas poco antes del inicio de la época reproductiva si cumplían con los siguientes aspectos: condición corporal de 2.5 a 3 puntos, contar con por lo menos un parto previo y registros reproductivos que denotaran buen desempeño. En total fueron 78 receptoras y 11 donadoras, correspondiendo a 39 ovejas receptoras por cada raza y 6 ovejas Dorset y 5 Suffolk en el caso de las donadoras.

El manejo sanitario de las ovejas utilizadas no fue diferente al de todo el rebaño, recibiendo la desparasitación con el fármaco adecuado de acuerdo a estudio coproparasitológico rutinario realizado cada mes, inmunización previa al parto contra *Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii* y *C. perfringens* tipo C y D, vitaminación con vitaminas A, D y E al momento de la desparasitación e inmunización, y se redujo la reagrupación en la medida de lo posible, para evitar el estrés que en estos animales causa. Se mantuvieron en un pastoreo controlado con encierro nocturno en praderas introducidas de rye grass perenne y anual, kikuyo, bromus, orchard, poas, trébol rojo y trébol blanco. Su alimentación fue complementada con un concentrado de cereales y heno de avena para cubrir las necesidades de mantenimiento hasta el último tercio de la gestación, momento en que aumentó el nivel energético del concentrado para satisfacer las necesidades de mayor crecimiento fetal y la próxima lactancia de las crías.

De acuerdo al diseño experimental, las ovejas fueron divididas en 3 grupos. El primer grupo llamado monta natural (MN) constó de 26 ovejas, 13 de las cuales eran raza Dorset y 13 fueron raza Suffolk, y que recibieron la monta natural de un semental fértil correspondiente a su raza, después de la sincronización con progesterona para obtener un parámetro control de la fertilidad del rebaño. El segundo grupo llamado transferencia de un embrión (TE) constó de 26 ovejas con la misma distribución racial que el anterior, éstas recibieron un embrión de la etapa compatible con su ciclo estral después de su sincronización y el embrión a transferir fue de la misma raza de la receptora en todos los casos. En las ovejas que presentaron el celo con anterioridad al de la donadora (no > 24 hr) se colocaron embriones en estadio de desarrollo más avanzado (blastocisto) y en receptoras que mostraron celo después de la donadora con un margen no mayor a 24 horas, se les transfirieron embriones en estadios iniciales de desarrollo (mórulas).

El tercer y último grupo, corresponde al tratamiento que incluye la monta natural y la transferencia de un embrión en la misma receptora sincronizada (MN*TE) y constó de 26 ovejas con la misma distribución racial que los anteriores. Para descubrir el porcentaje de supervivencia de los embriones resultantes de la fertilización de la receptora así como de los transferidos, fue necesario que la receptora se apareara con un carnero de la misma raza, mientras que el embrión a transferir debía ser de una raza diferente, de ese modo fue posible determinar su procedencia al parto. Todas las ovejas de los grupos MN y MN*TE fueron montadas por un semental al menos en dos ocasiones y todas las ovejas de los grupos TE y MN*TE se sometieron a la transferencia de embriones laparoscópica.

TRATAMIENTO HORMONAL

Los compuestos hormonales fueron usados con dos propósitos principales y estos fueron: sincronizar el ciclo estral de las ovejas con fines logísticos y el de provocar la ovulación múltiple en aquellas ovejas que funcionarían como donadoras de embriones.

La sincronización del ciclo estral se realizó con dispositivos internos de liberación controlada de 300 mg de progesterona natural (CIDR)* por un período de 12 días. En las receptoras el retiro del CIDR se llevo a cabo 12 horas antes que en las donadoras (día 11.5) y se les administraron 200 UI de eCG.** En aquellas ovejas que solo recibieron monta natural también se aplicaron 200 UI de eCG al momento del retiro del dispositivo intravaginal.^{3,9,11,52,114-115}

* Eazi-breed CIDR® Dispositivo vaginal con progesterona al 9% (0.3 g). InterAg. N.Z.

** Folligon® Liofilizado de Gonadotropina sérica (PMSG)(1000UI recons en 5 mL) Intervet. Holanda

Las donadoras de embriones se sometieron a un tratamiento superovulatorio y para tal efecto se utilizó hormona foliculo estimulante de origen ovino (FSH)* El compuesto hormonal se empezó a administrar vía intramuscular dos días antes del retiro del CIDR, en dosis decrecientes y 8 inyecciones aplicadas con intervalos de 12 horas entre sí.^{9,33}

El protocolo de dosificación utilizado fue el siguiente: el primer día se aplicó una dosis de 1.76 mg por la mañana y otra de 1.32 mg por la tarde; el segundo día (un día antes del retiro) se aplicó una dosis de 1.32 mg y otra de 0.88 mg, el tercer día (día del retiro) se aplicaron dos dosis de 0.88 mg y un día después del retiro dos dosis de 0.44 mg por mañana y tarde.

Transcurridas 24 horas después del retiro del CIDR, se inició la detección de la conducta de estro mediante la introducción de un carnero entero con mandil al corral en que se encontraban las ovejas sincronizadas, el procedimiento se repitió cada 8hr y se consideró en celo sólo a aquellas ovejas que se mantenían quietas cuando el carnero las montaba. En las ovejas del grupo TE, sólo se registró la hora y el día en que ocurrió el celo para determinar posteriormente si podían recibir un embrión y la donadora que le correspondería por sincronía, mientras que las ovejas de los grupos MN y TE se les dio monta con un semental de su raza a las 12 hr y 24 hr después de haber sido detectadas en celo. A partir de que fueron determinadas en celo (día 0), las donadoras recibieron la monta de un semental de acuerdo a su raza cada 8 horas mientras permanecieron receptivas, para así asegurar la fertilización de la mayor cantidad de gametos ovulados. La recolección de embriones se realizó el día seis posterior al celo en estas ovejas por laparotomía media ventral.

* Ovagen.®Liofilizado de extracto pituitario ovino (FSH)(17.6mg recons. en 20 mL). Inmuno chemical products. N.Z.

RECOLECCION DE EMBRIONES

Para realizar la recuperación de embriones se sometió a las hembras donadoras a anestesia general. Primero se tranquilizó a estas aplicando xilazina al 2% a razón de 0.22 mg/kg de peso vivo vía intramuscular, se esperó por 10 minutos para que ejerciera su efecto y posteriormente se indujo la anestesia usando ketamina en dosis de 2 mg/kg de peso vivo inyectándola por vía endovenosa.

Antes de la recolección, se rasuró, lavó con jabón quirúrgico y se desinfectó la región abdominal. Entonces se procedió a realizar una laparotomía media ventral que permitiera el acceso al aparato reproductor de la donadora. Se hizo una incisión de aproximadamente 4 cm de largo y 3 cm anterior a la ubre sobre la línea media. Se palparon los ovarios en búsqueda de cuerpos lúteos compatibles con una respuesta superovulatoria satisfactoria, de ser así, se exteriorizó el útero y se observó que los cuerpos lúteos en los ovarios tuvieran una buena apariencia en cuanto a tamaño y forma.

Una vez afuera, los cuernos uterinos se mantuvieron húmedos irrigándolos con solución salina fisiológica al y cubriéndolos con gasas húmedas para evitar de ese modo futuras adherencias. Después se realizó cuidadosamente una punción en la base del cuerno uterino mediante un catéter intravenoso calibre 14G x 5½, para que a través de ese orificio se introdujera una sonda Foley (calibre 10Fr)* que bloqueara el escape del medio hacia el cuerpo del útero y recuperara el medio contenido en el cuerno uterino. Mediante el uso de otro catéter intravenoso, pero de menor calibre (18G x 5¼), insertado en la punta del cuerno uterino se infundieron 60 ml de medio de lavado.** Este medio se inyectó en 3 porciones de 20 ml, dando un masaje gentil cada vez con el objetivo de que los embriones se desprendieran de

* Sonda foley Adex® Sonda de látex estéril tipo foley de 2 vías. ADEX. México.

** Vigro complete flush solution® Solución de lavado. AB Technology. U.S.A.

los pliegues endometriales y por acción de la turgencia del cuerno uterino el medio de lavado fluyera a un filtro concentrador.* Finalmente, se lavó de igual forma el otro cuerno uterino, se suturaron las heridas hechas por la sonda, el útero se regresó a su posición original en la cavidad abdominal y se cerró la incisión.⁸

Los embriones obtenidos se transportaron lo antes posible al laboratorio para su evaluación morfológica bajo el microscopio estereoscópico. A lo largo de este lapso, los embriones se mantuvieron en un medio de mantenimiento** en el que fueron enjuagados de los detritus celulares, se registró la identificación de la donadora de la cual se obtuvieron y se clasificaron de acuerdo a su integridad y viabilidad aparente. Solo fueron seleccionados para su transferencia los embriones con grado 1 y 2 de excelente y buena calidad respectivamente.^{2-3,9,24,52,56-57}

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Para la transferencia de embriones las ovejas receptoras se anestesiaron del modo antes descrito para las donadoras con xilazina (0.22 mg/kg de peso vivo) y ketamina (1mg/kg de peso vivo). También se rasuró, lavó y desinfectó una reducida región del abdomen bajo. En la pared abdominal se hicieron dos incisiones, aproximadamente a 4 cm de la línea media y 3 cm anteriores a la ubre. A través de una de estas incisiones se insertó un trocar con cánula por donde se introdujo un laparoscopio recto de 5 mm de diámetro. Antes de localizar el útero y los ovarios para su examen, se insufló la cavidad con aire usando una aguja de Veress. Se localizó el ovario con el cuerpo lúteo más desarrollado y a través de una segunda cánula, se introdujeron unas pinzas con las que se retrajo el cuerno ipsilateral a dicho cuerpo lúteo.

* Filtro Em con® Concentrador de embriones irradiado. Immunsystems Inc. U.S.A.

** Vigro holding plus® Medio de mantenimiento. AB Technology, U.S.A.

El criterio para la transferencia fue el siguiente: cualquier oveja receptora que presentara un cuerpo lúteo en aparente regresión o sin cuerpo lúteo se excluyó del estudio y no recibió embriones, la raza del embrión debía ser igual a la de la receptora en el caso del grupo TE y diferente a la de la receptora en el caso del grupo MN*TE y por último, el sitio de transferencia para las receptoras del grupo TE es la base del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo y en las del grupo MN*TE en la base del cuerno contralateral al cuerpo lúteo. Es bien conocido que el cuerno ipsilateral al ovario con el cuerpo lúteo es el sitio de elección para la transferencia de embriones, por ello en el grupo TE se utilizó para albergar el embrión transferido. Por otro lado, el desarrollo de embriones en el cuerno contralateral es posible cuando éste no es aislado quirúrgicamente del resto del tracto reproductor y el endometrio. En el grupo MN*TE se esperaba que el (los) ovocito(s) fecundado(s) de la receptora ocupara(n) el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, y en afán de no crear una posible competencia entre los dos o más embriones en crecimiento, el embrión transferido se colocó en el cuerno contralateral.^{49,79,103,105} En el cuerno uterino seleccionado se hizo una pequeña punción con un catéter intravenoso (18G x 5¼) y se transfirió el embrión por medio de una jeringa insulínica conectada a un catéter (3½Fr)* Finalmente se regresó el cuerno uterino a la cavidad abdominal y se cerraron las incisiones.^{3,9-10,24,52,57,74,97,114}

En todas las ovejas en que se practicó alguno de los procedimientos quirúrgicos antes descritos, se administró penicilina en dosis preventiva de 22 000 UI por kg, fue vigilada su conducta en el período postoperatorio en búsqueda de signos de infección y se retiraron los puntos de sutura en la piel después de 10 días. Durante este período se minimizó su manejo lo más posible y se puso especial atención en la higiene de los corrales en que se alojaron.

* Catéter Tom-cat.® Kendall U.S.A

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al momento del parto se registró la fecha, la cantidad de corderos nacidos, su raza y la identificación de la oveja que lo(s) parió, y a partir de estos datos calcular los porcentajes de fertilidad y el valor de prolificidad de cada uno de los tratamientos. El porcentaje de fertilidad se refiere a la cantidad de ovejas que bajo alguno de los tratamientos pudieron gestar un embrión propio o ajeno hasta el término de la gestación. El valor de prolificidad es la proporción de crías obtenidas con respecto al número de ovejas paridas, el valor que se toma en este escrito en realidad se conoce como prolificidad relativa. La tasa de supervivencia embrionaria se pudo obtener cuando se tuvo la certeza de la presencia de un embrión en la oveja receptora (por la transferencia del mismo en los grupos TE y MN*TE específicamente) e indica la proporción de estos embriones que lograron terminar su desarrollo. En las ovejas de estos dos grupos se observaron con ayuda del laparoscopio y contaron los cuerpos lúteos al momento de la transferencia embrionaria.

Fertilidad= borregas paridas/borregas expuestas x 100

Prolificidad relativa= corderos nacidos/borregas expuestas x 100

Supervivencia embrionaria= corderos nacidos/embriones transferidos x 100¹⁰⁵

Tasa ovulatoria= número de cuerpos lúteos/oveja receptora

Utilizando el paquete estadístico SPSS versión 10,¹¹⁶ se comparó el porcentaje de fertilidad de los tres grupos, así como la tasa de supervivencia embrionaria por una prueba de chi cuadrada. La tasa ovulatoria y la prolificidad se compararon mediante una prueba de t usando el mismo programa de cómputo.^{12,117}

VI RESULTADOS

Se registraron 54 partos de las 73 ovejas sometidas a los distintos tratamientos, lo que significa que se obtuvo un 73.97% de fertilidad general. La cantidad de crías obtenidas en total fue de 77 corderos otorgando un valor de prolificidad de 1.05 agrupando los 3 grupos de hembras experimentales. Los grupos TE y MN*TE sufrieron reducciones en el número original de animales experimentales, se excluyó del experimento a 3 receptoras que presentaron estro tardío que resultaría en asincronía con los embriones y a 2 que no presentaban al menos un cuerpo lúteo de aspecto saludable al momento de la transferencia. Sin embargo, el balance racial en el experimento no se vio afectado. Cuadros 1 y 2

Cuadro 1: FRECUENCIAS PRODUCTIVAS DE ACUERDO A LA RAZA Y GRUPO EXPERIMENTAL.

	RAZA DE LA RECEPTORA		TOTAL
	SUFFOLK	DORSET	
TRATAMIENTO MN			
Animales experimentales	13	13	26
Gestantes	12	10	22
Paridas	12	10	22
Parto simple	5	4	9
Parto doble	7	6	13
Crías obtenidas	19	16	35
TRATAMIENTO TE			
Animales experimentales	12	12	24
Gestantes	6	9	15
Paridas	6	9	15
Parto simple	6	9	15
Parto doble	0	0	0
Crías obtenidas	6	9	15
TRATAMIENTO MN*TE			
Animales experimentales	12	11	23
Gestantes	9	8	17
Paridas	9	8	17
Parto simple	4	3	7
Parto doble	5	5	10
Crías obtenidas	14	13	27

Cuadro 2: DISTRIBUCIÓN RACIAL DE LA PROLIFICIDAD Y TASA DE PARICIÓN.

RAZA DE LA RECEPTORA	GRUPO	TAMAÑO DE MUESTRA	OVEJAS PARIDAS	TAMAÑO DE CAMADA		% DE FERTILIDAD	VALOR DE PROLIFICIDAD	CANTIDAD DE CRÍAS	
				1 cría	2 crías			Suffolk	Dorset
				SUFFOLK	MN			13	12
	TE	12	6	6	0	50 ^a	1.0 ^b	6	0
	MN*TE	12	9	4	5	75 ^a	1.5 ^b	10	4
DORSET	MN	13	10	4	6	76 ^a	1.6 ^b	0	18
	TE	12	9	9	0	75 ^a	1.0 ^b	0	9
	MN*TE	11	8	3	5	72 ^a	1.6 ^b	4	9
TOTAL		73	54	31	23	73	1.22	39	40

Literales ^a porcentaje de fertilidad sin diferencia estadística significativa entre grupos ni razas (P>0.05)

^b valor de prolificidad sin diferencia estadística significativa entre grupos ni razas (P>0.05)

En el grupo 1 o monta natural (MN), las 26 ovejas sincronizadas fueron apareadas. De estas, veintidós llevaron a término la gestación pariendo un total de 35 corderos en 13 partos dobles y 9 partos simples. Entonces, el porcentaje de fertilidad corresponde en este grupo a 84.6% y la prolificidad a 1.59. Si se describe a estos datos por raza, corresponden a las hembras de raza Suffolk 13 partos, siendo 7 dobles y 5 simples y 19 corderos raza Suffolk nacidos. Mientras que para la raza Dorset fueron 13 partos que resultaron en 16 corderos raza Dorset distribuidos en 6 partos dobles y 4 partos simples. Cuadros 2 y 3

En el grupo 2 o transferencia de embriones (TE), solo 24 de las 26 ovejas planeadas originalmente fueron sometidas a la transferencia de embriones. De estas 24 receptoras, 15 parieron y dado que se transfirió un embrión en cada receptora se obtuvieron únicamente partos simples, es decir 15 corderos en total. Corresponden a estos datos un 62.5% de fertilidad o si se desea, de supervivencia

embrionaria, y prolificidad con valor de 1. La distribución de las ovejas paridas por raza fue de 6 ovejas Suffolk y 9 Dorset, pariendo corderos de su misma raza.

Cuadros 2 y 3

Cuadro 3: SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA Y TASA DE PARICIÓN MÚLTIPLE

TRATAMIENTO	RECEPTORAS		% FERT.	# CORDEROS NACIDOS	PROLIFICIDAD	ORIGEN CORDERO # CRIAS			SUPERV. EMBRION (% (sobre embrión transf.))	PARTOS MÚLTIPLES	
	Tratada	Parida				Nativo	transferido			Total recep.	Recep. gest.
			Total	A término							
Monta natural (MN)	26	22	84.6 ^a	35	1.59 ^b	35	0	---	---	50	59
Transf. de un embrión (TE)	24	15	62.5 ^a	15	1.0 ^b	0	24	15	62 ^c	---	---
MN más TE	23	17	73.9 ^a	27	1.58 ^b	15	23	8	34 ^c	43	58

Literales^a porcentaje de fertilidad sin diferencia estadística significativa entre grupos ($P > 0.05$)

^b valor de prolificidad sin diferencia estadística significativa entre grupos ($P > 0.05$)

^c tasa de supervivencia embrionaria sin diferencia estadística significativa entre grupos ($P > 0.05$)

Por último, el grupo 3 o monta natural previa a la transferencia embrionaria (MN*TE) fue conformado por 23 ovejas de las 26 receptoras programadas inicialmente, y de estas 17 parieron. De este experimento se obtuvieron 27 crías nacidas de 7 gestaciones simples y 10 gestaciones de dos productos. El porcentaje de fertilidad fue de 73.91% y la prolificidad fue de 1.52 para este grupo.

Como se explicó anteriormente, al nacimiento el fenotipo racial de los corderos revelaría su origen, es decir, si naciera un cordero de raza distinta a la de la oveja que lo gestó significaría que es resultado de la transferencia embrionaria y en cambio, si el cordero nacido perteneciera a la raza de la receptora entonces este sería el resultado de la monta natural que recibió su madre. También se podría esperar que las gestaciones fueran de uno o más productos en varias

combinaciones: partos simples de embriones transferidos, partos simples de embriones nativos*, partos múltiples de embriones nativos y partos múltiples de un embrión transferido y uno o más embriones nativos. Así, se determinó que hubo 6 partos simples y 3 partos dobles como resultado de la monta natural de la receptora, 1 parto simple consecuencia de la transferencia del embrión y 7 partos dobles en que una cría estaba relacionada genéticamente con la madre y la otra no. La distribución racial de los partos fue de 12 ovejas Suffolk preñadas que parieron 14 crías, 10 corderos Suffolk y 4 Dorset distribuidos en 4 partos simples y 5 partos dobles, de entre estos 5 partos fueron resultado de la monta natural (4 partos dobles y 1 simple) y los 4 restantes de la coexistencia de un embrión nativo y uno transferido. En cuanto a las ovejas Dorset, de las 11 ovejas paridas se obtuvieron 13 crías como resultado de 3 gestaciones simples y 5 gestaciones dobles, perteneciendo 8 crías a la raza Dorset y 4 raza Suffolk, cuyo origen se dividió en un parto simple del embrión transferido, 2 partos simples y 2 partos dobles resultantes de la monta natural y 3 partos dobles de la gestación de un embrión propio y uno donado. Cuadros 2 y 3

En el grupo 3 el porcentaje de supervivencia de los embriones transferidos es de 34.78% y el de los embriones nativos no se puede conocer con exactitud puesto que, no sabemos con seguridad si todas aquellas ovejas apareadas tuvieron una fertilización exitosa, si existió en algún momento el embrión nativo o si su ausencia es debida a la mortalidad prenatal esperada en todo rebaño. No obstante, el valor de supervivencia que pudiera lograr si hubiera ocurrido la concepción en todas las ovejas de este grupo, asciende a 84.6%. Cuadros 3 y 4

* El término "nativo" se aplicará para aquella cría o embrión que fue concebido por la receptora después de la monta de un semental de su raza.

Cuadro 4: SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA EN GESTACIONES PRODUCIDAS
POR
TRANSFERENCIA EMBRIONARIA RELATIVA AL CUERPO LÚTEO.

POSICIÓN DEL CUERPO LÚTEO	IPSILATERAL (grupo TE)	CONTRALATERAL (grupo MN*TE)
# EMBRIONES TRANSFERIDOS	24	23
# CORDEROS NACIDOS	15	8
% SUPERVIVENCIA	62	34
# OVEJAS VACÍAS	9	15

La tasa ovulatoria observada en las 47 ovejas que se sometieron a la transferencia de un embrión (grupos MN y MN*TE) y que para tal objetivo, recibieron el mismo tratamiento hormonal, fue de 1.44 ± 0.54 . Este valor se subdivide en la tasa de ovulatoria para Dorset (1.56 ± 0.50) y para Suffolk (1.33 ± 0.56), sin que hubiera diferencias estadísticas significativas entre razas. Cuadro 5

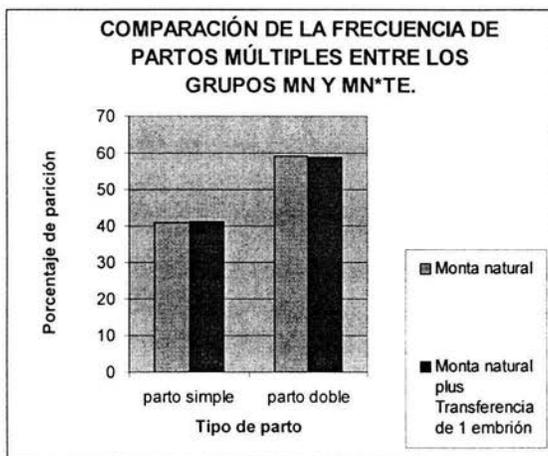
Cuadro 5: TASA OVULATORIA DE ACUERDO A LA RAZA DE LA RECEPTORA.

RAZA	# RECEPTORAS	TASA OVULATORIA
SUFFOLK	1 CL=17	1.33 ± 0.56
	2 CL= 6	
	3 CL= 1	
DORSET	1 CL=10	1.56 ± 0.50
	2 CL=13	

VII DISCUSIÓN

Los resultados que ocupan al presente trabajo semejan aquellos obtenidos en vacas por Diskin y colaboradores, quienes obtuvieron un 61% de vacas paridas de las cuales el 47% produjeron partos dobles (28% del total de las vacas transferidas inicialmente). La forma en estos autores indujeron partos múltiples fue el uso de la monta natural previa a la transferencia de un embrión con raza distinta a la de la receptora y el semental, usando tanto el cuerno ipsilateral como el contralateral como sitio de depósito del embrión sin que esto provocara diferencias notables en los porcentajes de parición y producción de "gemelos".¹⁰¹ En el presente estudio se obtuvo en el grupo experimental 3 o MN*TE un 73% de porcentaje de preñez y un producción de 2 corderos no relacionados genéticamente de 30% del total de hembras transferidas en este grupo. Figura 6

Figura 6. Comparación de la frecuencia de partos múltiples entre los grupos experimentales 1 (monta natural) y 3 (monta natural plus transferencia de un embrión).



Moor y Lawson realizaron un experimento bajo condiciones similares a los descritos con anterioridad, en el cual, se transfirieron embriones de 13 y 14 días de edad en receptoras con servicio fértil y que para la fecha de la transferencia sincrónica (día 13 o 14 del estro) ya se encontraban gestantes. De ese modo obtuvieron un 50% de preñez en que sólo una oveja parió un embrión nativo y un transferido (2.7% de ovejas transferidas), 6 parieron el embrión transferido (16.6%) y 11 el embrión nativo (30.5%). Ellos concluyeron que la transferencia de un embrión ajeno o transferido a ovejas ya gestantes resulta en una alta incidencia de muerte embrionaria, pues los embriones transferidos no solo fallaron en llegar a término, sino que fueron responsables de la interrupción de la gestación del embrión nativo en más de la mitad de las receptoras. Los autores atribuyen este hallazgo a la sobrepoblación, la incompatibilidad genética y a que la alteración del ambiente uterino cuando ya ocurrió la implantación o en un momento muy cercano a ella, siempre pondrá en riesgo la supervivencia del embrión nativo.¹⁰⁵ No obstante, la incompatibilidad genética se encuentra lejos de ser una de las mayores causas ya que, por muchos años se han llevado a cabo transferencias interraciales de manera exitosa, incluso entre especies en la primera parte del desarrollo embrionario, sin afectar su supervivencia posterior y se conoce que la raza de la donadora como de la receptora no tienen efectos significativos. Esto concuerda con los hallazgos obtenidos en el presente trabajo.^{108,118} Sin embargo no hay que olvidar que las transferencias practicadas por Moor y Lawson fueron realizadas en un momento más avanzado de la gestación inicial con respecto a las hechas en el presente trabajo. Figura 7

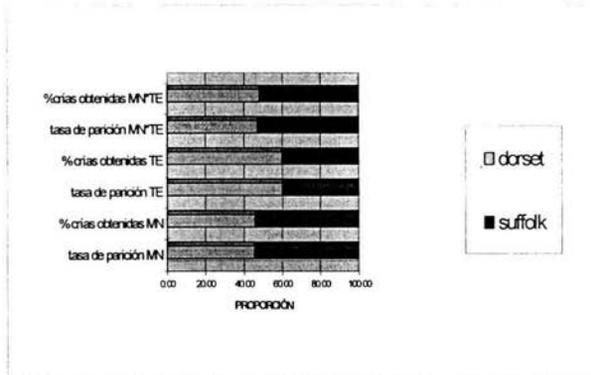
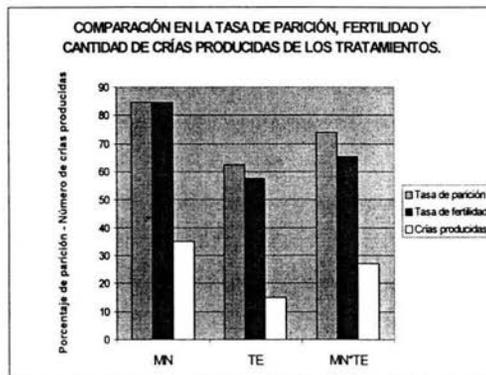


Figura 7. Efecto de la raza de la receptora en los parámetros reproductivos en los tres tratamientos.

En cuanto a los restantes dos grupos, el tratamiento 2 (TE1 o transferencia de un embrión) se obtuvo un porcentaje similar a aquel obtenido por Moore y colaboradores con la transferencia de 1 embrión (63% vs 62.5%),¹³ mientras que el porcentaje de fertilidad del empadre con servicio fértil en ovejas sincronizadas con CIDR y PMSG superan los resultados de Crosby & colaboradores, Rhodes & Nathawielsz y Ainsworth & Downey (67%, 57.7% y 69% respectivamente, vs 84% de fertilidad).^{36,115} A su vez la prolificidad difirió de la obtenida por Crosby y colaboradores (1.9 y vs 1.59 de prolificidad a primer servicio).³⁶ Figura 8

Figura 8. Resultados comparativos de la tasa de parición, tasa de fertilidad y cantidad de crías obtenidas entre los grupos experimentales.



Las diferencias encontradas en el presente trabajo no fueron estadísticamente significativas, pero es difícil pasar por alto las notables diferencias numéricas tanto en la supervivencia embrionaria en los grupos que llevaron a cabo la transferencia de embriones como la tasa de preñez total. Existen muchos factores no controlados que pudieron dar cabida a estas diferencias entre los grupos experimentales y que a continuación son discutidas. Entre los más notables se encuentran: 1) la inexistencia de un embrión previo resultado de la falla de fertilización de la receptora o por su pérdida precoz, imposibilitando el inicio de los cambios uterinos que permitieran un desarrollo más factible del embrión transferido, 2) la inconveniencia de colocar al embrión transferido en el cuerno contralateral al cuerpo lúteo en ausencia de este embrión, 3) la migración errática al cuerno contralateral de un posible mellizo nativo que produjera sobrepoblación y arriesgara la gestación del embrión transferido o de los nativos y 4) la proporción de mortalidad prenatal inevitable en la reproducción

Aún a la fecha, existe gran controversia en el número de embriones por transferir y el criterio del depósito del embrión con respecto al ovario que contiene el cuerpo lúteo para obtener el mayor éxito. Algunos autores^{3,5,19,79,102} indican que lo mejor es colocarlo en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo porque la progesterona tiene un efecto local y restringido a ese sitio. Otros cuantos, no encontraron diferencias importantes en el depósito ipsilateral o contralateral.^{49,101,103} Esto es entendible ya que la posición del embrión no afecta la concentración plasmática de progesterona ni el contenido de la misma en el cuerpo lúteo, lo que indica que el embrión no tiene un efecto unilateral en el mantenimiento de la función del cuerpo lúteo de la oveja normal.

La posición del cuerpo lúteo tiene también una relación significativa con el número de ellos y si la transferencia es unilateral o bilateral. Hay autores que reconocen un detrimento en la supervivencia del embrión si sólo existe un solo cuerpo lúteo.^{81,85} Mientras, Torr s y colaboradores encontraron que cuando se tenía un cuerpo lúteo único el 71.4% de las receptoras de 2 embriones produjeron gemelos, mientras que cuando había 1 cuerpo lúteo en cada ovario la transferencia bilateral resultó en un 68% de producción de gemelos y cuando un mismo ovario albergaba a 2 cuerpos lúteos 44% de las ovejas produjeron parto doble. Con estos resultados concluyeron que la cantidad y posición del cuerpo lúteo no tenía un efecto determinante en la tasa de éxito.^{38,86,119} A pesar de esto, numerosos autores que trabajan con bovinos, ovinos y caprinos, han determinado que un número mayor de gestaciones sobreviven como resultado de una ovulación ocurrida en cada ovario en lugar de 2 ovulaciones por ovario. La explicación posible de estas diferencias es dirigida a la posibilidad de sobrepoblación uterina que obligue a la pérdida parcial o total de la gestación.

En lo referente al número de embriones, en la oveja se practica con más frecuencia la transferencia al cuerno uterino de 2 embriones, puesto que se not  una mayor proporción de ovejas que llevaban a término al producto en comparación de la transferencia de uno solo.¹³ No obstante otros investigadores han registrado mayores tasas de éxito con la transferencia de un solo embrión.^{56,74,81} Por otro lado, autores como Dziuck apuntan que el número de embriones transferidos tiene poco efecto en la supervivencia prenatal, pues no estimulan el crecimiento uterino más allá del día 18 y los embriones que han sobrevivido más allá del día 25 no son afectados por el espacio disponible, pero si en su tamaño al nacimiento.⁷³

Entonces la supervivencia dependerá de la distribución que los embriones adopten a lo largo del cuerno uterino.^{73,108} En ovejas y vacas se ha demostrado que cuando hay doble ovulación uno de los embriones migrará al cuerno contralateral. Si este fallara en hacerlo se crearía un estado de competencia por desarrollarse en el mismo cuerno y como resultado sería probable la mortalidad de uno o ambos.⁸¹ En la oveja la migración uterina ocurre entre los días 14-15, ya que ha ocurrido el reconocimiento de la gestación, y se sugiere que los embriones son particularmente más sensibles a la asincronía en esta etapa, mayormente debido a que el cuerno contralateral no ha sido expuesto hasta entonces a las secreciones trofoblásticas y sus propiedades inmunosupresoras. Otro hallazgo consecuente con esta teoría, es la observación de un alto índice de gemelaridad en el primer tercio de la gestación del bovino que posteriormente se pierde, lo que quiere decir que hay una alta incidencia de falla migratoria y que la razón primaria del fracaso en la producción de gemelos es el depósito unilateral de 2 embriones.^{19,79,85,105} Contrariamente, cuando se desea obtener mellizos por transferencia embrionaria, la tasa de supervivencia ha sido mayor cuando se hacen transferencias de dos embriones de forma unilateral.^{3,70,102-103}

El valor de prolificidad de todos los grupos está dentro de los límites esperados para razas con prolificidad media (1.4 a 1.8) pero en el caso del valor de prolificidad racial, se esperaría que el de la raza Dorset (1.23) fuera ligeramente mayor al de Suffolk (1.46) Aún así, ambos valores se encuentran dentro de los rangos reportados en América del norte para estas razas: de 1.22 a 1.58 para Dorset y de 1.18 a 1.78 para Suffolk. La tasa ovulatoria en los grupos TE y MN*TE también coinciden a los reportados, obteniéndose 1.56 ± 0.50 para Dorset y 1.33 ± 0.56 para Suffolk comparado a 1.6 para Dorset y de 1.2 a 1.7 en Suffolk.

112,120

Los resultados de la supervivencia de los embriones transferidos en este trabajo pudieron ser afectados precisamente por el criterio del sitio de transferencia. Es decir, la superioridad de partos obtenidos a partir de la transferencia ipsilateral de un embrión en el grupo TE puede ser sobreestimada al compararse con la transferencia contralateral de un embrión en una receptora que posiblemente ya gestaba más de un embrión (grupo MN*TE). Figura 9

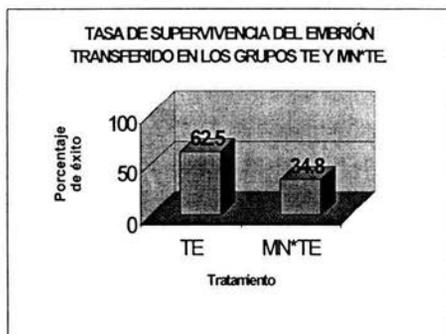


Figura 9. Tasa de supervivencia del embrión transferido en los grupos de transferencia de un embrión (TE) y el de monta natural previa a la transferencia de embriones (MN*TE). La supervivencia del embrión transferido a las ovejas que no recibieron monta previa fue casi del doble en comparación de aquella obtenida cuando las receptoras de embriones habían recibido el servicio fértil en su fase estral. Estas diferencias numéricas no alcanzaron relevancia estadística.

De manera congruente, la determinación del origen de las crías nacidas en el grupo MN*TE, marca la tendencia de la supervivencia del embrión nativo, que ya está adaptado al ambiente uterino por sobre el transferido. Figura 10

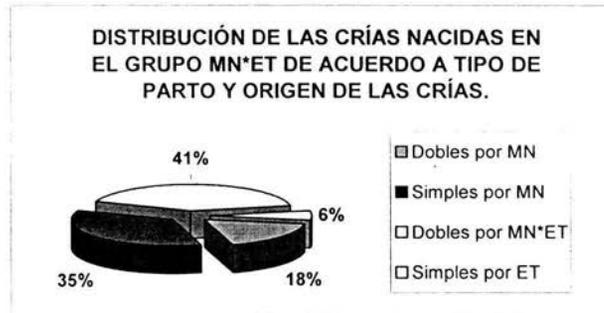


Figura 10. Distribución de las crías nacidas en el grupo MN*TE (monta natural previa a la transferencia de un embrión) de acuerdo al tipo de parto y origen de la cría. La mayor frecuencia corresponde a los partos dobles compuestos por una cría nativa (entiéndase como aquella emparentada genéticamente con la receptora) y una cría resultado de la transferencia de un embrión. Un porcentaje similar corresponde a las crías únicas resultado de la fertilización de la receptora. Con menor participación aparecen los partos dobles debidos a la monta natural y un parto simple resultado del desarrollo del embrión transferido, respectivamente.

La situación ideal con el uso del servicio fértil previo a la transferencia sería entonces, que la receptora gestara un embrión único que habitara el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo mientras que el embrión transferido de manera contralateral no provocara competencia sino una sinergia dentro del útero. Es entonces necesario determinar, no solo el momento de la pérdida embrionaria sino también, la medición de factores específicos producidos por la madre que refleje la cantidad de embriones que esta gestando en ese momento. De contar con herramientas de medición tan sensibles, se facilitaría la distinción de las causas que provocan la pérdida embrionaria y el cálculo de la extensión de la misma, bajo la distribución de embriones experimental dada.⁸⁶

Es importante señalar que en la práctica ovina, la preparación de todas las ovejas que tentativamente se sometieran a la transferencia de embriones después del servicio natural, tendría el mismo costo no importando si finalmente resultaran inapropiadas algunas de ellas. De tal suerte, que la efectividad de producir crías para cada uno de los tres procedimientos probados en este experimento sobre todas las ovejas sincronizadas fue de 84.6% para el grupo 1, 57.7% para el grupo 2 y de 65.4% para el grupo 3.

¿Pero como puede explicarse el grado de mortalidad precoz en condiciones cuidadas en que se aplican los conocimientos obtenidos a la fecha en cuanto a supervivencia embrionaria, como en el procedimiento de transferencia de embriones? Algunos autores han concluido que la participación del funcionamiento embrionario normal es determinante. De ese modo más del 50% de los embriones obtenidos de vacas superovuladas prosiguen un desarrollo anormal que los conduce a la muerte para el día 8, fecha para la que ya fueron transferidos.

También puede afirmarse que algunos embriones pueden sobrevivir inicialmente, pero después sufren degeneración al no ser capaces de adecuar su velocidad de desarrollo a la madre, contrarrestar a los efectos nocivos de la manipulación para su recolección y transferencia o que, durante la evaluación para ser transferidos ya mostraban signos de degeneración imperceptibles que interrumpieran su desarrollo posterior.

Otro factor muy importante es el ambiental, particularmente el estrés calórico pues se ha demostrado que en vacas expuestas a altas temperaturas entre los días 8 y 16 postestro, la secreción del complejo bTP-1 es afectado y 50% de los embriones reducen su desarrollo y mueren.^{15,17-18,34,70,121}

Cabe resaltar que la supervivencia embrionaria depende de modo directo de factores como la genética y constitución del embrión, la sincronía entre la madre portadora y el embrión, la edad y número de partos de la hembra, así como su salud reproductiva, exposición a patógenos, manejo nutricional-ambiental y el origen del embrión. Entiéndase por esto, si los embriones "nativos" se desarrollan en su ambiente original, si los embriones transferidos provienen de ovejas superovuladas o si son producto de maduración y/o fertilización *in vitro*. Todos estos factores repercuten en la tasa de desarrollo del embrión y si esta no es adecuada al ambiente materno, estará en riesgo su supervivencia prenatal y postnatal.^{19,70,73}

La relación que guardan los parámetros de fertilidad, prolificidad y número de corderos nacidos entre los grupos fue siempre descendente, siendo el grupo MN el más alto, MN*TE el intermedio y TE el más bajo. Esto refleja que se obtuvo el beneficio en el grupo MN*TE de obtener más crías (26 contra 15 crías) y más ovejas preñadas (73.9% de fertilidad contra 62.5%) en comparación con la transferencia simple de un embrión. En 1984, McKelvey y Robinson obtuvieron 16 gestaciones de 21 transferencias unilaterales de 2 embriones y produjeron 24 corderos.⁵ Si proyectamos estas cifras con los porcentajes obtenidos del grupo MN*TE del presente trabajo, de los 42 embriones disponibles, transferidos uno por cada receptora, 31 ovejas llevarían su gestación a término, 14.3 corderos provendrían de la donadora (34% de supervivencia) y 27 corderos de la receptora (proporción de crías nativas fue igual a 65.2) sumando un total de 59 corderos. Esto señala que es posible optimizar el uso de cada embrión al diseminarlo en un mayor número de receptoras (14 contra 24 corderos provenientes de transferencia de 1 y 2 embriones respectivamente) con la ventaja de obtener más corderos relacionados genéticamente con la madre.

Esto aporta un argumento que puede presentarse a los productores durante la adopción de esta tecnología, ofreciendo un panorama menos riesgoso basado en la preservación de la tendencia reproductiva del rebaño y evitar alargar el empadre por la necesidad de gestar a toda receptora que no logró establecer una gestación.

Sin embargo, el panorama más alentador de supervivencia de embriones de muy alto costo parece ser la transferencia de un embrión sin que la receptora reciba el servicio fértil previo, al menos en el presente estudio. Se ha registrado que la transferencia de un embrión único produce mayor número de preñeces (transferencia de un embrión 80% y 65% por métodos laparoscópico y quirúrgico respectivamente contra 27% y 56% usando 2 embriones por receptora).⁵⁶ No obstante, la mayoría de los reportes de transferencia de un embrión han obtenido porcentajes de éxito de 22 a 28% contra 60-80% con 2 embriones, sin olvidar que usando ésta última también pueden registrarse tasas de éxito muy bajas.¹³

Se concluye que la fertilidad en los grupos que usaron monta natural revela un buen estado reproductivo de los animales utilizados, ya que son los valores recomendados a alcanzar en cualquier rebaño, y que los resultados obtenidos del grupo de transferencia de un embrión indican una viabilidad aceptable en los embriones recolectados, un buen manejo de los embriones durante los procedimientos y de la sincronía que deben guardar con el ambiente materno. Por último, en el grupo que combinó la monta natural con la transferencia de embriones, se demostró que el manejo quirúrgico no tuvo efectos adversos importantes sobre el medio de los embriones nativos y que la fertilidad y prolificidad mantuvieron valores intermedios gracias a la previa fertilización de la receptora.

No obstante, la explicación referente a la moderada tasa de supervivencia de los embriones transferidos y como esta pudo ser afectada por la tasa ovulatoria natural de las receptoras es más difícil de elaborar debido a la ausencia de un método que estimara el número de embriones viables en el útero. Por ello, se requiere mayor estudio en este tema, que contemple mayor control en la distribución de los embriones a lo largo del tracto reproductor de la receptora.

VIII LITERATURA CITADA

- 1 Overström E.W. Manipulation of early embrionic development. Anim. Reprod. Sci. 1992; 28[1-4], 277-285.
- 2 Noriega S.R., Martínez B.S., Flores C.R. Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1995.
- 3 Ishwar A.K., Memon M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. Small Rumin. Res. 1996; 19[1], 35-43.
- 4 Austin C.R., Short R.V. El embrión. In: Austin C.R., Short R.V., editors. Desarrollo embrionario y fetal. Procesos de reproducción en los mamíferos. México, D.F.: La prensa médica mexicana, 1982: 1-39.
- 5 Wallace J.M. Artificial insemination and embryo transfer. In: Speedy A.W., editor. Progress in sheep and goat research. U.K.: CAB International, 1992: 1-24.
- 6 Wilmut I., Haley C.S., Wooliams J.A. Impact of biotechnology on animal breeding. Anim. Reprod. Sci. 2004; 28[1-4], 149-162.
- 7 Barrios D.R., Ramge J.C., Harms P.G., Blake R.W., Kraemer D.C. Evaluation of embryo collection and transfer as diagnostic tools for bovine infertility. Theriogenology. 1982; 17[1], 77.

- 8 Stringfellow R.A., Ridell K.P., Zurova C.O. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. *N.Z. Vet. J.* 1991; 39[1], 8-17.
- 9 Thibier M., Guerin B. Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. *Liv. Prod. Sci.* 2000; 62[3], 253-270.
- 10 Boundy T., Clarkson M.J., Winter A.C. Embryo transfer in sheep under practice conditions. *Vet. Rec.* 1985;117[15], 379-381.
- 11 Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology.* 1999; 51[1], 105-116.
- 12 Rainio V. Embryo production in Finnsheep. University of Kuopio. College of Veterinary Medicine, 1992.
- 13 Moore N.W., Shelton J.N. The application of the techniques of egg transfer to sheep breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 1962; 13[1], 718-724.
- 14 Smith C. Use of the embryo transfer in genetic improvement of sheep. *Anim. Prod.* 1986; 42[1], 81-88.
- 15 Thatcher W.M., Macmillan K.L., Hansen P.J., Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology.* 1989; 31[1], 149-164.
- 16 Roberts R.M., Schalue-Francis T., Francis H., Keisler D. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology* 1990; 33[1], 175-183.

- 17 Ashwort C.J. Synchrony embryo-uterus. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28[1-4], 259-267.
- 18 King W.A. Intrinsic embryonic factors that may affect survival after transfer. *Theriogenology.* 1985; 23[1], 161-174.
- 19 Pope W.F. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol. Reprod.* 1988; 39[5], 999-1003.
- 20 Moore N.W., Shelton J.N. Egg transfer in sheep: effect of degree of synchronization between donor and recipient, age of egg and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J. Reprod. Fert.* 1964; 7[2], 145-152.
- 21 Wilmut I., Sales D.I., Ashwort C.J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology.* 1985; 23[1], 107-119.
- 22 Thibier M., Nibart M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28[1-4], 139-148.
- 23 Lawson R.A.S., Adams C.E., Rowson L.E.A. The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *J. Reprod. Fert.* 1972; 29[1], 105-116.
- 24 Rowson L.E.A., Moor R.M. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and the recipient animal. *J. Reprod. Fert.* 1966; 11[2], 207-212.

- 25 Stewart H.J., Guesdon F.M.J., Payne J.H., Charleston B., Vallet J.L., Flint A.P.F. Trophoblast interferons in early pregnancy of domestic ruminants. *J. Reprod. Fert.* 1992; 45 suplemento, 59-68.
- 26 Betteridge K.J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology.* 1995; 44, 1061-1098.
- 27 McCracken J.A., Schramm W., Okulicz W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 1984; 7[1-3], 31-55.
- 28 Silvia W.J., Fitz T.A., Mayan M.H., Niswender G.D. Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 1984; 7[1-3], 57-74.
- 29 Thatcher W.M., Knickerbocker J., Bartol F.F., Bazer F.W., Roberts R.M., Drost M. Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: endocrine aspects. *Theriogenology.* 1985; 23[1], 129-143.
- 30 Wrathall A.E. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology.* 1995; 43[1], 81-88.
- 31 Coordinación General de Ganadería S. Estimación del consumo nacional aparente 1991-2001. ganadería SAGARPA.gob.mx . 26-2-0002. 17-12-0003.
- 32 Secretaría de Economía. Sistema de información arancelaria vía internet. economía-snci.gob.mx . 1-4-2002. 17-12-2003.

- 33 Alabart J.L., Folch J., Fernández-Arias A., Ramon J.P., Garbayo A., Cocero M.J. Screening of some variables influencing the results of embryo transfer in the ewe. I. Five-day-old embryos. *Theriogenology*. 1995; 44[7], 1011-1026.
- 34 Albihin A., Gustafsson H., Rodriguez- Martinez H. Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1991; 24[1-2], 25-35.
- 35 Mejía V.O. Infertilidad por asincronía materno-embionaria en ovejas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1999.
- 36 Crosby T.F., Boland M.P., Gordon I. Effect of progestagen treatments on the incidence of oestrus and pregnancy rates in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 1991; 24[1-2], 109-118.
- 37 Bindon B.M., piper L.R., Cahill L.P., Driancourt M.A., O'Shea T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*. 1986; 25[1], 53-70.
- 38 Torrés S., Cognie Y., Colas G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*. 1987; 27[2], 407-419.
- 39 Zavy M.T., Geisert R.D. Embryonic mortality in domestic species. U.S.A.: CRC press, 1994.
- 40 Crosby T.F. Superovulation in sheep: the effects of pFSH type and ewe breed. *Theriogenology*. 1993; 39[1], 205.

- 41 Ware C.B., Northey D.L., First N.L. Effect of administration of FSH at the beginning of the cycle on the subsequent response to superovulation treatment in heifers. *Theriogenology*. 1987; 27[1], 292.
- 42 Rexroad C.E., Powell A.M. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *J. Anim. Sci.* 1991; 69[1], 246-251.
- 43 D'Alessandro A., Martemucci G, Toleda F., Gambacorta M., Manchisi A. Superovulation and embryo production in ewes using in comercial p-FSH. *Small Rumin. Res.* 1996; 19[1], 255-261.
- 44 Bari F., Khalid M., Wolf B., Haresign W., Murray A., Merrel B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*. 2001; 56[1], 147-155.
- 45 Buckrell B.C., Gartley C.J., Mehren K.G. Goodrowe K.L. Superovulation in Dall's sheep (*Ovis dalli dalli*). *Theriogenology*. 1990; 33[1], 201.
- 46 Hoffman K.A., Waller S.L., Youngs C.R. Once daily versus twice daily treatments with FSH in ewes synchronized with different doses of Norgestomet. *Theriogenology*. 1988; 29[1], 261.
- 47 Donaldson L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology*. 1989; 31[1], 183.
- 48 Shelton J.N., Moore N.W. Survival of fertilized eggs transferred to ewes after progesterone treatment. *J. Reprod. Fert.* 1966; 11[1], 149-151.

- 49 Niswender G.D., Dziuk P.J., Graber J., Kaltenbach C.C. Function of the corpus luteum in the ewe following relocation of the uterus or embryo. *J. Anim. Sci.* 1970; 30[6], 935-940.
- 50 Shea B.F. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology.* 1981; 15[1], 31-56.
- 51 Wright J.M. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology.* 1981; 15[1], 143-156.
- 52 Baril G., Brebion P., Chesné P. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Roma, Italia.: F.A.O.,O.N.U., I.N.R.A., 1995.
- 53 Lee J.H. Effect of embryo and recipient condition on pregnancy rate following bovine embryo transfer in southern Korea. *Theriogenology.* 1988; 29[1], 268.
- 54 Buckrell B.C., Gartley C.J., Johnson W.H. Results of a commercial sheep embryo transfer program. *Theriogenology.* 1989; 31[1], 178.
- 55 Tervit H.R.,Thompson J.G., McMillan W.H., Amyes N.C. Repeated surgical embryo recovery from texel donor ewes. *Theriogenology.* 1991; 35[1], 282.
- 56 Stefani J.S., Palha M.D.C., Christmann L., Rosa J.M., Silveira M.C., Rodrigues J.L. Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. *Theriogenology.* 1990; 33[1], 330.
- 57 Kraemer D.C. Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology.* 1989; 31[1], 141-148.

- 58 Moor R.M., Rowson L.E.A. The corpus luteum of the sheep: effect of the removal of embryos on luteal function. *J. Endoc.* 1966; 34[3], 497-502.
- 59 Cumming I.A. Synchronization of ovulation. In: Tomes G.J., Robertson D.E., Lightfoot R.J., editors. *Sheep breeding*. UK: Butterworths, 1979: 403-421.
- 60 Jainudeen M.R, Wahid H., Hafez E.S.E. Ovejas y cabras. In: Hafez E.S.E., Hafez B., editors. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México, D.F.: McGraw Hill-Interamericana, 2000: 177-187.
- 61 Evans G., Maxwell W.M.C. Fisiología de la reproducción en ovejas y cabras. Salamon Steven *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza, España.: Acribia. Butterworth., 1990: 41-57.
- 62 Hafez E.S.E., Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7a ed. México, D.F.: McGraw-Hill-Interamericana, 2000.
- 63 Baird D.T. Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 1978; 18, 359-364.
- 64 Geisert R.D., Short E.C., Zavy M.T. Maternal recognition of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28[1-4], 287-298.
- 65 Sheldrick E.L., Flint A.P.F. Ovarian oxytocin and luteal function in the early pregnant sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 1984; 7[1-3], 101-113.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- 66 Silvia W.J., Lewis G.S., McCracken J.A., Thatcher W.M., Wilson L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 1991; 45[5], 655-663.
- 67 Ottobre J.S., Vincent D.L., Silvia W.J., Inskoop E.K. Aspects of regulation of uterine secretion of prostaglandins during the oestrous cycle and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 1984; 7[1-3], 75-100.
- 68 Geisert R.D., Short E.C., Morgan G.L. Establishment of pregnancy in domestic farm species. In: Zavy M.T., Geisert R.D., editors. *Embryonic mortality in domestic species*. Boca Ratón U.S.A.: CRC press, 1994: 23-51.
- 69 Ford S.P. Maternal recognition of pregnancy in the ewe, cow and sow: vascular and immunological aspects. *Theriogenology*. 1985; 23[1], 145-159.
- 70 Zavy M.T. Embryonic mortality in cattle. In: Zavy M.T., Geisert R.D., editors. *Embryonic mortality in domestic species*. Boca Raton U.S.A.: CRC press, 1994: 99-140.
- 71 Gandolfi F., Brevini T.A.L., Modena S., Passoni L. Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28[1-4], 269-276.
- 72 Roberts R.M., Bazer F.W. The function of uterine secretions. *J. Reprod. Fert.* 1988; 82, 875-892.
- 73 Dziuk P.J. Embryonic development and fetal growth. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28[1-4], 299-308.

- 74 Sinclair K.D., Dunne L.D., Maxfield E.K., Maltin C.A., Young L.E., Wilmut I. et al. Fetal growth and development following temporary exposure of day 3 ovine embryos to an advanced uterine environment. *Reprod. Fert. Dev.* 1998; 10, 263-269.
- 75 Crosby I.M., Gandolfi F., Moor R.M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. and Fert.* 1988; 82, 769-775.
- 76 Roberts R.M. Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 1989; 40[3], 449-452.
- 77 Ashwort C.J., Bazer F.W. Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer of administration of progesterone. *Biol. Reprod.* 1989; 40[3], 425-433.
- 78 Driancourt M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 1991; 35[1], 55-79.
- 79 Rowson L.E.A., Lawson R.A.S., Moor R.M. Twinning in cattle. *Vet. Rec.* 1969; 88[21], 583-584.
- 80 Bak A., Greve T., Schmidt M. Effect of superovulation on reproduction. *Theriogenology.* 1989; 31[1], 169.
- 81 Nancarrow C.D. Embryonic mortality in the ewe and doe. In: Zavy M.T., Geisert R.D., editors. *Embryonic mortality in domestic species.* Boca Raton U.S.A.: CRC press, 1994: 79-97.

- 82 Moore N.W., Rowson L.E.A. Egg transfer in sheep: factors affecting the survival and development of transferred eggs. *J. Reprod. Fert.* 1960; 1[4], 332-349.
- 83 Echternkamp S.E. Fetal development in cows with multiple fetuses. *Theriogenology.* 1987; 27[1], 227.
- 84 Hunter R.H.F. Causes for failure of fertilization in domestic species. In: Zavy M.T., Geisert R.D., editors. *Embryonic mortality in domestic species.* Boca Ratón, U.S.A.: CRC press, 1994: 1-22.
- 85 Tomes G.J., Robertson D.E., Lightfoot R.J. *Sheep breeding.* 2a ed. Londres, U.K.: Butterwoths, 1979.
- 86 Lindsay D.R., Pearce. *Reproduction in sheep.* Australia: Press syndicate of the University of Cambridge., 1984.
- 87 Bretzlaff K.N., Romano J.E. Advanced reproductive techniques in goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* 2001; 17(2):421-433.
- 88 Maurer R.R., Echternkamp S.E. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology.* 1982; 17[1], 11-22.
- 89 Broadbent P.J., Stewart M., Dolman D.F. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology.* 1991; 35[1], 125-139.

- 90 Walker S.K., Smith D.H., Frensham A., Ashman R.J., Seamark R.F. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology*. 1989; 31[4], 741-752.
- 91 Payas A.J., Broadbent P.J., Dolman D.F., Christie W.B. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. *Theriogenology*. 1989; 31[1], 238.
- 92 Rodriguez A.M.C.M. Uso de la transferencia de embriones e inseminación artificial en la inducción de gestaciones gemelares en ganado encastado de cebú. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1986.
- 93 Haresign W. Manipulation of reproduction in sheep. *J. Reprod. Fert.* 1992; 45 suplemento, 127-139.
- 94 Lawson R.A.S., Rowson L.E.A. The influence of breed of ewes and offspring on litter size after egg transfer in sheep. *J. Reprod. Fert.* 1972; 28, 433-439.
- 95 Hawk H.W., Cooper B.S., Pursel V.G. Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestagen. *J. Anim. Sci.* 1981; 52[3], 601-610.
- 96 Hawk H.W., Cooper B.S., Conley H.H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology*. 1987; 28[2], 139-153.

- 97 McKelvey W.A.C., Robinson J.J. Normal lambs born following transfer of embryos by laparoscopy. *Vet. Rec.* 1984; 115[9], 230.
- 98 Rowson L.E.A., Lawson R.A.S., Moor R.M., Baker A.A. Egg transfer in the cow: sincronization requirements. *J. Reprod. Fert.* 1972; 28, 427-431.
- 99 Bradford G.E., Taylor StC.S., Quirke J.F., Hart R. An egg transfer study of litter size, birth weight and lamb survival. *Anim. Prod.* 1974; 18[3], 249-263.
- 100 Cady R.A., Van Vleck L.D. Factors affecting twinning and effects of twinning in holstein dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 1978; 46[4], 950-956.
- 101 Diskin M.B., McDonagh T, Sreenan J.M. The experimental induction of twin calving in beef cows by embryo transfer. *Theriogenology.* 1987; 27[1], 224.
- 102 Sreenan J.M., Beehan D., Mulhevell P. Egg transfer in the cow: factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. *J. Reprod. Fert.* 1975; 44, 77-85.
- 103 Suzuki T., Ishida T., Sakai Y., Shimohira I. Induction of twinning in dairy heifers by ipsilateral or bilateral transfer of two frozen embryos. *Theriogenology.* 1989; 31[1], 261.
- 104 Kleemann D.O., Walker S.K., Waikley J.R.W., Smith D.H., Grimson R.J., Stone B.A. et al. Uterine presensitization and embryo survival and growth in booroola merino x south australian merino ewes. *Theriogenology.* 1989; 31[6], 1183-1190.

- 105 Moor R.M., Lawson R.A.S. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *J. Endoc.* 1966; 34[2], 233-239.
- 106 Anderson G.B., Cupps P.T., Drost M. Induction of twins in cattle with bilateral and unilateral embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 1979; 49[4], 1037-1042.
- 107 Kitts D.D., Anderson G.B., Stabenfeldt G.H., Cupps P.T., Bondurant R. A preliminary report on the initiation of parturition of ewes carrying fetuses of two different breeds. *Theriogenology.* 1982; 17[1], 93.
- 108 Anderson G.B., Bondurant R., Cupps P.T. Induction of twins in different breeds of cattle. *J. Anim. Sci.* 1982; 54[3], 485-490.
- 109 Gómez R.J.C. BOLETÍN CXLVII: Agroclimatología y espacio geográfico en el noreste del estado de Morelos. México: SOCIEDAD MEXICANA DE GEOGRAFÍA Y ESTADÍSTICA, 1991.
- 110 INEGI. Anuario estadístico. Morelos. edición 2001. México: INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA. GOBIERNO DEL ESTADO DE MORELOS., 2001.
- 111 Vidal Z.R. Algunas relaciones clima-cultivos en el estado de Morelos. México, D.F.: UNAM, 1982.
- 112 De Lucas T.J., Arbiza A.S.I. Razas de ovinos. México, D.F.: Editores mexicanos unidos, 1996.

- 113 Fahmy M.H. Prolific sheep. Cambridge, U.K.: CAB international, 1996.
- 114 Mejía V.O., Balcazar S.A., Luyando G.C., Valencia M.J., Rojas M.S., Saharrea M.A. et al. Implementación de la transferencia de embriones en pequeños rumiantes. *Vet. Méx.* 1995; 26[2], 340.
- 115 Rhodes L., Nathawielsz P.W. Comparison of a controlled internal drug release device containing progesterone with intravaginal medroxyprogesterone sponges for estrus synchronization in ewes. *Theriogenology.* 1988; 30[4], 831-836.
- 116 Nie N.H., Hull C.H. Statistical Package for the Social Sciences (computer program) versión 10.0 Illinois(U.S.A.) SPSS Inc., 1999
- 117 McKelvey W.A.C., Robinson J.J., Aitken R.P. A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Vet. Rec.* 1985; 117[19], 492-494.
- 118 Transferencia de embriones en ganado ovino, factores que afectan los resultados. In: S.A.G.A.R., U.N.A.M.-F.M.V.Z., editors. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México.* México,D.F.: S.A.G.A.R., 1985: 26.
- 119 Vincent C.K., Mills A.C. Gonadotropin levels for multiple births in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1972; 34[1], 77-81.
- 120 Young L.D., Fahmy M.H., Torres-Hernández G. Use of prolific sheep: North América. In: Fahmy M.H., editor. *Prolific sheep.* Cambridge, U.K.: CAB International, 1996: 289-349.
- 121 Hartwich K.M., Kleemann D.O., Seamark R.F., Walker S.K. Fetal development in the sheep following manipulation of the embryo or its environment. *Theriogenology.* 1997; 47[1], 322.