



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FERTILIDAD DE OVEJAS DOMÉSTICAS RECEPTORAS DE
EMBRIONES HÍBRIDOS DE CIMARRÓN O DOMÉSTICOS

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

RAFAEL ORTIZ LANDEROS

Asesor:

MVZ Vicente Octavio Mejía Villanueva



MÉXICO, D.F.

2011



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.

Este trabajo está dedicado con amor a mis padres: Rafael Ortiz Hernández y Josefina Landeros Velásquez ya que sin su esfuerzo, sacrificio y dedicación yo no estaría aquí. Gracias por su apoyo los amo.

A mis hermanos Eduardo y Virginia por ser parte de mi vida y estar a mi lado.

A mis amigos por estar conmigo a lo largo de toda la carrera y poder permitirme vivir y aprender experiencias con ellos, estar juntos en los buenos y malos momentos y ser parte de una enorme etapa en mi vida los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al doctor Octavio Mejía por haberme permitido estar con el todo este tiempo de la tesis, por su paciencia y enseñanza, dedicación y tiempo, por ser un buen amigo y mejor persona.

Al doctor Alberto Ríos porque si no hubiera sido por el no hubiera conocido el centro de tres marías, por su enseñanza y dedicación.

A todos los doctores, trabajadores y servicios sociales del CEIEPO por las facilidades y ayuda brindadas a lo largo de la tesis

A mis sinodales por su ayuda y tiempo al ser parte de este trabajo y con ello poder titularme

Gracias a todos ellos y a la FMVZ por permitirme ser parte de ella.

CONTENIDO.

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y METODOS.....	36
RESULTADOS.....	41
DISCUSIÓN.....	42
REFERENCIAS.....	47
CUADROS	50

I. RESUMEN.

ORTIZ LANDEROS RAFAEL. Fertilidad de ovejas domésticas receptoras de embriones híbridos de cimarrón o domésticos (bajo la asesoría de MVZ. Vicente Octavio Mejía Villanueva).

Las gestaciones inter-especies y la producción de hembras híbridas receptoras de embriones, pueden contemplarse para la conservación del borrego cimarrón en México. Sin embargo, la producción de los híbridos presenta dificultades, como el que la fertilidad en las ovejas domésticas inseminadas con cimarrón es significativamente menor. Mediante la evaluación y transferencia de embriones, es posible identificar si los embriones híbridos de cimarrón presentan anomalías morfológicas, o si independientemente de éstas, la fertilidad en las receptoras de embriones híbridos sigue siendo menor. Para ello, se evaluó el grado de desarrollo y la calidad de los embriones híbridos o domésticos y la fertilidad de las ovejas a las cuales fueron transferidos. El número de cuerpos lúteos normales fue similar ($P>0.05$) entre las donadoras inseminadas con borrego doméstico ($n=5$, 11.00 ± 3.39) o cimarrón ($n=5$, 10.00 ± 2.83). En las donadoras inseminadas con doméstico se recolectaron un mayor número ($P<0.05$) de embriones transferibles (8.40 ± 2.29), en comparación con las inseminadas con cimarrón (4.40 ± 1.34). La fertilidad en las receptoras de embriones domésticos (90.90%, 10/11) fue mayor ($P<0.05$) a la de las receptoras de embriones híbridos (36.36%, 4/11). La obtención de un menor número de embriones transferibles en las ovejas

domésticas inseminadas con cimarrón, indica que el grado de desarrollo y la calidad embrionaria dependen del semen empleado (doméstico o cimarrón). La menor fertilidad de las receptoras de embriones híbridos, sugiere que a pesar de haberse transferido únicamente embriones con un aparente adecuado desarrollo y calidad, existe una posterior mortalidad embrionaria, debida posiblemente a la incapacidad de los embriones para ser reconocidos por el útero.

II. INTRODUCCIÓN.

La transferencia de embriones es una técnica de reproducción asistida basada en la recolección de los embriones de una hembra donadora y su transferencia a las hembras receptoras, en las cuales se establece y desarrolla la gestación (Flores-Foxworth *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995). Cuando estas gestaciones se producen entre animales del mismo género y la misma especie o subespecie, se les denomina gestaciones intra-especies (Santiago *et al*, 2001).

La aplicación de esta técnica en nuestro país, a través del comercio internacional de embriones congelados, ha permitido la introducción de nuevas razas de pequeños rumiantes, como los borregos dorper, ile de France o charollais, especializados en la producción de carne, o de los east friesland, productores de leche. Mientras que para los caprinos, la raza boer se introdujo gracias a la importación de embriones de Nueva Zelanda (Mejía, 2009).

En animales silvestres, la transferencia de embriones se ha contemplado como una herramienta para la conservación *ex situ*, por lo que se han transferido embriones de especies amenazadas o en peligro de extinción a receptoras domésticas, dando lugar a gestaciones inter-especies. Ejemplos serían la transferencia de embriones de cebras (*Equus burchelli*) y caballos przewalskii (*Equus przewalskii*) a yeguas (*Equus caballus*) o burras domésticas (*Equus assinus*), o la transferencia de embriones de bovinos silvestres gaur (*Bos gaurus*) a vacas domésticas (*Bos taurus*) (Bennett and Foster, 1985; Pope *et al*, 1988).

Sin embargo, en el caso de algunas especies silvestres, el contar con las receptoras adecuadas no ha sido tan sencillo, ya que la transferencia de sus

embriones a especies domésticas origina muertes embrionarias y fetales. Ejemplo de ello son las transferencias de embriones de cabras silvestres (*Capra pyrenaica hispanica*) a cabras domésticas (*Capra hircus*) (Fernández Arias *et al*, 1999, 2001), de borregos dall (*Ovis dalli dalli*) a borregas domésticas (*Ovis aries*) (Buckrell *et al*, 1990), así como de borregos cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) a ovejas receptoras domésticas (Mejía *et al*, 2008).

Dado que entre algunas especies es posible la generación de gestaciones inter-especies y la producción de crías híbridas fértiles, éstas se han contemplado como una opción para la multiplicación de especies amenazadas, en peligro de extinción o extintas. Así, en el caso de la cabra silvestre española (*Capra pyrenaica hispanica*), sus embriones producidos *in vivo* o mediante clonación fueron exitosamente transferidos a receptoras híbridas (*Capra pyrenaica x Capra hircus*) (Fernández Arias *et al*, 1999, 2001; Folch *et al*, 2008).

Para la conservación del borrego cimarrón en México, también se ha evaluado la producción de crías hembras híbridas (*Ovis canadensis x Ovis aries*) como receptoras de embriones cimarrón (Mejía *et al*, 2008). Sin embargo, la producción de dichas hembras híbridas enfrenta algunas dificultades, ya que la fertilidad en las ovejas domésticas inseminadas con semen de borrego cimarrón es significativamente menor, en comparación con la de las ovejas domésticas que son inseminadas con semen de borrego doméstico, sin que haya podido determinarse la causa (Palma *et al*, 2007; Calderón *et al*, 2008).

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea que mediante la evaluación del grado de desarrollo y la calidad de embriones híbridos de cimarrón, es posible identificar si dichos embriones presentan anomalías morfológicas; o si

independientemente de éstas, al ser transferidos, la fertilidad en las receptoras sigue siendo menor.

A) CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LAS OVINOS DOMÉSTICOS Y CIMARRÓN.

Ovino Doméstico.

Pubertad.

La pubertad puede definirse como el momento en el que los ovarios en las hembras y los testículos en los machos, son capaces de liberar óvulos y espermatozoides respectivamente, en las borregas; se asocia a la presentación de conducta de estro o receptividad sexual y de ovulación, mientras que en los borregos se inicia y mantiene, la producción y liberación de espermatozoides a través de frecuentes eyaculaciones. Es importante diferenciar la pubertad de la madurez sexual ya que la segunda se alcanza en el momento en que los animales pueden reproducirse, sin que su crecimiento y desarrollo corporal se vea afectado. La pubertad está determinada por diferentes factores, entre los que se encuentran factores genéticos, nutricionales, ambientales y en el caso de los ovinos al tener una reproducción estacional, por la época de nacimiento, ya que las corderas que nacen al principio de la estación de partos tienden a llegar a la pubertad a los cinco meses de edad, y también alcanzan la madurez sexual a edad más temprana que corderas que nacen al final de la estación. Así, las corderas que nacen al final de la estación de partos llegarán a la pubertad y mostrarán ciclos estrales durante la estación reproductiva del siguiente año, cuando tienen 12 a 16 meses de edad (McDonald, 1993; Jainudeen *et al*, 2003).

CICLO ESTRAL.

La oveja doméstica es poliéstrica estacional con intervalos inter-estrales de 16 a 17 días en promedio, durante la estación reproductiva, pero su duración tiende a incrementarse hacia el final de la estación reproductiva. La mayor parte de los ciclos estrales en el hemisferio norte ocurren durante el otoño y al principio del invierno, de septiembre a enero. En ausencia de apareamientos fértiles, las ovejas ciclan 6 a 9 veces durante la estación reproductiva; en climas templados la estación reproductiva es más larga y las ovejas tienden a acercarse a un patrón no estacional (Mc Donald, 1993; Pineda, 1993).

La mayor parte del ciclo estral de la oveja está ocupado por la fase lútea. La fase lútea que incluye al metaestro y el diestro, dura de doce a catorce días. Mientras que la fase folicular incluye al proestro y al estro; el proestro es corto, de dos a tres días y no es una fase del ciclo que se distinga con facilidad. El estro dura en promedio 26 horas, con un rango de 20 a 36 horas, la ovulación es espontánea y ocurre hacia el final del estro. Las ovulaciones dobles y triples son comunes en la oveja, en particular en aquellas razas seleccionadas para obtener mellizos (Mc Donald, 1993).

Proestro. Dura de dos a tres días y se caracteriza por el crecimiento folicular rápido y segregación de estrógenos, bajo la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH). Progresivamente los niveles de estradiol que aumentan en la sangre durante el proceso, se asocian con cambios en los órganos reproductores. La oveja no muestra signos evidentes pero a medida que se acerca la siguiente etapa (el estro) la vulva se distiende, el vestíbulo se vuelve hiperémico

y las glándulas del cérvix y de la vagina secretan una sustancia sérica que se presenta como una descarga vaginal (McDonald, 1993; Pineda, 1993; Jainudeen *et al*, 2003).

Estro. Está basado únicamente en cambios de comportamiento, las ovejas pueden buscar al carnero pero tienden a ser pasivas. Además de la distensión vulvar y una descarga visible de moco cervical de la vulva, la aceptación de la hembra al apareamiento es la conducta más fácilmente notorio en el estro. Su duración puede ser afectada por la edad de la oveja y por la presencia del macho. La ovulación es espontánea y ocurre hacia el final del estro, la exposición continua visual y olfatoria o el apareamiento con machos acelera la ovulación, al facilitar el pico ovulatorio de la gonadotropina LH (McDonald, 1993; Pineda, 1993; Jainudeen *et al*, 2003; Pineda, 1993).

Metaestro. Es el periodo o etapa de formación del cuerpo lúteo, el cual se forma rápidamente en la oveja, ya que los niveles sanguíneos de progesterona son detectables dos días después de la ovulación (McDonald, 1993; Pineda, 1993; Jainudeen *et al*, 2003).

Diestro. La fase de un cuerpo lúteo funcional dura de 10 a 12 días y es la fase dominante del ciclo. Deben de estar presentes embriones viables en el útero para proveer señales luteotrópicas, no más tarde del día 13 en el diestro. Si no se encuentran embriones viables el cuerpo lúteo regresa rápidamente, bajo la influencia de la PGF₂alfa con lo que la oveja inicia un nuevo ciclo estral; proceso que se repite durante ciclos estrales subsecuentes hasta el final de la estación reproductiva, si la hembra no queda preñada.

Después de la pubertad, el carnero produce espermatozoides y es capaz de lograr apareamientos fértiles a lo largo del año. Los carneros tienden a mostrar estacionalidad en su libido, así como en su espermatogénesis y la calidad de eyaculados. Los carneros son sexualmente más activos y producen mejores eyaculados durante el otoño, pero su libido disminuye notoriamente hacia el final del invierno, la primavera y el verano (McDonald, 1993; Pineda, 1993; Jainudeen *et al*, 2003).

Gestación.

El tiempo normal de la gestación es de 150 días en promedio, pero varía en raza e individuo. Las razas de maduración temprana y las muy prolíficas tienen periodos de gestación más cortos que las productoras de lana, de maduración lenta.

La herencia tiene un efecto importante en la duración del periodo gestacional. El genotipo del feto es la causa de casi dos tercios de la variación en la duración de la gestación de la oveja. El tiempo de gestación también aumenta con la edad de la madre.

El cuerpo lúteo de la preñez persiste toda la gestación, la oveja es una especie dependiente de la placenta, durante el primer trimestre depende del cuerpo lúteo. Después, la placenta pasa a ser la fuente principal de progesterona en la oveja. (Jainudeen *et al*, 2000).

Parto.

El feto desempeña la clave en el inicio del parto, estos se presentan a cualquier hora del día. El comportamiento de la oveja depende en gran medida de la facilidad del parto, pero generalmente la inquietud inicial es interrumpida por periodos en los cuales las hembras se hechan por el dolor abdominal. La duración del nacimiento es variable, en particular en caso de un producto único demasiado grande, de gemelos impactados en el canal de parto o de presentación anormal. En tanto no se rebasen los límites de calificación de la condición corporal de 2.5 a 3.5, no se verán afectados la concentración de IgG en el calostro, el peso total del cordero nacido, la mortalidad del cordero o el peso total del cordero al destete.

Los partos gemelares suelen ser más rápidos que los de parto único, pero el intervalo entre el nacimiento de los gemelos varía de unos minutos, una hora o más.

El lamido vigoroso (acicalamiento) y la ingestión de las membranas fetales adheridas al neonato comienzan una vez que este ha nacido, al parecer los líquidos fetales tienen una función decisiva en la atracción de la oveja hacia el cordero.

Las ovejas que aun no han parido son atraídas hacia los líquidos y los neonatos de otras ovejas, que propicia el robo de corderos. La mayor parte de los corderos logran pararse en el transcurso de los 15 minutos que siguen al nacimiento y en 1 ó 2 horas la mayor parte de las ovejas habrán permitido que la cría se acerque a la ubre.

El periodo crítico de vinculación de la oveja al cordero es breve; si este es retirado al nacer, la madre lo rechazará cuando le sea presentado 6 a 12 horas más tarde. Algunas ovejas primaras muestran poco interés por su cordero y los abandonan.

La oveja es un ejemplo clásico de especie seguidora, esto es que los cordero tienden a seguir y buscar a su madre desde que nacen. (Jainudeen *et al*, 2000).

Puerperio.

Los cambios que ocurren en el aparato reproductor durante el puerperio incluyen involución uterina, y reinicio de la actividad ovárica. En la oveja, la involución uterina se completa hacia el día 27 y precede al primer estro posparto. (Jainudeen *et al*, 2000).

Lactación.

Después del parto se inicia en la oveja la lactación, periodo fisiológico de relevancia especial debido a que de la producción de leche depende principalmente el crecimiento de la cría.

En las explotaciones de ovino de carne la duración de lactación es muy variable según el sistema de explotación aunque en nuestro país se tiende a realizar destetes precoces con objeto de incrementar el ritmo reproductivo de la oveja. Así, en nuestro medio es frecuente que el amamantamiento de los corderos no dure más de 45- 60 días. (Daza Argimiro,1997).

En las explotaciones de producciones de leche la cría del cordero bajo la madre tiene lugar, generalmente, durante el primer mes de lactación. A la fase de cría le sigue un periodo de ordeño de duración variable del cual derivan los principales ingresos en las explotaciones orientadas fundamentalmente hacia la producción de leche.

Cimarrón.

Características Reproductivas del Borrego Cimarrón

En el borrego cimarrón no se conoce la edad exacta de la madurez sexual. En machos jóvenes que tienen edad de entre 6 y 17 meses se ha reportado que son fértiles. Estudios de natalidad y mortalidad en varias hembras cimarrón sugieren que las hembras con un mínimo de 18 meses y más comúnmente de 21 meses de edad son capaces de mantener una gestación. Aunque es común observar apareamientos de machos maduros con hembras menores de 18 meses, dichas observaciones sugieren que hembras menores a esta edad poseen suficientes hormonas para manifestar un comportamiento reproductivo de estro, pero el nivel hormonal es insuficiente para iniciar la ovulación o mantener una gestación (Monson y Summer, 1990).

El ciclo estral en la borrega cimarrón es de alrededor de 28 días, y el comportamiento receptivo que es característico del estro tiene una duración aproximada 48 horas. Sin embargo, se desconocen las características y la duración de las otras fases del ciclo estral (proestro, metaestro diestro). Durante el periodo de anestro la hembra es generalmente ignorada por el macho. El periodo de la gestación es de aproximadamente 179 ± 6 días (Monson y Summer, 1990; Delgadillo *et al.*, 2003; Turner y Hansen, 1980; Shackleton *et al.*, 1984). Las borregas Cimarrón paren principalmente una sola cría, los partos gemelares son objeto de muchas conjeturas. Se ha observado en vida libre dos corderos que son criados por una misma hembra, pero no existe literatura que ofrezca datos que confirmen dicha versión. Naturalmente los partos gemelares pueden ocurrir en

vida libre pero este es un fenómeno muy raro en el borrego Cimarrón (Monson y Summer, 1990; Shoenecker, 2004).

En un estudio realizado en México con un grupo de borregos Cimarrón alojados en el Zoológico de Chapultepec (Soto *et al*, 2007) se determinó que la época reproductiva inició a fines de junio y terminó a principios de febrero, con alrededor de 8 meses de duración, superior a la reportada para los borregos Cimarrón en vida libre (Monson and Sumner, 1980). El ciclo estral, determinado mediante la observación de montas no fértiles en cuatro borregas, tuvo una duración de 29 ± 5 días, similar a lo reportado para hembras Cimarrón (28 días) (Monson and Sumner, 1980), mientras que el estro conductual se correlacionó positivamente ($P < 0.001$) con los niveles máximos de la hormona estradiol (E2) (Caratay and Skinner, 1999). La gestación fue monitoreada en 2 hembras por 25 semanas y presentó una duración de 175 ± 1.4 días), parecida a la reportada para borregas Cimarrón (179 ± 6 días) en vida libre o cautiverio (Monson and Sumner, 1980; Schoenecker et al., 2004). Finalmente, la época de anestro, cuya duración se estimó en 4 meses, fue menor a la que normalmente presentan los borregos Cimarrón en vida libre (Monson and Sumner, 1980).

Híbridos de Cimarrón.

Obtención y algunas características reproductivas de los híbridos.

La hibridación del borrego cimarrón con las ovejas domésticas no es un hecho novedoso, puesto que se cuenta con reportes que la mencionan como un evento aislado ocurrido cuando borregos cimarrón han entrado en contacto con rebaños de ovejas domésticas. Así, entre 1919 y 1960 se tiene el reporte de alrededor de cuarenta híbridos producidos de manera no intencionada. Se conoce también de una hibridación realizada experimentalmente entre una oveja doméstica y un macho cimarrón que produjo dos hembras, las cuales a su vez tuvieron crías al ser cruzadas con el mismo macho (Young and Manville, 1960; Bunch and Workman, 1988). De la misma manera, se tienen reportes de hibridaciones entre borregos cimarrón y borregos muflón, así como entre borregos dall y borregos cimarrón (Monson and Post, 1972; Hobbes and Nowlan, 1997).

Tanto en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO, FMVZ-UNAM), en el Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, como en el Centro Ecológico de Sonora se han producido híbridos entre borregos cimarrón y borregas domésticas o muflón. En algunas de las gestaciones de estos animales y en algunos animales híbridos, se ha llevado a cabo la medición de hormonas como la progesterona o la recolección y evaluación de semen, con la finalidad de evaluar su futura capacidad reproductiva. A continuación se detallan algunos de los estudios realizados:

a) De doce ovejas domésticas inseminadas con semen de cimarrón, cinco fueron diagnosticadas como gestantes (41.6%) al día 30 posterior al estro. El promedio de la duración de la gestación, aunque mayor, fue estadísticamente similar al que presentan las ovejas domésticas, ya que a los 152.4 ± 1.34 días nacieron diez

corderos híbridos, cinco machos y cinco hembras. La administración de 300 UI de gonadotropina coriónica equina como parte del protocolo de sincronización del ciclo estral de las ovejas domésticas, originó una prolificidad de 2.4 ± 1.14 crías, puesto que de las cinco ovejas gestantes cuatro presentaron partos múltiples. El peso promedio de los híbridos al nacimiento fue de 1.62 ± 0.26 kg para las hembras, mientras que para los machos fue de 1.93 ± 0.83 kg. En la figura 1 se pueden apreciar los valores promedio de progesterona plasmática en las cinco ovejas domésticas gestantes de cimarrón, medidos una vez por semana a partir del primer mes de la gestación y hasta días antes de la ocurrencia del parto. Independientemente del número de crías, los valores promedio de progesterona plasmática alcanzaron durante el último tercio de la gestación los mayores niveles, incremento que se relaciona con el aporte placentario.

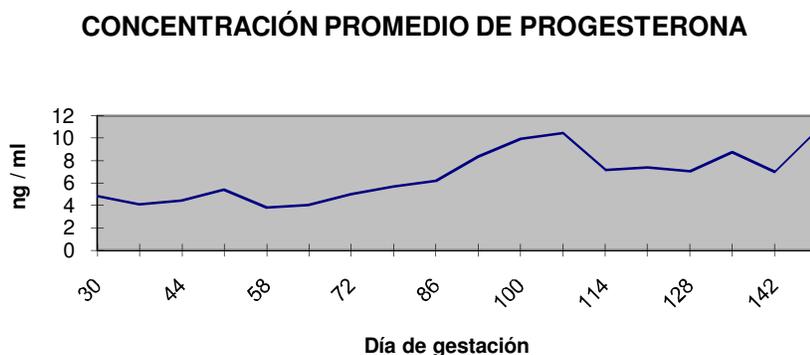


Figura 1. Concentraciones promedio de P4 (ng / ml) de las cinco ovejas gestantes.

Al considerarse el promedio de las concentraciones de progesterona de las cinco ovejas domésticas gestantes de cimarrón, éstas fueron de manera general similares a las concentraciones que presentan las ovejas domésticas gestantes de

borrego doméstico. Al ser evaluadas con una edad de alrededor de un año, las crías híbridas hembras presentaron ciclos estrales con una duración promedio de 17 días, similares a los de las ovejas domésticas. En la figura 2 se presentan los valores diarios promedio de progesterona plasmática del ciclo estral de cuatro hembras híbridas F1, medidos cada tercer día a partir del primer día posterior a la presentación del primer estro conductual y hasta la presentación del segundo estro conductual.

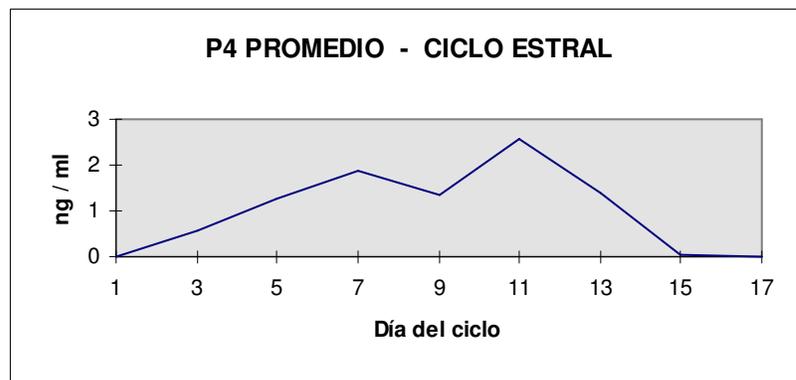


Figura 2. Concentraciones promedio de P4 (ng / ml) durante un ciclo estral en las híbridas.

Para evaluar la fertilidad de las hembras híbridas, una recibió monta dirigida con un macho híbrido y parió una cría hembra, mientras que otra de ellas quedó gestante después de haber sido inseminada con semen de uno de los machos cimarrón ubicado en el Centro Ecológico de Sonora, pariendo por consecuencia un híbrido de la segunda generación filial (F2= 3/4 Cimarrón: 1/4 Doméstico), después de 162 días de gestación (Mejía *et al*, 2000).

En cuanto a los machos híbridos, se obtuvieron crías viables de todos ellos al utilizarlos con monta dirigida para gestar hembras domésticas. Las características

morfológicas y de motilidad de sus espermatozoides son similares a las de los ovinos domésticos, presentando el eyaculado un volumen promedio de 1.4 ml y una concentración espermática de 3100×10^6 de espermatozoides, siendo factible también su congelación (Mejía *et al*, 2000).

b) Después de la evaluación de diferentes hormonas y protocolos de sincronización y superovulación en borregas cimarrón y domésticas, se han recolectado embriones de borregos cimarrón y han sido transferidos a ovejas domésticas y a hembras híbridas F1. En las borregas domésticas no ha logrado establecerse la gestación de los embriones cimarrón y en las híbridas F1 la gestación se pierde alrededor del día 156 de la gestación (Mejía *et al*, 2008).

B) GENERALIDADES DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES PARA LA REPRODUCCIÓN DE OVINOS DOMÉSTICOS.

La transferencia de embriones (TE) es una técnica de reproducción asistida basada en la recolección de los embriones de una hembra donadora y su trasplante a las hembras receptoras, en las cuales se establece y desarrolla la gestación (Flores-Foxworth *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995).

Cuando estas gestaciones por transferencia de embriones se producen entre animales del mismo género y la misma especie o subespecie, se les denomina gestaciones intraespecies o intraespecíficas (Santiago *et al*, 2001).

Para los caprinos, la raza boer se introdujo gracias a la importación de embriones de Nueva Zelanda. También se han obtenido embriones de razas que se tenían en México desde hace muchos años, como suffolk, dorset; o de razas caprinas como pelibuey, toggenburgh, nubio y alpino francés, de las cuales sus embriones son

generalmente transferidos en fresco, es decir, el mismo día en que son recolectados (Mejía, 2009).

La historia de la transferencia de embriones (TE) se remonta a 1891 cuando Heape realizó la primera transferencia de embriones en conejos. La comercialización de tecnología para la transferencia de embriones comenzó en América del Norte en los años setenta. Con dicha técnica, una hembra donadora puede aumentar el número de crías durante su vida al concebir de manera repetida, mediante la recuperación de embriones durante los primeros siete días de la gestación y la transferencia de éstos al útero de las hembras receptoras para completar la gestación. Este procedimiento depende por completo de la disponibilidad de una fuente de embriones de calidad adecuada, y del medio uterino propicio de la receptora al momento de la transferencia que se conoce como sincronía. Durante los últimos diez años la TE continua realizando avances importantes, sobre todo en la producción *in vitro* de embriones y en las técnicas de manejo embrionario (Jainudeen *et al*, 2003).

La primera transferencia de embriones en ovejas se remonta al año de 1934, después en 1955 se transfieren 19 embriones, de 2 a 16 células a 18 receptoras, estableciendo las bases de la transferencia de embriones de forma quirúrgica en pequeños rumiantes (Caracuel, 1998).

El avance en el desarrollo de técnicas de transferencia de embriones a una escala práctica comparable a la inseminación artificial ha sido lento, ya que existen varias limitaciones en la inducción de superovulación para la producción de embriones a gran escala, al tiempo que la técnica no quirúrgica para recolectar y transferir embriones no es sencilla. La criopreservación de embriones ha permitido el

comercio internacional de embriones principalmente de ganado bovino. En Australia, Argentina, Canadá, Nueva Zelanda, Estados Unidos y varios países europeos se han establecido empresas comerciales para la transferencia de embriones.

La técnica de transferencia de embriones comprende varios pasos:

- a) la superovulación de las donadoras.
- b) la sincronización de donadoras y receptoras.
- c) la inseminación artificial o monta dirigida de las donadoras.
- d) la recolección de embriones.
- e) la evaluación de los embriones recolectados.
- f) la transferencia de los embriones a las receptoras.
- g) el diagnóstico de gestación en las receptoras transferidas.

(Tribulo y Bo, 2006; Mejía, 2010).

El objetivo de la superovulación es producir un gran número de ovulaciones y obtener la mayor cantidad de embriones transferibles, pero hay factores que intervienen:

FACTORES RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO (TX) EN RELACIÓN CON EL CICLO ESTRAL	FACTORES INHERENTES AL ANIMAL Y A SU AMBIENTE.
---	--

Momento de iniciación del tx en relación con el ciclo estral	Factores relacionados con el tx en relación con el ciclo estral
Tipo de gonadotropina usada	Estado nutricional
Lote de la gonadotropina	Historia reproductiva

Relación FSH y LH de los preparados comerciales	Edad de la donadora
Duración del tx	Estación del año
Dosis total de la gonadotropina	Raza
Vía de administración	Causas genéticas o fisiológicas
Uso de hormonas adicionales	Repetición de tx superovulatorios

(Tribulo y Bo, 2006).

Entre las ventajas que las técnicas de superovulación y transferencia de embriones tienen en pequeños rumiantes podemos destacar: obtener mayor descendencia de hembras y machos seleccionados, es decir, que originan crías con un mejor desempeño productivo (mayores ganancias de peso, mejores conversiones alimenticias, mayor producción de carne o leche), favorecer la introducción de nuevas razas, conservar especies amenazadas o en peligro de extinción, disminuir el riesgo de introducción de enfermedades exóticas, minimizar el costo y el estrés del transporte o aumentar el número de partos múltiples por gestación. Como receptoras de embriones en el caso de los animales domésticos, se utiliza cualquier hembra clínicamente sana, y que se sepa haya parido y destetado a sus crías adecuadamente (Caracuel, 1998; Mejía, 2009).

PREPARACIÓN DE LAS DONADORAS Y RECEPTORAS.

La transferencia de embriones implica la correcta aplicación de varias técnicas, como son: la sincronización de las hembras donadoras y las receptoras, la superovulación e inseminación de las donadoras, la recolección y evaluación de los embriones para su posterior transferencia o su congelación, y la falla en cualquiera de éstas técnicas podría afectar el éxito de todo el proceso.

SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL DE LAS DONADORAS Y RECEPTORAS.

Cuando se realiza un programa de transferencia embrionaria es conveniente manejar grupos de animales, por lo que generalmente, por cada donadora se sincronizan entre 5 y 6 receptoras, esto se debe a número de embriones colectados y por si algún problema se presentara con las receptoras. La mayoría de los tratamientos prácticos para sincronizar el celo de las ovejas, se basan en la administración de progesterona o progestágenos solos o en combinación con prostaglandina F2 alfa. En México, el método de elección ha sido el uso de esponjas impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA) y colocadas vaginalmente durante 12 días. También es factible usar dispositivos (CIDR) que contienen 300 mg de progesterona natural. Con estas hormonas la presentación de los estros, ocurre en la mayoría de las donadoras a las 24 horas de su retiro y en las receptoras entre las 36 y las 48 horas posteriores al tratamiento (Ashworth y Bazer, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998; Mejía, 2010).

Debido a la importancia que tiene la sincronía entre el celo de la donadora de embriones y la receptora, la mayor fertilidad en la transferencia embrionaria se obtiene cuando tanto la donadora como la receptora presentan celo el mismo día, por ello se ha utilizado en el protocolo de sincronización, una aplicación de PGF2 α dos días antes del retiro de la progesterona o del progestágeno. En caso de no aplicarse, es común el terminar en las receptoras, al menos 12 horas antes, el tratamiento de sincronización.

También existen protocolos de sincronización que contemplan únicamente el uso de prostaglandina F_{2α}, aunque hay que recordar que permiten la sincronización solamente en caso de que exista un cuerpo lúteo funcional, por lo tanto, para sincronizar al 100% de las hembras, se utilizan dos inyecciones con diferencia de 11-12 días entre ellas. En el caso de usar PGF_{2α} para la sincronización de las hembras, es fundamental el verificar mediante ultrasonografía de imagen que no se encuentren gestantes (Ashworth y Bazer, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998; Mejía, 2010).

SUPEROVULACIÓN.

La superovulación de las donadoras permite obtener un mayor número de embriones de los que se consiguen normalmente, aunque la respuesta es muy variable. La variación individual, se debe principalmente a las diferencias en la condición fisiológica en la que se encuentran los ovarios al momento de la superovulación, ya que el número de folículos en desarrollo así como la presencia de folículos dominantes son diferentes en cada hembra. Por tanto, existen hembras de las que se recolectan entre doce y quince embriones transferibles, mientras que en otras no se recolecta ninguno. En promedio puede considerarse que se obtienen seis embriones transferibles por hembra donadora (Ashworth y Bazer, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998; Mejía, 2010).

Para la superovulación de las donadoras se utilizan principalmente dos hormonas, la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la hormona folículo estimulante (FSH) de origen ovino o porcino, que se administran por vía subcutánea o intramuscular. En diversos trabajos se ha administrado eCG en una sola inyección, con una dosis

total que va desde las 1500 hasta las 3000 UI, mientras que de FSH se han diseñado una gran variedad de esquemas en cantidades constantes o decrecientes, en donde la dosis total, dependiendo del producto utilizado, es de 160 a 200 mg (Folltropin) o de 200 a 250 UI (Pluset), administrada en seis a ocho inyecciones cada doce horas, durante tres o cuatro días. Los mejores resultados en cuanto al número de cuerpos lúteos normales producidos y de embriones transferibles recolectados, se obtienen utilizando la FSH en dosis decreciente, en comparación con la administración de eCG. Esto debido principalmente a que la vida media de la eCG es más larga (26-72 horas), por contener una mayor proporción de ácido siálico (10%), lo que ocasiona una estimulación excesiva y de mayor duración, en comparación con el uso de FSH (Ashworth y Bazer, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998; Mejía, 2010).

Un fenómeno que se presenta normalmente durante la superovulación de las ovejas y las cabras, es la formación de cuerpos lúteos con regresión prematura, lo que se debe a una programación adelantada de la secreción de las prostaglandinas uterinas. También se ha encontrado que el número de embriones transferibles está directamente relacionado con la presencia de cuerpos lúteos normales y plenamente funcionales al día en que se realiza la recolección embrionaria. Por el contrario, la regresión prematura de los cuerpos lúteos puede originar una baja o nula recolecta de embriones, o en su caso, la recuperación de un mayor número de ovocitos sin fertilizar o de embriones degenerados. El efecto negativo de la regresión lútea prematura, ha podido revertirse exitosamente, gracias a la colocación de una esponja o de un CIDR en la donadora, cuando transcurren entre 12 y 24 horas posteriores a la última monta. Dicho dispositivo es

retirado posteriormente, en el momento en que son recolectados los embriones (Buckrell *et al*, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998; Mejía, 2010).

DETECCIÓN O CONTROL DE CELOS.

A partir de 24 horas de retirar el tratamiento de progesterona, se debe detectar la aparición de los celos tanto en las donadoras como en las receptoras; para ello se separan a las hembras en grupos y se introduce a un macho celador, pudiendo determinarse con mayor exactitud el momento en el que se presenta el estro y por tanto, el grado de sincronía entre las donadoras y receptoras, siendo de gran valor para el momento de la transferencia. En el caso en que no realice la inseminación artificial, se introducen los machos para que la monta ocurra de manera natural (Caracuel, 1998).

RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.

Los embriones tradicionalmente se han recolectado de los oviductos o de los cuernos del útero de las donadoras, por laparotomía medio ventral. Sin embargo, se ha intentado la recolección de embriones por diferentes métodos. Así, las técnicas de obtención de embriones se puede realizar de forma quirúrgica o no quirúrgica (Caracuel, 1998).

Quirúrgica.

El método quirúrgico de uso más frecuente en ovejas consiste en la exposición del tracto reproductivo mediante la incisión ventral media, bajo anestesia general. Es posible recuperar óvulos de los cuernos uterinos un vez que han salido del

oviducto, usualmente cinco días después del estro o más tarde. La solución salina amortiguada de fosfato PBS, que es el componente básico del medio de lavado, se introduce en la base del cuerno uterino y se hace fluir hacia la unión uterotubárica, donde se colecta con una aguja roma de jeringa o un pequeño tubo de vidrio insertados en la luz a través de una punción en la pared uterina. El procedimiento también puede efectuarse en la forma opuesta. Se recuperan menos embriones con estos procedimientos que por lavado oviductual. Para el lavado de los oviductos se usa un volumen de 2 a 20 ml, mientras que para el lavado uterino se utilizan de 10 a 60 ml, dependiendo de su tamaño (Jainudeen *et al*, 2003).

El lavado se puede hacer a nivel de oviducto y a nivel de útero, según los días transcurridos desde la monta natural o la inseminación hasta el día de obtención. Las donadoras deben permanecer 24 horas en ayuno y sin tomar líquido desde 12 horas antes de la intervención. La obtención se puede realizar bajo anestesia general, se hace una incisión de unos 15-20 cm en la línea media, se exterioriza el tracto genital y se lava con el medio de Dulbecco al que se le añaden albúmina sérica bovina (BSA) y antibióticos.

El líquido obtenido se pasa a cajas de Petri estériles y se dejan en PBS a 37 grados centígrados mientras los embriones se clasifican y se procede a su transferencia. También se puede proceder a su conservación mediante congelación con nitrógeno líquido (Buckrell *et al*, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998).

Laparoscópica.

La exteriorización del aparato reproductor mediante laparotomía, contempla un proceso quirúrgico que origina la formación de adherencias postoperatorias, que pueden involucrar al útero y los ovarios (Caracuel, 1998).

La obtención no quirúrgica de embriones se puede realizar con la ayuda del laparoscópio o por vía vaginal, ya sea con dilatación del cérvix de forma mecánica o con prostaglandina F2 alfa y estradiol. Para la laparoscopia, las donadoras deben estar en ayuno por lo menos 24 horas antes de realizarla. Debido a que la técnica es menos invasiva que la laparotomía, la duración es menor y por lo tanto se puede utilizar anestesia intramuscular o epidural. Antes de introducir el laparoscopio se induce el neumoperitoneo con CO₂, posteriormente se observan los ovarios para evaluar la tasa de ovulación. En el caso que la superovulación haya dado un buen resultado se realiza una incisión de unos 2.5 cm en la línea alba y a través de ella se exteriorizan los cuernos, para canularlos mediante catéteres intravenosos y proceder al lavado. El líquido obtenido se pasa a unas cajas de Petri estériles y se dejan en PBS a 37 grados centígrados, mientras se evalúan y se procede a su transferencia (Buckrell *et al*, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998).

Aunque la vía laparoscópica es menos invasiva que la quirúrgica, también produce adherencias en el tracto reproductivo y en los ovarios. Esto limita el número de veces que la oveja puede ser utilizada como donadora.

Para poder utilizar una hembra de forma casi definida, puede intentarse la obtención de embriones por vía cervical, después de la dilatación de éste con prostaglandinas y estradiol. Bajo anestesia general se dilata el canal cervical unos 5 mm y se introduce un catéter de tres vías para proceder al lavado y obtención de

los embriones. Posteriormente se procede a la clasificación de los embriones y a la transferencia en fresco o a la conservación mediante congelación (Buckrell *et al*, 1989; Baril *et al*, 1995; Caracuel, 1998; Mejía, 2010).

TRANSFERENCIA DE LOS EMBRIONES.

Los embriones pueden ser transferidos a los oviductos o al útero de las receptoras mediante técnicas laparoscópicas. Cuando se realiza laparotomía es necesaria la anestesia general, mientras que en el caso de la vía laparoscópica se puede realizar con una leve sedación, si se utiliza la misma técnica que se realiza en las inseminaciones artificiales.

El método de transferencia mediante laparoscopia tiene mejores índices de gestación que la técnica quirúrgica. Esta técnica además de segura es mínimamente invasiva y de rápida ejecución (Caracuel, 1998).

EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES.

Por lo general, el medio de lavado en el que se recolectaron los embriones es depositado en una caja de petri cuadrada (10x10 cm) para iniciar su búsqueda en el fondo, debido a su sedimentación. Una vez identificadas las diferentes estructuras (ovocitos y embriones), estas son colocadas en una caja de petri redonda más pequeña (3x3 cm), en donde se mantienen en el medio de lavado enriquecido con un 4 a 10% de albúmina sérica o en una solución comercial de mantenimiento (holding). Tanto el medio de lavado como el de mantenimiento se manejan a temperaturas de entre 25 y 30 °C, tienen un pH de 7.4 y una osmolaridad de 290 miliosmoles.

Todos los embriones que serán posteriormente transferidos deben ser evaluados morfológicamente en un microscopio estereoscópico, clasificándose de acuerdo a su grado de desarrollo y calidad (cuadros 1 y 2). Morfológicamente los embriones están constituidos en su parte externa, por una cubierta esférica de mucopolisacáridos llamada zona pelúcida, por un espacio intermedio o espacio perivitelino, e internamente por un grupo de células o masa de células que individualmente se denominan blastómeros (Tervit *et al*, 1980; Wrigth, 1981; Linder y Wrigth, 1983; Overstrom, 1996; Hasler *et al*, 1987; Godking *et al*, 1987; López *et al*, 1995; Cutini *et al*, 2000).

Los embriones transferibles son aquellos con un grado de desarrollo que corresponde al día en que son recolectados y que presentan una adecuada calidad morfológica, las cuales son evaluadas por medio de un microscopio estereoscópico. Como los embriones se obtienen generalmente de los cuernos del útero entre los días 6 a 7 posteriores al primer día de estro conductual, el desarrollo debe ser el de mórula (grado 4), blastocisto inicial (grado 5), blastocisto (grado 6) o blastocisto expandido (grado 7) (Flores-Foxworth *et al*, 1991; Wintenberger-Torres and Sevellec, 1992; Baril *et al*, 1995). Además, deben presentar una buena calidad (calidad 1) al ser compactos, esféricos, simétricos, con la zona pelúcida íntegra y con los blastómeros de tamaño, color y textura uniformes; o una regular calidad (calidad 2) al presentar imperfecciones menores en sus características, como serían una ligera asimetría, algunos blastómeros extruídos o con un ligero retraso en su desarrollo.

Los ovocitos no fertilizados y los embriones de pobre calidad (calidad 3) y degenerados o muertos (calidad 4), son considerados como no transferibles, ya

que presentan anomalías mayores en las características anteriormente mencionadas (Flores-Foxworth *et al*, 1991; Wintenberger-Torres and Sevellec, 1992; Baril *et al*, 1995).

Grado de desarrollo

Número

- 1 Ovocito (sin fertilizar)
- 2 2 a 12 células
- 3 Mórula temprana
- 4 Mórula (compacta)
- 5 Blastocisto inicial
- 6 Blastocisto (maduro)
- 7 Blastocito expandido
- 8 Blastocisto expandido maduro

Cuadro 1. La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Embryo Transfer Society, IETS), califica el grado de desarrollo de los embriones en ocho categorías.

La calidad de los embriones se califica en cuatro categorías (1 a 4). La calidad 1 (excelentes o buenos) corresponde a los embriones compactos y esféricos, simétricos y con células de tamaño, color y textura uniformes, sin gránulos en el citoplasma, con pocas vesículas pequeñas y con el espacio perivitelino vacío. La calidad 2 (regulares) corresponde a los embriones que muestran imperfecciones menores en sus características como serían una ligera asimetría, algunos blastómeros extruidos y con un ligero retardo en su desarrollo. Los embriones de

calidad 3 (pobres) son aquellos con un ligero grado de degeneración, con blastómeros esféricos dispares, poco compactos y de tamaño variable, con un retardo de 1 a 2 días en su desarrollo, una masa celular aparentemente viable pero con grandes vesículas entre las células, un color muy claro o muy oscuro, irregularidades en la superficie de la masa celular y material de desecho en el espacio perivitelino. La calidad 4 (muertos o degenerados) corresponde a aquellos embriones con la zona pelúcida rota, el blastocele no visible, grandes zonas de degeneración, una pequeña cantidad de células, así como blastómeros sueltos y de diferentes tamaños. Los embriones de calidad 3 y 4 se consideran como no transferibles (Tervit *et al*, 1980; Wrigth, 1981; Linder y Wrigth, 1983; Overstrom, 1996; Hasler *et al*, 1987; Godking *et al*, 1987; López *et al*, 1995; Cutini *et al*, 2000).

C) USO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN FAUNA SILVESTRE.

En animales silvestres, la transferencia de embriones se ha contemplado como una herramienta para la conservación *ex situ*, por lo tanto, se han transferido embriones de especies amenazadas o en peligro de extinción a receptoras domésticas o a hembras silvestres de una especie o subespecie con poblaciones estables o en crecimiento (gestaciones inter-especies). Algunos ejemplos pueden ser la transferencia de embriones de cebra (*Equus burchelli*) y caballos przewalskii (*Equus przewalskii*) a yeguas (*Equus caballus*) o burras (*Equus assinus*) domésticas; de gaur (*Bos gaurus*) a vacas domésticas (*Bos taurus*); o de bongo

(*Tragelaphus euryceros*) a eland (*Tragelaphus oryx*) (Bennett and Foster, 1985; Pope *et al*, 1988).

En pequeños rumiantes silvestres, la generación de gestaciones interespecies y la producción de crías hembras híbridas, se ha contemplado como una opción viable para la multiplicación de especies amenazadas, en peligro de extinción o extintas.

Por ejemplo, entre diferentes especies del género *Ovis*, sobre todo entre aquellas cuyo número cromosómico ($2n=54$), ciclo estral y gestación presentan similitudes, por ejemplo, entre muflones (*Ovis musimon*) y borregas domésticas (*Ovis aries*), con ciclos estrales de 17 días promedio y gestaciones de 149 a 153 días, se han obtenido fácilmente crías mediante montas dirigidas, inseminación artificial y transferencia de embriones (Hoffman, 1973; Bunch and Workman, 1988; Garde *et al*, 1995; Santiago *et al*, 2001; Delgadillo *et al*, 2003). También se ha logrado la producción de crías de borrego rojo armenio (*Ovis orientalis*), mediante la fertilización *in vitro* y la transferencia de los embriones producidos a ovejas domésticas (Coonrod *et al*, 1994).

En España, para el rescate de las cabras silvestres (*Capra pirenaica hispanica*), embriones producidos *in vivo* o mediante clonación fueron exitosamente transferidos a receptoras híbridas (*Capra pyrenaica x Capra hircus*) (Fernández Arias *et al*, 1999, 2001; Folch *et al*, 2008). De la misma manera, para la conservación del borrego cimarrón en México se ha propuesto la producción de crías híbridas entre borregos cimarrón y borregas domésticas (*Ovis canadensis x Ovis aries*), cuyas hembras han sido contempladas como receptoras de embriones Cimarrón (Mejía *et al*, 2008).

D) RECONOCIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN LAS OVEJAS.

El reconocimiento materno de la gestación en la oveja ocurre alrededor de los días 12 a 13 de la fecundación (Moor y Rowson, 1966).

En ovejas no gestantes, alrededor de los días 12 a 15 del ciclo estral ocurre la destrucción del cuerpo lúteo (Stewart *et al*, 1989) por la liberación pulsátil de prostaglandina F₂α (PGF₂α) (Flint *et al*, 1986; Putney *et al*, 1988). La producción de PGF₂α se incrementa tanto en las ovejas gestantes como en las no gestantes, hasta alcanzar un pico alrededor del día 14 ó 15, para posteriormente decrecer. Sin embargo, el patrón de secreción es diferente, ya que en las ovejas no gestantes la secreción es pulsátil, mientras que en las ovejas gestantes hay una secreción basal constante de la PGF₂α, es decir, en la oveja a diferencia de otras especies donde deja de producirse por completo, sólo cambia el patrón de secreción de PGF₂α de pulsátil a no pulsátil durante la gestación (Zarco *et al*, 1988).

En la oveja, para que ocurra el reconocimiento materno de la gestación y el cuerpo lúteo se mantenga más allá del día 14 post-ovulación se presentan varios mecanismos, como serían la atenuación de la liberación pulsátil de la PGF₂α por el útero, la reducción de la actividad luteolítica de la misma sobre el cuerpo lúteo y el incremento de la secreción de PGE₂ en el útero gestante (Niswender *et al*, 1994; Wiepz *et al*, 1992; Wittbank *et al*, 1992).

Además, los embriones ovinos entre los días 12 al 21 de gestación, secretan una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos altamente homóloga con los

interferones, por lo que es ahora clasificada como interferón τ ovino (oIFN- τ). (Thatcher et al, 1986; Bazer et al. 1989). El oIFN- τ actúa de manera paracrina ya que es producido por las células del epitelio del trofoblasto y sus receptores se encuentran en el endometrio, por lo que es absorbido por el epitelio del lumen uterino y por el epitelio de las glándulas uterinas (Thatcher *et al*, 1986; Bazer *et al*, 1989).

El oIFN- τ se encarga principalmente de mantener la liberación de PGF2 α en un promedio no mayor de 1.3 pulsaciones entre los días 14 y 15 de la gestación, suprime el desarrollo de mecanismos luteolíticos del epitelio del endometrio, inhibiendo la transcripción del receptor de estrógenos (ER α) de forma directa y de forma indirecta, inhibiendo a los genes del receptor de la oxitocina (OTR) (Kim *et al*, 2003). Algunos estudios también sugieren que induce la síntesis de inhibidores para enzimas como fosfolipasa A2 o la ciclo-oxigenasa (COX-2), necesarias durante la producción y secreción de la PGF2 α . Sin embargo, hay cierta controversia sobre si la expresión de COX-2 en el epitelio del endometrio, tiene un efecto regulador positivo en la implantación y en el desarrollo del embrión (Lim *et al*, 1997, 1999; Matsumoto *et al*, 2002), ya que durante la gestación temprana, la expresión de COX-2 se incrementa en los días 10 y 12 siendo más alta que en las ovejas no gestantes. En estudios *in vivo* en ratones se muestra que la expresión de COX-2 es esencial para la implantación del blastocito y provoca cambios en la permeabilidad vascular y en la angiogénesis (Kim *et al*, 2003).

Coincidiendo con el incremento en la producción del oIFN- τ , ocurre la transformación morfológica del embrión, que pasa de tener una forma esférica y

un diámetro de alrededor de 140 μm , a una forma tubular y posteriormente filamentosa, que llega a medir entre 140 y 190 mm en el día 15 de la gestación. Este mecanismo, esencial para el reconocimiento de la gestación permite al embrión presentar la mayor superficie de contacto hacia el endometrio uterino (Thatcher *et al*, 1986; Bazer *et al*, 1989).

Otro mecanismo que permite el mantenimiento de la gestación en las ovejas es la secreción de las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) secretadas en la placenta. Estas glicoproteínas asociadas a la gestación, también reciben otros nombres como proteínas B específicas de la gestación. A pesar de no conocerse totalmente su acción biológica ni los mecanismos que las regulan, se cree que tienen como función la de unión y transporte de péptidos bioactivos, actuando como hormonas al unirse a secuencias específicas de aminoácidos en moléculas receptoras, y como agentes luteotróficos o luteoprotectores, regulando la esteroidogénesis de la placenta o como inmunomoduladores (Xie *et al*, 1994; Guruprasad *et al*, 1996; Fernández Arias *et al*, 1999).

E) DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN OVEJAS.

Importancia del diagnóstico de la preñez.

Saber si una hembra está o no gestante es una herramienta importante en el manejo reproductivo, por ello, se emplean varias técnicas para su diagnóstico.

No retorno al estro.

Durante la gestación, el feto inhibe la regresión del cuerpo lúteo e impide que la madre vuelva al estro. Por lo tanto, se supone que una hembra que no retorna o no presenta estro conductual después de haber sido inseminada o después de

haber recibido embriones, está gestante. En el caso de las ovejas, para la detección del no retorno al estro se usa un carnero cubierto con un mandil, o en ocasiones un macho vasectomizado, entre los días 15 a 18 posteriores al estro anterior, o de 8 a 11 días después de realizada la transferencia de los embriones (Jainudeen *et al*, 2003).

Ultrasonografía.

Las ondas de ultrasonido son inaudibles para el oído humano y operan a frecuencias de 1 a 10 MHz. En medicina veterinaria se usan dos tipos de ultrasonido: fenómeno Doppler y ecografía de pulsos (Jainudeen *et al*, 2003).

Fenómeno Doppler. En la técnica basada en el fenómeno Doppler, las ondas sonoras que inciden en un objeto en movimiento se reflejan hacia la fuente transmisora a una frecuencia ligeramente distinta. El detector de pulsos fetales ultrasónicos basado en el fenómeno Doppler consiste en un transductor y un amplificador. Cuando el transductor se aplica a la pared abdominal del animal o se inserta en el recto, emite un estrecho haz de ondas de alta frecuencia. Los movimientos del corazón del feto o el flujo sanguíneo en la circulación fetal o materna modifican la frecuencia de estas ondas, que se reflejan de regreso a la sonda, donde son convertidas en sonido audible y amplificadas, o en su caso son convertidas en luz (Jainudeen *et al*, 2003).

Ecografía de pulsos ultrasónicos. Al hacer contacto con tejidos de impedancia acústica variable, los pulsos de ultrasonido generados por cristales piezoeléctricos en un transductor son reflejados hacia éste, transformados en energía eléctrica y mostrados en un osciloscopio de rayos catódicos de diversas maneras. Los modos A y B son las formas básicas de uso actual. El modo A, de amplitud, es

una representación unidimensional de la amplitud del eco en función de la distancia; mientras que el modo B, de brillantez, produce una imagen bidimensional exacta de cortes transversales de los tejidos blandos. La brillantez de los puntos se representa en el osciloscopio como diversos tonos de gris, comparable a una sucesión en blanco y negro, que revelan cualquier movimiento en el tejido que se visualiza (Jainudeen *et al*, 2003).

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

Localización.

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El Centro se encuentra ubicado en el Km. 53.1 de la Carretera Federal México-Cuernavaca, en el poblado de Tres Marías, Municipio de Huitzilac en el estado de Morelos.

Animales.

Se utilizaron en el experimento 10 ovejas donadoras de la raza suffolk, con edades entre 2 a 5 años y una condición corporal entre 2.5 y 3, de acuerdo con

una escala subjetiva de 0 a 5, que fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: uno con cinco hembras que fueron inseminadas con semen congelado de borrego cimarrón (**grupo embriones híbridos**), y el otro con cinco hembras que fueron inseminadas con semen congelado de borrego doméstico (**grupo embriones domésticos**).

También utilizamos 22 ovejas receptoras adultas de la raza suffolk, con edades entre 2 a 5 años y una condición corporal entre 2.5 y 3, de acuerdo con una escala subjetiva de 0 a 5, que fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: uno con once hembras que recibieron embriones híbridos de cimarrón (**grupo embriones híbridos**), y el otro con once hembras que recibieron embriones domésticos (**grupo embriones domésticos**).

Todas las ovejas se manejaron en un sistema tipo intensivo, con pastoreo diurno en praderas compuestas por *rye grass perenne*, *orchard*, *kikuyo* y *trébol blanco* y alojadas por la tarde en corrales, en donde se complementó la alimentación con heno de avena y concentrado comercial, proporcionando 3.05 mega calorías de energía metabolizable y 14.7% de proteína cruda por kilogramo Mcal de materia seca.

Tratamientos.

Tanto las donadoras como las receptoras se sincronizaron con esponjas vaginales de 20 mg de FGA durante 10 días y a su retiro se administraron 200 UI de eCG

* (Chronogest, Intervet Francia) (Flores-Foxworth *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995; Mejía *et al*, 2008).

La superovulación de las donadoras se realizó con una dosis total de 200 mg de FSH de origen porcino ** (Folltropin-V, Bioniche) en esquema decreciente y dividida en 8 aplicaciones intramusculares durante 4 días, iniciando dos días antes del retiro del progestágeno y finalizando un día después de su retiro (Schiewe *et al*, 1984; Kraemer, 1989; Flores-Foxworth *et al*, 1991; Scudamore *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995; Mejía *et al*, 2008).

Las ovejas donadoras de cada grupo fueron detectadas en estro con machos enteros cubiertos con un mandil, para ser inseminadas artificialmente entre las 46 y 50 horas posteriores a la detección ser inseminadas artificialmente. Las donadoras del **grupo embriones híbridos (n=5)** fueron inseminadas con semen congelado de borrego cimarrón, y las del **grupo embriones domésticos (n=5)** se inseminaron con semen congelado de borrego doméstico, previa dieta por 24 horas y anestesia general con 0.44mg/kg de xilacina intramuscular y 1.0mg/kg de peso vivo de ketamina endovenosa. La inseminación se realizó mediante el uso de un laparoscopio y en cada uno de los cuernos del útero se depositó una dosis de 0.25 ml a una concentración de 100×10^6 de espermatozoides por dosis. Al finalizar la cirugía, se suturaron las incisiones y se administraron intramuscularmente 2 mg/kg de peso vivo de meglumina de flunixin y 20,000 UI/kg de peso de penicilina G procaínica y estreptomina. La administración de antibiótico continuó durante 5 días más. Unas horas después de la inseminación se les proporcionó agua y pastura en pequeñas cantidades y al día siguiente la alimentación regular (Schiewe *et al*, 1984; Kraemer, 1989; Flores-Foxworth *et al*, 1991; Scudamore *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995; Mejía *et al*, 2008).

Recolección y evaluación de embriones.

La recolección de los embriones en las donadoras se llevó a cabo mediante laparotomía medio ventral, el día 7 posterior a la inseminación. Las hembras fueron previamente dietadas por 24 horas y anestesiadas con 1.0mg/kg de xilacina y 1.0mg/kg de ketamina. Una vez anestesiadas se rasuró, lavó y desinfectó la región abdominal, para realizar una incisión de aproximadamente 4 cm de largo y 2 cm anterior a la ubre sobre la línea media para entrar a la cavidad abdominal. Se exteriorizó el útero y se lavó con solución salina fisiológica cada cuerno por separado, mediante una sonda de Foley (10 Fr) y 60 ml de medio de lavado. Concluida la recolección, el útero se regresó a la cavidad abdominal, se suturó la incisión y se administró intramuscularmente 2 mg/kg de peso de meglumina de flunixin y 20,000 UI/kg de peso de penicilina G procaínica y estreptomicina. La administración de antibiótico continuó durante 5 días más. Unas horas después de finalizada la recolección de los embriones, se les proporcionó agua y pastura en pequeñas cantidades y al día siguiente la alimentación regular (Schiewe *et al*, 1984; Kraemer, 1989; Flores-Foxworth *et al*, 1991; Scudamore *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995; Mejía *et al*, 2008).

Los embriones fueron conservados en una solución de mantenimiento, y evaluada su morfología con un microscopio estereoscópico, para clasificarlos de acuerdo con su grado de desarrollo y calidad, en mórulas y blastocistos excelentes o buenos y regulares (transferibles); o en ovocitos y mórulas o blastocistos, de

calidad pobre, degenerados o muertos (no transferibles) (Flores-Foxworth *et al*, 1991; Wintenberger-Torres and Sevellec, 1992; Baril *et al*, 1995).

Transferencia de los embriones.

Las receptoras del **grupo embriones híbridos (n=11)** y las del **grupo embriones domésticos (n=11)** recibieron un embrión clasificado como transferible, previa dieta por 24 horas y anestesia general con 0.44mg/kg de xilacina intramuscular y 1.0mg/kg de peso vivo de ketamina endovenosa. La transferencia se realizó con la ayuda de un laparoscopio para exteriorizar el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presentó el cuerpo lúteo de mejor calidad. En el cuerno seleccionado se hizo una pequeña punción y se introdujeron los embriones previamente cargados en un catéter. Una vez finalizada la transferencia, se suturaron las incisiones y se administró intramuscularmente 2 mg/kg de peso de meglumina de flunixin y 20,000 UI/kg de peso de penicilina G procaínica y estreptomicina. La administración de antibiótico continuó durante 5 días más. Horas después de realizada la transferencia, se les proporcionó agua y pastura en pequeñas cantidades y al día siguiente la alimentación regular (Schiewe *et al*, 1984; Kraemer, 1989; Flores-Foxworth *et al*, 1991; Scudamore *et al*, 1991; Baril *et al*, 1995; Mejía *et al*, 2008).

Diagnóstico de gestación.

Mediante un ultrasonido de imagen y tiempo real con un transductor lineal de 5 Mhz se hizo el diagnóstico de gestación al día 33 posterior a la transferencia de los embriones. Se revisaron ambos cuernos del útero, tratando de identificar líquido, placentomas y al producto (Quintela *et al.*, 1999; Strmsnik *et al.*, 2002; Yotov, 2005).

Análisis estadístico.

Se comparó entre grupos de donadoras la respuesta a la superovulación, en cuanto al número de cuerpos lúteos, mediante una prueba de t de student. El número de embriones transferibles, esto es las mórulas y blastocistos calidades 1 y 2, también se comparó entre grupos de donadoras mediante una prueba de t de student.

La fertilidad se consideró como la proporción de hembras que parieron en relación a las que recibieron un embrión, y el porcentaje de fertilidad de las hembras receptoras de embriones de ambos grupos, se comparó mediante una prueba de chi-cuadrada (Daniel, 2005).

IV. RESULTADOS.

En los cuadros 1 y 2 se presenta la respuesta de las borregas donadoras de embriones al tratamiento superovulatorio, en cuanto al número y calidad de los cuerpos lúteos en cada ovario, así como el grado de desarrollo y la calidad de las estructuras recolectadas. En el grupo domestico se obtuvieron 29 cuerpo lúteos normales del ovario izquierdo y 26 cuerpos lúteos normales del ovario derecho, con un total de 42 embriones transferibles; en el grupo hibrido se obtuvieron 27 cuerpos lúteos normales del ovario izquierdo y 24 cuerpos lúteos normales del ovario derecho, con un total de 23 embriones transferibles.

En los cuadros 3 y 4, se presenta la estadística descriptiva de los cuerpos lúteos normales, así como de los embriones transferibles obtenidos en cada grupo de donadoras. En dichos cuadros puede observarse que el número de cuerpos lúteos normales fue similar ($P>0.05$) entre las donadoras inseminadas con doméstico ($n=5$, 11.00 ± 3.39) o cimarrón ($n=5$, 10.00 ± 2.83). También se observa que en las donadoras inseminadas con doméstico (grupo embriones domésticos) se recolectaron un mayor número ($P<0.05$) de embriones transferibles (8.40 ± 2.29), en comparación con las inseminadas con cimarrón (4.40 ± 1.34).

En el cuadro 5 se presentan los valores obtenidos de fertilidad en las receptoras del grupo embriones domésticos o de embriones híbridos de cimarrón. Puede observarse que la fertilidad en las receptoras de embriones domésticos (90.90%, 10/11) fue significativamente mayor ($P<0.05$) a la de las receptoras de embriones híbridos (36.36%, 4/11).

V. DISCUSIÓN.

La hibridación es un evento que se ha llevado a cabo durante años en animales domésticos por intervención humana (Bernirshcke y Ryder, 1985). Algunos autores sostienen que la hibridación en la naturaleza es común, por lo menos en los ovíparos, particularmente en los anfibios o las aves, y la han llegado a considerar como un importante mecanismo para la formación de nuevas especies (Zeh y Zeh, 2000): otros afirman que la hibridación, tanto en ovíparos como en vivíparos, no es un mecanismo de especiación, y que por lo tanto, existen un sin número de mecanismos biológicos encaminados a evitarla (Storer *et al*, 1975).

Se conoce que la viabilidad de los embriones y de los fetos híbridos, producto de una gestación entre diferentes especies de mamíferos (dentro de un mismo género), está altamente comprometida, ya que durante ella pueden expresarse intensamente algunos “conflictos genómicos”, a partir del momento en el cual los embriones superan la etapa de cigoto (Zeh y Zeh, 2000).

Entre algunas especies, estos conflictos se deben inicialmente a las diferencias entre el número cromosómico de la cría híbrida que es gestada, en relación con el número cromosómico de sus progenitores. Así, una “mula” tiene un número cromosómico intermedio de $2n=63$, en relación al $2n=64$ de la yegua (*Equus caballus*) y $2n=62$ del burro (*Equus assinus*), por lo que el que los embriones sean aneuploides (con uno o más de sus cromosomas duplicados o perdidos) provoca que éstos no se implanten o que los fetos mueran durante la gestación temprana (Bernirshcke y Rider, 1985; Boeta y Zarco, 1999).

Un caso similar se presenta en las hibridaciones entre camélidos, las cuales a pesar de ocurrir entre especies con el mismo número cromosómico ($2n=74$), por ejemplo entre un macho dromedario y una hembra llama presentan una muy baja o nula viabilidad, en el caso de que el macho sea llama y la hembra dromedario (Skidmore *et al*, 1999).

En cuanto a los bóvidos, existen una serie de hibridaciones entre especies domésticas, y entre domésticos y silvestres. Por ejemplo, las cruzas de ganado europeo (*Bos taurus*) con cebú (*B. indicus*); las cruzas de bovinos domésticos con bisontes (*Bison bison*), con yaks (*Bos grunniens*), o con búfalos de río (*Bubalus bubalis fluviatilis*) y de pantano o carabao (*Bubalus bubalis carabanesis*). Una característica distintiva de las hembras híbridas bovinas es que tienen una

fertilidad normal, mientras que los machos son en muchos casos estériles (Rosnina *et al*, 2002). Tanto *B. taurus* como *B. indicus*, tienen un número cromosómico diploide de 60, con 58 autosomas acrocéntricos y los 2 cromosomas sexuales. Existen también diferencias morfológicas entre los cromosomas de las dos especies, siendo el cromosoma Y acrocéntrico pequeño para *B. indicus* y submetacéntrico pequeño para *B. taurus*. Los números diploides del búfalo de pantano y del búfalo de río son de 48 y 50 respectivamente, por lo que el híbrido tiene un cariotipo intermedio $2n=49$, con uno de los cromosomas fusionados y diferentes anomalías a lo largo del desarrollo embrionario. Sin embargo, en los híbridos que llegan a término, tanto la hembra como el macho son fértiles (Rosnina *et al*, 2002).

Dentro del género *Ovis* se han logrado hibridaciones y gestaciones inter-especies exitosas, particularmente entre especies cuyo número cromosómico ($2n=54$), ciclo estral (16-17 días) y duración de la gestación (146-153 días) presentan similitudes (Hoffman, 1973; Delgadillo *et al*, 2003), se han logrado hibridaciones entre borregos muflón (*Ovis gmelini musimon*) y borregas domésticas (*Ovis aries*) (Hoffman, 1973; Bunch and Workman, 1988; Garde *et al*, 1995, Santiago *et al*, 1999), entre borregos muflón y argali (*O. argali*) (Bunch y Cox, 1980) o entre borregos rojos armenios (*O. orientalis*) y ovejas domésticas (Coonrod *et al*, 1994). También ha sido posible la hibridación entre los borregos dall (*O. dalli*) y los cimarrón (*O. canadensis*) (Hobbes y Nowlan, 1997), ya que además de tener el mismo número cromosómico ($2n=54$), la gestación tiene una duración similar (175 días promedio) (Grzimek, 1992).

Sin embargo, la transferencia de embriones de borregos dall a borregas domésticas (mismo número cromosómico, diferente duración de la gestación), originó un reducido número de receptoras gestantes, así como pérdidas de las gestaciones una vez establecidas, debido a la presentación de muertes embrionarias y fetales (Buckrell *et al*, 1990). Mientras que en el caso de la transferencia de embriones de borregos cimarrón a borregas receptoras domésticas, no se detectaron gestaciones positivas (Mejía *et al*, 2008).

Trabajos realizados con anterioridad, habían demostrado que la fertilidad en ovejas domésticas inseminadas con semen de borrego cimarrón era significativamente menor, en comparación con la de las ovejas domésticas inseminadas con semen de borrego doméstico, aunque no había podido determinarse una posible causa (Palma *et al*, 2007; Calderón *et al*, 2008).

Los resultados del presente trabajo muestran que la recolección de embriones transferibles fue menor (4.40 ± 1.34) en las borregas donadoras de embriones que son inseminadas con semen de borrego cimarrón, en comparación con las domésticas inseminadas con doméstico (8.40 ± 2.29) ($P < 0.05$), lo que sugiere que el éxito en la fertilización de los ovocitos, así como el grado de desarrollo y la calidad de los embriones, dependen del semen empleado (cimarrón o doméstico); por tanto, éxito depende de una gestación inter o intra-especies, presentando una significativamente menor viabilidad los embriones producto de una gestación inter-especies.

El que en el presente trabajo se transfirieran únicamente los embriones calificados con un adecuado grado de desarrollo y calidad, indicaría que además existe una posterior mortalidad embrionaria, ya que la fertilidad en las receptoras de los

embriones híbridos de cimarrón (36.36%, 4/11) fue significativamente menor ($P < 0.05$) a la obtenida en las receptoras de los embriones domésticos (90.90%, 10/11). Esto puede ocurrir debido a la incapacidad de los embriones híbridos de cimarrón para ser reconocidos eficientemente por el útero de la borrega doméstica que mantiene la gestación; ya sea porque los mecanismos o las proteínas como el oIFN- τ producidas por los embriones híbridos de cimarrón difieran un poco de las producidas por los embriones domésticos, o porque tal vez, el problema principal radique en que en los eventos para el reconocimiento de la gestación, programados genéticamente, esto se puede deber a la existencia de un desfase o asincronía en el momento o tiempo en el cual deberían de presentarse estos eventos. En este sentido, es importante recordar las diferencias significativas que existen entre la duración del ciclo estral de las borregas cimarrón (28 días promedio) y las domésticas (17 días promedio), pero sobre todo entre la duración de la gestación entre las borregas cimarrón (175 días promedio) y las domésticas (150 días promedio).

Puede concluirse que la generación de una gestación inter-especies como la del presente trabajo, a través de la producción de embriones híbridos entre borregas cimarrón y borregas domésticas, puede ser un modelo para el posterior estudio controlado de “conflictos genómicos” materno embrionarios y fetales, que se expresen por ejemplo, en incompatibilidades inmunológicas o placentarias, o con la producción insuficiente o inadecuada de otras hormonas fundamentales para el adecuado establecimiento y desarrollo de la gestación.

VI REFERENCIAS.

Ashworth C, Bazer F. Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biol Reprod* 1989; 40:425-433.

Baril G, Brebion P, Chesné P. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. FAO. Producción y Sanidad Animal. Roma. 1995.

Bennet S, Foster W. Successful transfer of zebra embryo to a domestic horse. *Equine Vet Journal. Supplement 3: Equine Embryo Transfer* 1985; 78-79.

Bernirschke K., Ryder O.A. 1985. Genetic aspects of equids with particular reference to their hybrids. *Equine Veterinary Journal. Supplement 3: Equine embryo transfer.* 1-10.

Buckrell B, Gartley C, Johnson W. Results of a commercial sheep embryo transfer program. *Theriogenology* 1989; 31:178.

Buckrell BC, Gartley CJ, Mehren KG, Crawshaw GJ, Johnson WH, Barker IK, Balke J, Coghill C, Challis JR, Goodrowe KL. Failure to maintain interspecific pregnancy after transfer of Dall's sheep embryos to domestic ewes. *J Reprod Fertil* 1990; 2:387-394.

Bunch T.D., Cox, L.M. 1980. Argali-mouflons- Gambling with genes. *Wild Sheep Int.* 2: 9-12.

Bunch T, Workman G. Hybridization of desert bighorn and argali-mouflon wild sheep. *Desert Bighorn Council Trans.* 1988; 32: 16-18.

Boeta M, Zarco L. Mortalidad embrionaria y aborto en yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro. Evaluación ultrasonográfica y endocrinológica. *Memorias del 4^o Curso Internacional de Actualización en Equinos.* Tlaxcala, México. 1999; 55-60.

Caracuel M. Transferencia de Embriones. En: *Cursos superiores varios autores. Reproducción y Mejora de Pequeños Rumiantes, Conserjería de Agricultura y Pesca* 1998: 273-277.

Calderón B, Mejía O, Gual F, Pérez M. Características morfométricas de las placentas de borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*), borrego doméstico (*Ovis aries*) y su híbrido Cimarrón x doméstico. *Perspectivas en Zoología Mexicana* 2008; 173- 185.

Coonrod S, Flores-Foxworth G, Moreno J, Westhusin M, Byrd S, Kramer D. Birth of armenian red sheep (*Ovis orientalis*) lambs to domestic sheep (*Ovis aries*) following interspecific transfer of IVM-IVF derived embryos. *Theriogenology* 1994; 41:182.

Cutini A., Teruel M and Cavodevila J. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Taurus*. 2000,7:28-39.

Daniel W. Bioestadística 2005. Ed. Limusa.

Daza A. La Lactación. Reproducción y Sistemas de Explotación del Ganado Ovino. Ed. Mundi-Prensa, 1997: 159-177.

Delgadillo A, Mejía O, Berruecos J, Vásquez C. Estudio morfológico de los cromosomas del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), Tabasco o Pelibuey (*Ovis aries*) y su cruce. *Vet Méx* 2003; 34: 27-37.

Dresser BL, Pope CE, Kramer L, Kuehn G, Dahlhausen RD, Maruska EJ, Reece B, Thomas WD. Birth of Bongo Antelope (*Tragelaphus euryceros*) to Eland Antelope (*Tragelaphus orix*) and cryopreservation of Bongo Embryos. *Theriogenology* 1985; 23: 190.

Fernández-Arias A, Alabart J, Folch J, Beckers J. Interspecies pregnancy of Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-associated glycoprotein. *Theriogenology* 1999; 51:1419-1430.

Fernández-Arias A, Roche A, Alberio R, Alabart J, Folch J. Use of hybrids as recipients in interespecies embryo transfer in the capra genus. Proceedings of the Annual Conference. International Embryo Transfer Society. *Theriogenology* 2001; 55: 383.

Flores-Foxworth G, Foxworth B, Nuti L. Embryo transfer in Kenyan Goats. Proceedings of a workshop on embryo transfer 1991. Naivasha (Kenya).

Folch J, Cocero M, Chesné P, Alabart J, Domínguez V, Cognie Y, Roche A, Fernández-Arias, Martí J, Sánchez P, Echegoyen E, Beckers J, Sánchez A, Vignon X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 2009;

doi:10.1016/j.theriogenology.2008.11.005.

Garde J, Perez S, Aguado M, Ayllon E, Garrido D, Montoro V. 1995. Live birth of hybrid (*O. musimon* x *O. aries*) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with mouflon semen obtained 40 hours postmortem. *Theriogenology* 1995; 43: 218.

Grzimek, B. 1992. Grzimek's encyclopedia of mammals. McGraw-Hill.

Godkin AM., Leslie KE., Wain GM and Leslie BE. Factors affecting pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen bovine embryos. *Theriogenology*. 1987, 27, 1: 230.

Hobbes M., Nowlan U. 1997. Hybridization of thinhorn and bighorn sheep, *Ovis dalli* x *O. canadensis*. *Canadian Field Naturalist*. 111(4): 647-648.

Hoffman, R.S., Woolf A. 1973. G-Band Patterns as Chromosomal markers, and the interpretation of Chromosomal Evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia*. 29: 117-119.

Kraemer D. Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology* 1989; 31:141-148.

Hasler F, Maccauley D, Lathrop F, Foote H. Effect of donor embryo recipient interactions, on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*. 1987, 27: 139-168.

Hoffman R, Woolf A. G-Band patterns as chromosomal markers and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia* 1973; 29: 117-119.

Linder M, Wright W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 1983, 29: 407-416.

Lopez A, Gamboa A, Holy L. Respuesta superovulatoria en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Vet Mex* 1995, 26;3: 189-193.

Jainudeen M.R, Wahid H, Hafez E.S.E. Ovejas y Cabras. En: Hafez y Hafez, editores. *Reproducción e inseminación Artificial en Animales*: México, 2000: 183-184.

Jainudeen M.R, Wahid H, Hafez E.S.E. Inducción de ovulación, producción y transferencia de embriones. En: Hafez y Hafez, editores. *Reproducción e inseminación Artificial en Animales*: México, 2003: 415-440.

McDonald L.E. *Endocrinología Veterinaria y Reproduccion*. 4ta edición. México: Mc Graw-Hill, 1993.

Mejía O, Becerril M, Cervantes J, Jiménez A. Híbridos de Cimarrón (*Ovis canadensis* x *Ovis aries*). V Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas 2000. La Habana, Cuba, pp 211.

Mejía O. características Reproductivas de los Ovinos y los Caprinos, en: Departamento de Educación Continua. *Memorias del curso teórico-práctico en Transferencia de Embriones en Ovinos y Caprinos* 2010 Octubre 13-14; Chapa de Mota Edo. Mex, México. 2010: 1-10.

Mejía O, Gual F, Núñez J, Pérez M, Palma M. Esquemas de sincronización y superovulación en ovejas domésticas (*Ovis aries*) como modelo para la transferencia de embriones en borregas cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*). *Perspectivas en Zoología Mexicana* 2008; 187-203.

Mejía O. Transferencia de embriones en ovejas. Memorias del curso teórico-práctico Evaluación, Congelación lenta y Vitrificación de Embriones Ovinos. CEIEPO, FMVZ-UNAM 2009; 11-19.

Monson G, Summer L. The Desert Bighorn. Its Life History, Ecology and Management. Tucson: The University of Arizona Press. 1990.

Monson R, Post G. Experimental transmission of *Protostrongylus stilesi* to bighorn-mouflon sheep hybrids. *J Parasitol* 1972; 58:29.

Overstrom EW. In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology*. 1996. 45: 3-16.

Palma M, Rosales A, González-Rebeles C, Castillo H, Rojas S, Gual F, Ortega J, Mejía O. Monitoreo de la gestación de borregas Muflón y domésticas inseminadas con borrego Cimarrón. *World Sheep & Wool Congress* 2007; 110-116.

Pineda M.H. Patrones reproductivos de oveja y cabra. En: McDonald L.E., editor. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción: México*, 1993: 416-435.

Pope C, Dresser B, Kuehn C, Kramer L, Giullespie D. 1988. Live birth of a gaur (*Bos gaurus*) calf following nonsurgical embryo transfer to a Holstein (*Bos taurus*) recipient. *Theriogenology* 1988; 29: 289.

Quintela LA, Díaz C, Peña A, Becerra J, Herradón P. Diagnóstico precoz de gestación por ecografía transrectal en la oveja. *Arch Zootec* 1999; 48: 13-20

Rosnina Y, Jainudeen M.R., Hafez E.F.E. 2002. Genética de la incapacidad reproductiva. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. McGraw Hill-Interamericana. México.325-326.

Rowson L, Moor R. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. J Reprod Fert 1966; 11:207-212.

Santiago J, González-Bulnes A, Gomez-Brunet Y, Cocero M, Del Campo A, García-García R, Lopez A. Procedure for successful Interspecific embryo transfer from mouflon (*Ovis gmelini musimon*) to spanish merino sheep (*Ovis aries*). J Zoo Wild Medicine 2001; 32(3): 336-341.

Scudamore C, Robinson J, Aitken R, Kennedy D, Ireland S, Robertson I. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. Theriogenology 1991; 35:329-337.

Schiewe M, Bush M, Stuart I, Wildt D. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. Theriogenology 1984; 22:675-682.

Shackleton DM, Peterson R, Haywood J, Bottrell A. Gestation period in *Ovis canadensis*. J Mammalogy 1984; 65: 337-338.

Schoenecker KA, Lynda R, Kirkpatrick J. Comparison of tree fecal metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). J Wildlife Disease 2004; 40 (2): 273-281.

Skidmore J. A., Billah M., Binns M., Short R.V. 1999. Hybridizing old and new world camelids: *Camelus dromedarius* x *Lama guanicoe*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 266 (1420): 649-256.

Soto S, Rodríguez C, Gual F, Rivera J, Rodarte F, Rojas S, Murcia C, Salame A, Mejía O. Monitoreo no invasivo de etapas reproductivas en borregos

Cimarrón en cautiverio mediante observaciones conductuales y cuantificación de esteroides fecales. World Sheep & Wool Congress 2007. Querétaro, México. Julio 2007. 6 pp.

Strmsnik LM, Pogacnik N, Cebulj KM, Kosec M. 2002. Examination of oestrus cycle and early pregnancy in sheep using transrectal ultrasonography. Slov Vet Res. 2002; 39(1): 47-58.

Tervit HR, Cooper MW, Goold PG and Haszard GM. Nonsurgical embryo transfer in cattle. Theriogenology. 1980, 13: 63-71.

Tribulo Humberto, Bo Gabriel. Biotecnologías Reproductivas. En: Galina Carlos, Valencia Javier, editors. Reproducción de Animales Domésticos: Mexico 2006: 539-570.

Turner JC, Hansen C. Reproduction. In: G. Monson and L. Sumner, eds. 1980. The Desert Bighorn: Its Life History, Ecology, and Management. Tucson: The University of Arizona Press. 370. 145-151.

Wintenberger-Torres S, Sevellec C. Atlas of the early development of the sheep embryo. INRA Station de Physiologie Animale 1992. 65 p.

Wright JM. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. Theriogenology. 1981, 15: 1: 43-56.

Young SP, Manville RH. Records of Bighorn Hybrids. J Mammalogy 1960; 41:523-525.

Yotov S. Diagnostic of Early Pregnancy in Stara Zagora Dairy Sheep Breed. Bulgarian J Vet Med 2005; 8(1): 41-45.

CUADROS.

Cuadro 1. Respuesta a superovulación en las ovejas del **grupo embriones**

domésticos.

No. de oveja	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Grado de desarrollo y calidad
01	6 Cuerpos lúteos normales.	7 Cuerpos lúteos normales.	5 blastocistos iniciales calidad 1 (transferibles), 2 blastocistos maduros calidad 2 (transferibles).
02	7 Cuerpos lúteos normales.	5 Cuerpos lúteos normales.	7 mórulas compactas calidad 1 (transferibles), 2 mórulas compactas calidad 2 (transferibles).
03	8 Cuerpos lúteos normales.	7 Cuerpos lúteos normales.	2 blastocistos iniciales calidad 1 (transferibles), 4 blastocistos maduros calidad 1 (transferibles), 3 blastocistos expandidos calidad 1 (transferibles), 4 mórulas compactas calidad 1 (transferibles).
04	3 Cuerpos lúteos normales.	4 Cuerpos lúteos normales.	4 blastocistos iniciales calidad 1 (transferibles), 3 mórulas compactas calidad 1 (transferibles).
05	5 Cuerpos lúteos normales.	3 Cuerpos lúteos normales.	5 blastocistos maduros calidad (transferibles), 1 mórula compacta calidad 1 (transferible).

Cuadro 2. Respuesta a superovulación en las ovejas del **grupo embriones híbridos.**

No. de oveja	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Grado de desarrollo y calidad
01B	5 Cuerpos lúteos normales.	7 Cuerpos lúteos normales.	2 mórulas iniciales calidad 2 (transferibles), 3 mórulas compactas calidad 2 (transferibles), 1 embrión de 2 células (no transferible), 1 embrión de 4 células (no transferible).
05B	9 Cuerpos lúteos normales.	9 Cuerpos lúteos normales.	1 blastocisto inicial calidad 3 (no transferible), 4 blastocistos expandidos calidad 3 (no transferibles), 3 blastocistos expandidos calidad 2 (transferibles), 2 mórulas compactas calidad 2 (transferibles).
06B	3 Cuerpos lúteos normales.	4 Cuerpos lúteos normales.	3 blastocistos maduros calidad 2 (transferibles), 1 mórula compacta calidad 3 (no transferible).
10B	6 Cuerpos lúteos normales.	5 Cuerpos lúteos normales.	5 blastocistos iniciales calidad 2 (transferibles), 2 blastocistos maduros calidad 3 (no transferibles).
11B	3 Cuerpos lúteos normales.	4 Cuerpos lúteos normales.	2 mórulas tempranas calidad 2 (transferibles), 3 mórulas compactas calidad 2 (transferibles).

CUADRO 3. Estadística descriptiva de los cuerpos lúteos normales de las donadoras de embriones.

Grupo de Donadoras Embriones	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
Embriones domésticos (n=5)	11.0 ^a	3.39	1.52	7	15
Embriones híbridos (n=5)	10.0 ^a	2.83	1.26	7	13

a, valores que comparten la misma literal no son significativamente diferentes (P>0.05).

CUADRO 4. Estadística descriptiva de los embriones recolectados.

Grupo de Donadoras Embriones	Promedio	Desviación estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo
Embriones domésticos (n=5)	8.40 ^a	2.29	1.25	6	13
Embriones híbridos (n=5)	4.40 ^b	1.34	0.60	3	6

a, b valores que no comparten la misma literal son significativamente diferentes (P<0.05).

CUADRO 5. Fertilidad en las receptoras de embriones domésticos o híbridos de Cimarrón.

Grupo de receptoras	FERTILIDAD (%)
Embriones domésticos	90.90% ^a
Embriones híbridos Cimarrón	36.36% ^b

a, b valores que no comparten la misma literal son significativamente diferentes (P<0.05).