



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

Vitrificación en embriones de caprino. “Revisión Bibliográfica”

**Tesis**

Que para obtener el título de  
**Médica Veterinaria Zootecnista**

Presenta:

Mara Arantxa González Blancarte

Asesor:

M. en C. Alan Olazábal Fenocho

Coasesor:

Dr. Víctor Manuel Díaz Sánchez



**UNAM**  
**CUAUTILÁN**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2023.



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.

# Contenido

<b>Abreviaturas</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	5
<b>Objetivo General.</b> .....	8
<b>Objetivos Particulares.</b> .....	8
<b>Generalidades de reproducción caprina.</b> .....	8
<b>Características reproductivas de la cabra y fotoperiodo.</b> .....	8
<b>Ciclo estral de la cabra.</b> .....	10
<b>Fecundación.</b> .....	15
<b>Desarrollo embrionario y gestación.</b> .....	17
<b>Control artificial del ciclo estral en caprinos.</b> .....	19
<b>Protocolos hormonales de control del ciclo estral.</b> .....	23
<b>Métodos de empadre utilizados en la actualidad.</b> .....	28
<b>Inseminación artificial.</b> .....	29
<b>Superovulación.</b> .....	31
<b>Obtención y conservación de embriones.</b> .....	33
<b>Vitrificación.</b> .....	44
<b>Antecedentes de la vitrificación embrionaria en medicina veterinaria.</b> .....	44
<b>Definición.</b> .....	45
<b>Ventajas y desventajas de la vitrificación.</b> .....	46
<b>Soluciones empleadas.</b> .....	47
<b>Situación actual de la vitrificación en embriones de caprino en México.</b> .....	53
<b>Conclusiones.</b> .....	55
<b>Bibliografía de figuras.</b> .....	55
<b>Bibliografía.</b> .....	56

## **Abreviaturas**

**E2:** Estrógenos

**P4:** Progesterona

**LH:** Luteinising Hormone / Hormona Luteinizante

**PBS:** Phosphate Buffered Saline / Buffer fosfato salino

**PGE2 $\alpha$  / 1:** Prostaglandina E 2 / 1

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**BSA:** Bovine Serum Albumin / Albúmina sérica bovina

**TCM-199:** Tissue culture medium 199 / Medio de cultivo tisular 199

**GDF-9:** Growth differentiation factor / Factor de diferenciación de crecimiento 9

**MMP9:** Metaloproteasa de matriz 9

**BCB:** Brilliant Cresyl Blue / Azul de cresilo brillante

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**$\mu$ l:** Microlitro

**ml:** Mililitro

**ng:** Nanogramo

**mg:** Miligramo

**G:** Glicerol

**EG:** Etilenglicol

**MEM:** Medio esencial mínimo

**RAA:** Reproducción animal asistida

**eCG:** Gonadotropina coriónica equina

**HAP:** Horse Anterior Pituitary Extract / Extracto hipofisiario equino

**UI:** Unidades internacionales

**CIDR:** Comercial Available Intravaginal Drug Releasing Device / Dispositivo de liberación de droga interna controlada

**GnRH:** Gonadotrophin Relasing Hormone / Hormona liberadora de gonadotropinas

**GalT-1:** Galactosiltransferasa 1

**PIBF:** Progesterone-induced Blocking Factor / Factor de bloqueo inducido por progesterona

**PG:** Propilenglicol

**IFNt:** Interferón tau

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**cGMP:** Guanosin -3', 5' monofosfato cíclico

**EGF:** Epitelial Growth Factor / Factor de crecimiento epitelial

**OPS:** Open Pulled Straw / Pipeta estirada abierta)

**SSV:** Solid Surface Vitrification / Vitricación en superficie sólida)

## **Resumen**

La reproducción en caprinos ha avanzado de manera lenta durante los últimos años al no tener una estandarización de las técnicas y tecnologías usadas en otras especies para la reproducción asistida. Como parte de estas tecnologías se encuentra la vitricación, una alternativa desarrollada para la crioconservación de los tejidos, en este caso embriones, que no ha sido estudiada a profundidad en esta especie. En la presente revisión bibliográfica se busca la manera de estandarizar la vitricación de embriones de caprinos a partir de los hallazgos obtenidos en otras especies, los pasos previos para obtener una adecuada recuperación de embriones, la preparación de los embriones (*in vivo o in vitro*), la cantidad y concentración de soluciones necesarias en cada paso. Las cabras, al igual que otras especies, deben ser sincronizadas previamente para lograr obtener los embriones y transferirlos a la receptora en el momento adecuado, siendo el CIDR la mejor opción para este propósito. Los embriones deben ser recuperados entre el octavo o noveno día después del retiro del dispositivo de control del ciclo estral, cuando se encuentran como mórula compacta o blastocisto temprano, y una vez recuperados los embriones se pueden transferir en un máximo de 2 horas a la hembra receptora o bien, conservar en medios como TCM-199 enriquecidos ácido ascórbico o SFB para evitar la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) e insulina y ácido ascórbico como enriquecimiento extra para una correcta conservación celular y una correcta implantación. La fase de equilibrio es un paso

sumamente importante, en el que es fundamental la temperatura y la concentración creciente de soluciones que se utilizarán después como vitrificantes. La solución vitrificante debe estar compuesta por crioprotectores permeables, impermeables y de bajo y alto peso molecular de manera que suceda menor embriotoxicidad y haya el intercambio adecuado entre el medio intra y extra celular.

Las tasas de desarrollo post vitrificación en los embriones son satisfactorias cuando se emplea un lazo de nylon o cryoloop, al observarse menor cantidad de criodaño en las membranas debido al enfriamiento uniforme de las paredes de los dispositivos. Es necesario realizar más investigaciones que ayuden a concretar la concentración adecuada de crioprotectores para el desarrollo y supervivencia del embrión post-implantación en la hembra receptora.

### **Introducción.**

La reproducción animal se ha posicionado como una de las ramas más fuertes de la medicina veterinaria. En la última década la reproducción animal asistida (RAA) ha brindado un mayor control sobre los procesos productivos, así como la mejora de las características fenotípicas y genotípicas en los animales, uniformidad en las canales, así como calidad superior en los productos animales gracias a la selección de características que contribuyen de manera positiva en éstas (Madrid, 4).

La RAA nació en el medio oriente, luego de que unos ladrones colocaran una gasa dentro de la vagina de una yegua en estro, dejando que un equino de raza pura eyaculara, para después recuperar la gasa y colocarla en el interior de una yegua con mayor calidad genética (Sánchez *et al.*, 2011). De manera documentada se tiene como primera referencia a Lázaro Spallanzani en 1795, tras realizar una inseminación artificial en caninos colocando semen en la vagina de la hembra, logrando el nacimiento de crías viables (Sánchez *et al.*, 2011; Barcat, 2009). Técnicas modernas de RAA como la criopreservación de embriones para su posterior transferencia, superovulación, fertilización *in vitro*, clonación, sincronización de celos y la inseminación artificial, son

ampliamente utilizadas en la medicina veterinaria, con resultados favorables en la producción animal. El uso de estas tecnologías significa también una gran cantidad de ventajas; por ejemplo, en la investigación, donde las únicas variables son las modificadas por el investigador y no las dadas por variabilidad genética. En bovinos se ha observado un menor intervalo generacional en comparación con otras especies animales, al ser posible rescatar ovocitos de hembras con 110 días de gestación sin causar daños en el feto y de esta manera seleccionar o conocer la calidad del semental (Madrid, 2014).

El tema central de esta revisión bibliográfica, la vitrificación, es un proceso físico utilizado para la solidificación de órganos, tejidos y embriones, en el cual se utilizan soluciones vitrificantes que al ser enfriadas no se cristalizan, pasando de un estado líquido a un estado sólido similar al vidrio. Es mayormente utilizada en la reproducción humana al no crear cristales en las estructuras citoplasmáticas, con lo que el éxito del desarrollo embrionario durante una gestación es mayor (Celestinos y Gatica, 2002).

Como todas las demás técnicas de RAA, la vitrificación ha sido adaptada y estudiada en los animales, sin embargo, el éxito y los costos pueden variar tomando en cuenta los alcances productivos que se buscan en cada especie y la importancia que se le da a la calidad genética de los individuos. Es importante que la vitrificación sea estudiada como una técnica que al mantener con mayor integridad los tejidos embrionarios, supone una buena relación costo-beneficio. En los caprinos la vitrificación significa aún costos elevados para el productor, además de necesitar personal especialmente capacitado en su realización, pero la difusión de sus beneficios puede tornar más frecuente su realización y la consecuente baja en el costo.

La vitrificación, el perfeccionamiento de la técnica y la búsqueda de la forma en que ésta pueda tener costos accesibles, son el paso que se necesita para tener mayor calidad en los productos derivados de los caprinos al tener a largo plazo hatos con mayor calidad genética en México.

La vitrificación de embriones ha sido estudiada en diversas especies domésticas: caprinos (Bosch *et al.*, 2006; Gibbons y Cueto, 2013; Cabrera *et al.*, 2006); ovinos (Gibbons y Cueto, 2013); bovinos (Gonella *et al.*, 2013; Mucci *et al.*, 2006; Ramírez y Bernal, 2012; Ruiz *et al.*, 2010 Cabrera *et al.*, 2006; Celestinos y Gatica, 2002) y humanos (Torres *et al.*, 2018).

### **Justificación**

La vitrificación es una técnica de uso reciente que ha mostrado buenos resultados en especies con mayor manejo reproductivo como bovinos y equinos en comparación con los caprinos, generando menor daño en las estructuras celulares en comparación con la congelación de los tejidos embrionarios durante el proceso de desvitrificación.

Si las estructuras celulares se conservan lo más íntegras posible, significa una mayor tasa de éxito en la implantación de los embriones en el útero de la hembra receptora, pero la información en caprinos no es suficiente para conocer las ventajas y desventajas del uso de ésta, por lo que es necesario conocer la manera en que puede llevarse a cabo en caprinos, conociendo las particularidades que han sido tomadas en cuenta en otras especies y los resultados en común para una recolección adecuada del embrión, así como las constantes utilizadas durante la vitrificación, siendo así una técnica reproductiva económica y segura para las hembras del hato con mayor potencial genético.

De igual manera, es importante mencionar que la transferencia embrionaria en las especies animales permite que exista una mejora en la calidad genética.



## **Objetivo General.**

Realizar una revisión bibliográfica sobre los métodos más recientes que han sido utilizados para la vitrificación de embriones en caprinos.

## **Objetivos Particulares.**

- Conocer las características reproductivas de la hembra caprina.
- Describir el proceso de fecundación, gestación y formación embrionaria en la hembra caprina.
- Comparar las ventajas y desventajas de las técnicas reproductivas de mayor uso en medicina veterinaria con la vitrificación.
- Describir las técnicas de vitrificación utilizadas en ovinos y caprinos.
- Describir la situación de la vitrificación en caprinos en México y la información acerca del perfeccionamiento de ésta.

## **Generalidades de reproducción caprina.**

### **Características reproductivas de la cabra y fotoperiodo.**

En las zonas templadas de México los caprinos muestran una actividad sexual poliéstrica estacional con ovulación espontánea, correspondiente a una disminución en la luz solar o acortamiento de las horas luz, comenzando en finales de verano y habiendo un incremento en otoño e invierno. El resto del año (finales de invierno a mediados de verano) se mantienen en anestro y con esto hay un cese momentáneo de actividad sexual hasta que las condiciones climáticas estimulen de nuevo al caprino (Duarte *et al.*, 2008).

La estimulación que dará comienzo a la época reproductiva está dada por los cambios lumínicos reconocidos por la retina (rodopsinas) la cual capta los fotones y las variaciones de luz, convirtiéndolas en impulsos nerviosos, a partir de la activación del guanosin monofosfato cíclico (GMP), el cual es un nucleósido con función de segundo mensajero en eventos mediados por hormonas (Murray, 2016), e induce la apertura de canales y la entrada de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup>. Estos impulsos nerviosos son llevados hacia el núcleo supraquiasmático por la vía retino-hipotalámica, para después llegar al núcleo paraventricular, a los ganglios cervicales superiores y finalmente a la glándula pineal donde el impulso nervioso se convierte en hormonal por la síntesis y secreción de melatonina. En especies cuyo ciclo reproductivo es estacional de días cortos o decrecientes, ocurre una secreción continua y elevada de esta hormona estimula la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que es una neurohormona formada por una cadena peptídica de 10 aminoácidos sintetizada en el hipotálamo (García, 2018; Correa y Fernández, 2017).

La melatonina es una indolamina anfipática, es decir que es soluble en agua y etanol. Se sintetiza en la glándula pineal, por los pinealocitos a partir del triptófano y es liberada hacia la circulación durante la noche. Esta hormona induce el sueño regulando el ciclo circadiano (Organización Panamericana de la Salud (PAHO), 1997). Los efectos del fotoperiodo en la cabra están mediados por la sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa del estradiol, observándose como cambios la amplitud y frecuencia de la secreción de hormona luteinizante (LH). Durante la época reproductiva el estradiol pierde la capacidad de inhibir la secreción de GnRH y LH hipotalámico. La adaptación del ciclo reproductivo a los cambios lumínicos se presenta como una respuesta adaptativa a los momentos en que hay una mayor disponibilidad de alimentos, así como las condiciones medioambientales óptimas para la supervivencia de las crías (Correa y Fernández, 2017).

En una hembra prepúber la influencia del fotoperiodo, la cantidad de leptina en el suero sanguíneo, la frecuencia de liberación de melatonina y factores nutricionales (concentraciones de glucosa e insulina) son señales para el inicio de la pubertad, la cual se define como la presencia de signos externos e internos de maduración sexual. La edad de presentación de la pubertad puede ser variable, dependiendo de factores como la raza, factores genéticos y el medio ambiente. La pubertad en la hembra se presenta como la capacidad de los ovarios de liberar óvulos. La madurez sexual se alcanza entre los 9 a 16 meses en cabras, observándose un desarrollo pleno y funcional de los órganos sexuales (Hafez y Hafez, 2000).

Se ha observado que la insulina favorece la secreción de gonadotropinas al estimular el desarrollo folicular, además de tener efectos sobre el eje hipotalámico hipofisiario gonadal. Un aumento de esta hormona resulta en un aumento de proteínas transportadoras de glucosa 1 y 4, con lo cual, las células de la teca y la granulosa pueden aumentar la captación de glucosa (Gibbons y Cueto, 2013; Pastrana *et al.*, 2008).

### **Ciclo estral de la cabra.**

El ciclo estral se define como el periodo entre dos ovulaciones subsecuentes. Los caprinos presentan un ciclo estral de 17 a 25 días con un promedio de 21 días, el cual está formado por 2 fases: la fase folicular de 3-4 días constituida por proestro (3 días) y estro (24-48 horas), la fase luteínica de 17 días constituida por metaestro (4 días) y diestro (12-19 días) (Hafez y Hafez, 2000). La cabra está caracterizada por tener de dos a tres ondas foliculares por ciclo estral (Hafez y Hafez, 2000). La foliculogénesis es el proceso por el cual un folículo crece y madura debido a sus características y a la facultad de responder a los niveles de hormonas. La foliculogénesis se encuentra dividida en tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007).

Desde el desarrollo uterino, en los embriones femeninos los folículos primordiales germinales se establecen en las crestas germinales que dan lugar a los ovarios, de esta manera, la hembra tiene la cantidad de ovocitos que serán ovulados durante toda su vida, quedando así una cantidad lista llamada reserva ovárica (García, 2018). La cantidad de ovocitos liberados en cada onda puede variar dependiendo de factores como: estado nutricional (epigenética), peso y tamaño de los ovarios y cantidad de ovocitos morfológicamente sanos (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007).

- **Reclutamiento:** Se puede dividir en dos fases: inicial y cíclico.

El reclutamiento inicial se lleva a cabo antes de la pubertad y después de la formación del folículo. Se ha demostrado que la hormona inhibidora de los conductos de Müller es uno de los factores que regulan la activación folicular. También se ha observado que la comunicación entre células de la granulosa y el ovocito son clave para el crecimiento del folículo (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007)

El reclutamiento cíclico tiene inicio después de la pubertad y comienza cuando una cantidad de folículos son liberados, presentando todos receptores para LH, así como la producción de estrógenos e inhibina. Sólo un número pequeño de estos sobreviven, los demás sufren atresia (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007)

- **Selección.**

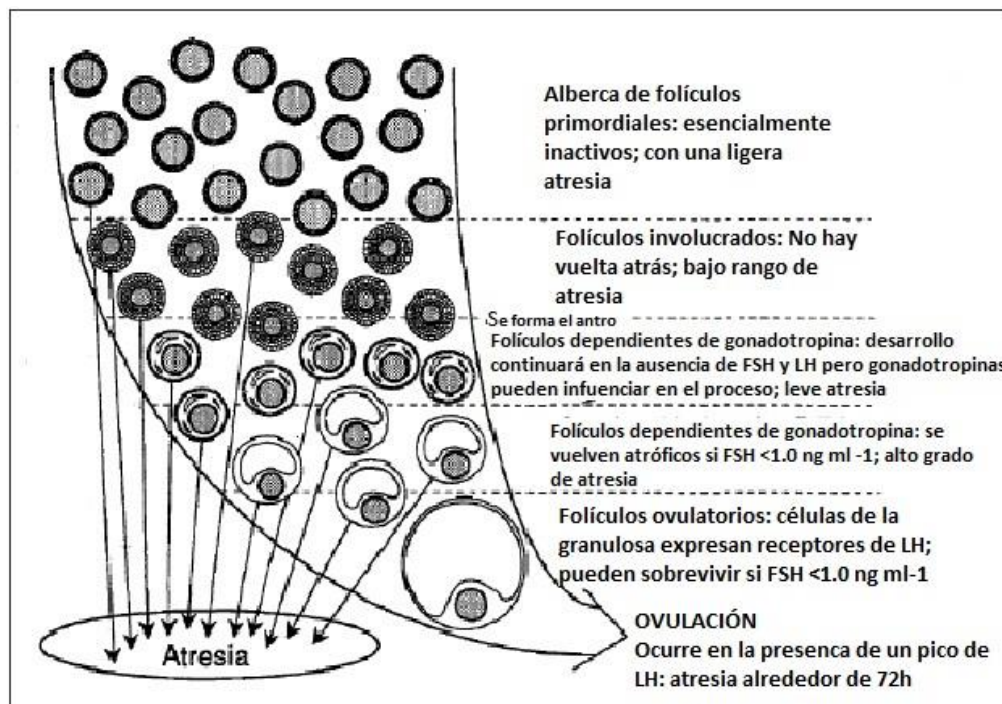
Ocurre una vez que la cantidad de hormona folículo estimulante (FSH) disminuye a la par de la progesterona (P4), observándose en los folículos la involución de receptores para FSH, siendo los que presenten receptores para LH los que seguirán su desarrollo (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007)

- **Dominancia.**

En esta etapa sólo quedan los folículos listos para ser ovulados dadas las concentraciones óptimas de progesterona y estrógenos, y las consecuentes rupturas de los folículos dominantes. En caso de

que no se encuentren las concentraciones óptimas de progesterona y estrógenos, se comienza una nueva oleada folicular (González y Ninoska, 1993). El folículo seleccionado secreta una cantidad mayor de estrógenos, activando una retroalimentación positiva para LH, además de secretar inhibina que disminuye la cantidad de FSH (García, 2018).

Cabe mencionar que la FSH es la hormona encargada del crecimiento folicular, mientras que la LH es la encargada del desarrollo de éste (Figura 1).



**Figura 1.** Dinámica folicular en el ovario (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

Los eventos antes mencionados ocurren de manera periódica en los ovarios. Durante cada oleada folicular tienen lugar cambios hormonales, pudiéndose dividir en etapas del ciclo estral. En cada etapa el animal muestra a su vez cambios en el aparato reproductor y de esta manera el médico puede distinguir entre cada una.

- **Proestro:**

En este estadio el ovario presenta atresia del folículo del ciclo estral anterior, junto con el crecimiento folicular debido a un aumento de la FSH y estrógenos. La vulva se encuentra

edematosa y puede presentar mucosidad cristalina. En esta etapa la hembra no se muestra receptiva al macho (García, 2018).

- **Estro.**

La hembra presenta receptividad sexual en la etapa de mayor cantidad de desarrollo folicular, junto con aumento de la actividad física, dilatación de la vagina y se puede encontrar hiperémica, edema vulvar con mucosidad cristalina y viscosa. Los cuernos uterinos aumentan de tono muscular y a nivel ovárico hay presencia de uno o varios folículos maduros. La hembra llama al macho y se deja montar (Hafez y Hafez, 2000).

Durante la última etapa del estro ocurre la maduración folicular (12 a 36 horas después de iniciado este) (García, 2018), con el marcado incremento del tamaño del antro folicular cuyo interior se encuentra ocupado por estradiol en su mayoría, lo que lleva a una frecuente liberación de GnRH, la cual facilita la secreción de LH. Altos niveles de estradiol estimulan la síntesis de GnRH en el hipotálamo. La ovulación ocurre cuando hay un aumento súbito de gonadotropinas y ocurre el pico preovulatorio de LH ocasionando la ruptura del folículo ovárico al final del estro. Una vez que el folículo maduro se rompe, libera estrógenos almacenados en el antro folicular, los cuales son responsables de una retroalimentación negativa en el hipotálamo. Además, la amplitud y la frecuencia de pulsos de estrógeno se ven aumentados por la ausencia de progesterona (Recabarren *et al.*, 2006).

- **Metaestro:**

A nivel de ovario se encuentra la presencia del cuerpo lúteo que secreta progesterona, inhibiendo la producción de FSH y LH. Si ocurre la fertilización, a partir del reconocimiento fetal por presencia de células del trofoblasto encontradas a partir del día 14 post estro, el cuerpo lúteo permanece durante toda la gestación, continuando con la secreción de progesterona previniendo

así la formación de un nuevo folículo(s) dominante(s). A su vez, comienza el reclutamiento de folículos no dependientes de gonadotropinas (García, 2018).

- **Diestro:**

El diestro es la etapa más larga del ciclo estral. Si la cabra no queda preñada comienza la luteólisis por acción de la prostaglandina  $PGF2\alpha$ , culminando así esta. También comienza la atresia folicular y se reinicia el reclutamiento de ovocitos. Se observa una alta cantidad de progesterona estando esta en su punto máximo (60 ng/ml) (García, 2018).

- **Anestro:**

No es considerado una etapa del ciclo estral, sin embargo, es un periodo donde no ocurre actividad sexual. Coincide con el aumento de las horas luz y/o con el amamantamiento de las crías (Delgadillo *et al.*, 2012).

El anestro puede ser estacional y lactacional:

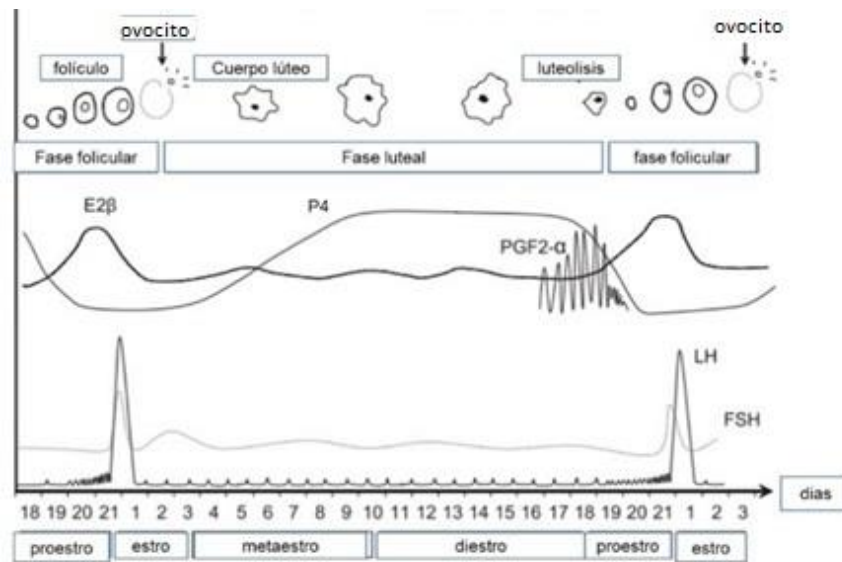
- Estacional:

Se encuentra inducido por producción de dopamina, siendo inversamente proporcional a la producción de melatonina en relación al fotoperiodo (Urviola y Riveros, 2017). Se ha observado que al someter al caprino a un cambio de latitud de templado a tropical se observa un inicio más temprano de la época reproductiva y un anestro más corto. Por ejemplo, en la región sur de México el anestro se presenta desde marzo a julio, habiendo poca actividad sexual de enero a mayo (Carrillo *et al.*, 2010).

- Lactacional:

Ocurre después del parto y se ve influida por la succión de leche por parte de la cría, aumentando la cantidad de prolactina y disminuyendo la cantidad de LH, evitándose de esta manera el desarrollo de folículos y consecuente ovulación. La liberación de prolactina reduce la secreción folicular de estradiol (García, 2018).

Los estadios antes mencionados se pueden observar de manera gráfica en la figura 2.



**Figura 2.** Esquema de la fluctuación hormonal y desarrollo de las estructuras ováricas durante el ciclo estral (Fatet *et al.*, 2011).

### **Fecundación.**

La fecundación (también llamada fertilización) está constituida por una serie de transformaciones celulares de ambos gametos: el ovocito y el espermatozoide, para obtener una la cantidad de cromosomas necesarios para la formación de un nuevo organismo. Para que este evento ocurra se necesita de la ovulación previa y posterior eyaculación, pudiendo dividirse en tres eventos críticos: Migración espermática entre las células de la zona pelúcida, adhesión y migración a través de la corona radiada y fusión de las membranas espermáticas y del óvulo (Hafez y Hafez, 2000).

La eyaculación se lleva a cabo en la vagina y a partir de este punto se hace una regulación de la cantidad de espermatozoides a partir de movimientos lentos de éstos hacia el útero, cuernos uterinos y oviductos. Una vez que los espermatozoides se encuentran en la ampolla del oviducto, aumenta la posibilidad de unirse al ovocito (Hafez y Hafez, 2000). El espermatozoide se abre paso entre la zona pelúcida y la corona radiada por movimiento hiperactivado y por acción enzimática. Se ha demostrado que la proteína Hyal5 presente en la membrana acrosomal del espermatozoide



permite la penetración de los estos a través del cúmulo ovífero con la digestión del ácido hialurónico que rodea el ovocito, además de que la progesterona secretada por las células y el fluido folicular son factores importantes para la exocitosis acrosomal. Al llegar a la zona pelúcida se fija al ovocito por medio de las glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 encontradas en la zona pelúcida mediante la proteína SED1 y la galactosiltransferasa (GalT-1) encontradas en la región acrosomal del espermatozoide, siendo estos receptores de glicoproteínas específicas los que evitan que más espermatozoides se fijen. En los siguientes 5 a 15 minutos posteriores a la fijación ocurre la activación del acrosoma o reacción acrosómica y la liberación de enzimas alojadas en el acrosoma, tales como hialuronidasa, acrosina, proteinasa, neuraminidasa, fosfatasa, colagenasa, fosfolipasa que le ayudan a abrirse paso entre las células de la zona pelúcida del ovocito. La reacción acrosomal es clave para el paso de los espermatozoides hacia el ovocito. No puede haber fusión con el ovocito si éstos no han pasado por la reacción acrosomal (Hafez y Hafez, 2000; Cánovas y Coy 2008; Castañeda, 2009).

Cuando el espermatozoide ha logrado introducirse entre la zona pelúcida y la corona radiada ocurre la fusión de las membranas con la ayuda de las proteínas PH20 y PH30, funcionando como zonas de unión al ovocito. La unión entre gametos puede dividirse en dos etapas: Adhesión de membranas y fusión (Cánovas y Coy 2008).

- **Adhesión de membranas.**

Es el reconocimiento de las membranas. Está mediado por uniones proteína-proteína o uniones proteína-carbohidrato (García, 2018).

- **Fusión.**

Ocurren interacciones proteína-lípido o proteína-proteína entre las membranas del espermatozoide y el ovocito, induciendo un cambio de conformación irreversible. Se lleva a cabo en la región post acrosomal del espermatozoide y en las microvellosidades del ovocito. El material conservado

dentro de la membrana espermática se introduce y se lleva a cabo la descondensación del núcleo del espermatozoide. Una vez que hay interacción entre ovocito y espermatozoide la polispermia se bloquea mediante la reacción cortical, que consiste en un aumento de  $Ca^{++}$  en el ovocito y la inhibición en la liberación de enzimas que lo hacen permeable a otros espermatozoides a partir de ZP2 (García, 2018).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula encontrada en cada una de las células que conforman el organismo. Contiene y transfiere información genética de una generación a la siguiente y se encuentra en su forma ordenada empaquetada con histonas y varias proteínas más en estructuras llamadas cromosomas. Una vez que ocurre la espermiogénesis, las histonas son sustituidas por otras proteínas más simples encargadas, de igual manera, de la condensación del ADN por fosforilación de este con las protaminas. Estas proteínas desaparecerán antes de que lleguen al epidídimo (Hafez y Hafez, 2000; Brewer et al., 2002; Teijón et al., 2006). Normalmente el ADN del espermatozoide se encuentra sin orden y sin empaquetar con las histonas, siendo llamada esta forma cromatina. Al fusionarse los gametos femeninos y masculinos (singamia) se produce un cigoto (García, 2018).

Cada uno de los gametos (ovocito y espermatozoide) contiene un número haploide de cromosomas, que, durante la formación del cigoto, formarán un diploide que tendrá los cromosomas de ambos, que en el caso de las cabras tienen 60 cromosomas (Hafez y Hafez, 2000).

### **Desarrollo embrionario y gestación.**

El desarrollo embrionario es un periodo en el que el cigoto comienza a tener control del desarrollo y un genoma diploide es formado después de la descondensación del genoma del macho (Hafez y Hafez, 2000).

El cigoto comienza una serie de divisiones celulares dentro de una vesícula llena de líquido. Durante la división celular ocurre una primera división, de la cual se originarán dos blastómeros dentro de la zona pelúcida del cigoto que a su vez está embebido en secreciones del endometrio. Al término de la formación de estos dos blastómeros ocurre la segunda división que originará 4 blastómeros y así consecutivamente hasta tener 16, que en conjunto reciben el nombre de mórula (Hafez y Hafez, 2000; Eurel y Frappier, 2006).

Una vez que esta ha alcanzado alrededor de 64 blastómeros, comienza el proceso de cavitación en el cual ocurre la formación del blastocele gracias a la ganancia de iones y líquido. De este proceso se originará el blastocisto, una estructura embrionaria que se diferencia en dos tipos celulares: células trofoblásticas y el embrioblasto. El blastocele irá aumentando de tamaño hasta romper la zona pelúcida, ocurriendo así la implantación mediada por una serie de interacciones entre el embrión y el útero, hormonas esteroideas y el incremento del porcentaje linfocitario que expresan el gen que codifica el Factor de Bloqueo Inducido por Progesterona (PIBF), el cual inhibe la actividad de los linfocitos NK (Hafez y Hafez, 2000; Carillo *et al.*, 2014).

La masa celular interna del blastocisto se diferencia en tres diferentes capas germinales que formarán el embrión: ectodermo, endodermo y mesodermo (Eurell y Frappier, 2006).

El reconocimiento materno de la gestación es un periodo en el que el embrión indica su presencia a la madre. Esto ocurre por la secreción en grandes cantidades de interferón tau (IFNt), sintetizadas por las células del trofoblasto en rumiantes alrededor del día 14 postestro y antes de la implantación. El propósito de este interferón es evitar la regresión del cuerpo lúteo, inhibe la expresión de receptores de estrógenos y oxitocina y la liberación de PGF2 $\alpha$  (Quites *et al.*, 2011). Una pérdida embrionaria temprana puede estar relacionada a una inadecuada respuesta del endometrio al IFNt o una baja síntesis por parte del embrión (Carrillo *et al.*, 2010).

El embrión necesitará, conforme avance la gestación, de mayor cantidad de nutrientes, por lo que desarrolla membranas que lo mantendrán unido al endometrio llamadas placenta, siendo un órgano que establece una relación estrecha entre la circulación materna y fetal (Eurell y Frappier, 2006).

En las cabras la gestación dura cinco meses aproximadamente (147-155 días). La duración se puede ver regulada por factores como la raza, fin zootécnico, sexo del feto y número de fetos, entre otros (García, 2018).

Durante la gestación el cuerpo lúteo producirá la cantidad de progesterona necesaria para mantenerla a término (Hafez y Hafez, 2000).

### **Control artificial del ciclo estral en caprinos.**

Una cabra en condiciones naturales tendrá una gestación al año, sin embargo, la tecnificación en su producción necesita en muchas ocasiones más de una gestación por año, siendo necesario el uso de la RAA durante el anestro. Se debe realizar un control del ciclo estral para poder realizar la inseminación artificial en el momento óptimo (Hafez y Hafez, 2000).

Se puede categorizar el control del ciclo estral de acuerdo al estado fisiológico en el que se encuentre el hato, por ejemplo: inducción al estro (cuando las hembras se encuentran en anestro) y como método de sincronización del estro (cuando el inicio del estro en las hembras ha sido desfasado), pudiéndose dividir en hormonales y no hormonales (Álvarez y Ducoing 2006).

El control del ciclo estral en cabras con hormonas se puede realizar mediante el uso de análogos de progesterona, gonadotropinas y prostaglandinas, siendo posible inducir el estro en la mayoría de las hembras al mismo tiempo. El médico veterinario puede ofrecer productos de acuerdo a la demanda del mercado, ajustar el periodo de partos de acuerdo a la época en que se encuentre una mayor disponibilidad de alimentos y disminuir el periodo entre partos. Así, la mayoría de los

métodos de sincronización en cabras tienen una duración de 7 a 18 días (Hafez y Hafez, 2000; Hernández *et al.*, 2015) (Tabla 1).

Existen además dos grupos de control del ciclo estral hormonal a partir de los compuestos administrados: Los que inhiben la secreción de LH y los que disminuyen el tiempo de permanencia del cuerpo lúteo en el ovario. Éstos pueden consistir en el uso de progestágenos por un periodo largo y la consecuente retroalimentación negativa de LH o por una luteólisis prematura mediante el uso de estradiol para la estimulación de PGF2 $\alpha$  o análogos de PGF2 $\alpha$ , ocurriendo el inicio del estro y ovulación los siguientes 2 a 3 días después de la aplicación de éstos. El uso de progesterona y gonadotropina coriónica equina (eCG) tiene mayor ventaja sobre el uso de PGF2 $\alpha$  al poder sincronizar tanto hembras en anestro como hembras ciclando (Hafez y Hafez, 2000).

Actualmente se encuentran en el mercado varios dispositivos impregnados en hormonas, listos para utilizarse de acuerdo al calendario de sincronización que el médico utilice. A continuación, describen los de mayor uso, así como recomendaciones de uso.

- **Esponjas intravaginales.**

Se trata de dispositivos de espuma de alta densidad impregnadas con progestágenos sintéticos que prolongan la fase lútea y son colocadas en la vagina, en contacto con el cérvix. Entre los activos más empleados se encuentran el acetato de fluorogestona y el acetato de medroxiprogesterona, impregnados en esponjas que se introducen en la vagina durante 9 a 19 días si la esponja contiene acetato de fluorogestona, o 9 a 14 días si contiene acetato de medroxiprogesterona; se tiene una permanencia media de 14 días dentro del tracto vaginal. El uso de la esponja puede ir asociada a eCG intramuscular (100 UI en cabras lecheras jóvenes, hasta 600 UI en cabras adultas lactantes) (Álvarez y Ducoing 2006; Pérez *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2012; Manes y Ungerfeld, 2015). Se ha observado que la medroxiprogesterona en asociación con la eCG reduce la incidencia de cabras con ciclos estrales cortos, lo que da mayor oportunidad para que la cabra quede gestante (Pérez *et*

*al.*, 2012). Cuando las hembras están ciclando se puede utilizar una dosis de PGF2 $\alpha$  para asegurar la luteólisis y eCG al momento del retiro de la esponja para sincronizar la ovulación y aumentar la tasa de ovulación (Manes y Ungerfeld, 2015).

La desventaja del uso de esponjas intravaginales es que la fertilidad de estos tratamientos es más baja que en una ovulación espontánea, lo cual puede deberse a cambios en la microbiota, citología e histología de la vagina. La esponja puede causar una vaginitis al absorber constantemente secreciones vaginales aunado a un aumento de mucus debido a una reacción inflamatoria, con lo que hay un aumento en el número de microorganismos, siendo las bacterias Gram (-) las que tienen mayor crecimiento (*Arcanobacterium pyogenes*, principalmente). A su vez hay un aumento de leucocitos que pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides (Manes y Ungerfeld, 2015). Para evitar que esto ocurra pueden emplearse antibióticos junto con las esponjas, siendo la amoxicilina, ampicilina y estreptomicina los que tuvieron mejores resultados en la prevención de la vaginitis (Manes *et al.*, 2013).

- **Dispositivo de liberación de droga interna controlada (CIDR).**

El CIDR es un implante de silicón con forma de T que contiene 1.9 g de progesterona, con una liberación de 80 a 100 mg por día. Tiene efecto como bloqueador de la ovulación a partir de la progesterona, que desaparece una vez que se retira el implante después de 12 a 14 días (Álvarez, y Ducoing, 2006). Una práctica común es el uso de un CIDR más la administración de eCG, la cual estimula el crecimiento folicular y aumenta la cantidad de progesterona plasmática después de la ovulación. Al administrarse en animales que serán sincronizados con CIDR, la eCG dará un estímulo extra para el correcto crecimiento folicular sobre todo en animales cuya condición corporal sea baja. El porcentaje de concepción es cercano al 100% (Hernández *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2012).

Este método de sincronización tiene un costo más elevado en comparación con las esponjas intravaginales, sin embargo, se ha observado en el trópico seco que después de su uso suprimen aún el estro un ciclo más cuando se usa por 7 días, a pesar de que los fabricantes recomiendan su uso una sola vez, siendo el método de desinfección utilizado la autoclave a 121°C por 20 minutos (Cuicas *et al.*, 2018). En comparación con las esponjas el CIDR no genera vaginitis ni adherencias, además de que la introducción y remoción son menos traumáticas para la cabra (Álvarez y Ducoing, 2006).

- **Modificación de horas luz.**

El fotoperiodo puede ser manipulado para lograr la inducción al ciclo estral. Se basa en la alternancia de días largos y días cortos y consiste en colocar a las hembras en corrales que se encuentren cubiertos, de tal manera que no pueda ingresar luz y se pueda controlar su ingreso. Lo más común es dar 1 a 2 meses de días largos (con más horas luz), seguido de 1 a 2 meses de días cortos (con menos horas luz), teniendo como mínimo 200 lux a la altura de los ojos del animal (Delgadillo *et al.*, 2012).

A pesar de que es una técnica que ha dado buenos resultados en la inducción a la ciclicidad, la poca o nula entrada de aire y luz solar puede ser un predisponente a enfermedades en patas, vías respiratorias y parasitosis (Álvarez y Ducoing, 2006).

- **Efecto macho.**

Con el efecto macho, las hembras anéstricas ovulan después de un periodo de exposición a machos sexualmente activos, ya sea vasectomizados, epidectomizados o intactos. La producción de pulsos de LH tónicos son influidos por la relación social con los machos y la estimulación por las feromonas que, aunque no está clara la forma en que funcionan, es probable que inhiban la retroalimentación negativa del estradiol, lo que a su vez permite que la LH sea secretada con mayor frecuencia para ocasionar el pico de LH y la consecuente ovulación. Es importante que hembras y

machos se encuentren en corrales o cubículos alejados entre sí para que el efecto se logre. Se necesita una proporción de 1:100 en relación a las cabras que serán estimuladas para asegurar el efecto (Hafez y Hafez 2000; Álvarez y Ducoing, 2006).

El efecto macho puede iniciarse entre 4 a 6 semanas antes de la estación reproductiva para inducir la ovulación en tres cuartas partes del hato, siendo las hembras dominantes las primeras en responder y de esta manera influir sobre el resto del hato (efecto hembra). Debe realizarse el proceso entre machos y hembras por al menos 13 días, las 24 horas del día (Delgadillo *et al.*, 2012; Álvarez y Ducoing, 2006).

A pesar de que los métodos en los que son usadas hormonas son más efectivos en comparación con métodos sin uso de hormonas externas, muchas veces el productor no tiene los recursos económicos para hacer uso de éstos, por lo que el efecto macho es una alternativa con un menor costo. De igual manera se puede realizar un control del ciclo estral mediante el uso combinado de efecto macho e inductores-sincronizadores para evitar fallas y de esta manera se hable de un sólo gasto para la compra de los tratamientos hormonales. Por ejemplo, este método también es utilizado por periodos cortos para generar mayor homogeneidad durante el uso de análogos de  $PGF2\alpha$  (Gómez *et al.*, 2016), en combinación con progestágenos se puede hacer sustitución de la eCG con el efecto macho (Álvarez y Ducoing, 2006).

### **Protocolos hormonales de control del ciclo estral.**

Los protocolos son estructurados para controlar el ciclo estral a partir del conocimiento de las hormonas predominantes en cada fase. Imitan la función lútea, ocasionan lisis del cuerpo lúteo e inhiben la liberación de GnRH mediante la administración de progesterona natural y sintética que deben colocarse en periodos similares a los del diestro. En esta revisión literaria se mencionan



mayormente calendarios de sincronización del autor *Lozano et al (2012)*, cuyo trabajo se encuentra enfocado en ovinos.

- **Progesterona + Prostaglandinas.**

Se pueden utilizar esponjas intravaginales, o CIDR de progestágeno, aunque las esponjas tienen menor éxito que el CIDR en la inducción al estro. Es importante mencionar que para la administración de PGF2 $\alpha$  se debe realizar un ultrasonido con el fin de buscar estructuras fetales previamente para evitar un aborto. Si se tiene la certeza de que la hembra no se encuentra gestante se procede a la administración de prostaglandina vía intramuscular en una dosis de 0.12-30  $\mu$ g por hembra tratada. La esponja debe ser cubierta previamente con algún antibiótico y se debe hacer uso de guantes estériles para su colocación, ya que puede ser absorbido por medio de la piel y resultar peligroso para el médico. El dispositivo intravaginal permanecerá por 8 días, siendo el día 0 el de la colocación (*Lozano et al., 2012*).

Después de la inserción del dispositivo o durante su retiro se aplica intramuscularmente prostaglandina en dosis de 0.12-30  $\mu$ g con lo que se espera que se presente el estro en las próximas 36 a 48 horas. Es importante mencionar que la tasa de concepción por medio de inseminación artificial es más baja cuando se utilizan prostaglandinas (*Hafez y Hafez, 2000*).

Este protocolo es considerado como el de menor fertilidad ligada a la vaginitis que pueden ocasionar los dispositivos, por lo que se recurre a protocolos con menor duración (*Lozano et al., 2012*).

- **Progesterona + eCG**

Este protocolo reduce el intervalo entre el estro y la ovulación. Se pueden utilizar dispositivos intravaginales o esponjas intravaginales y la posterior administración de 100 a 600 UI de eCG vía intramuscular dos días antes del retiro o durante el retiro en dosis única para fomentar el aumento de la tasa de ovulación, alta tasa de fertilidad y mayor cantidad de gestaciones múltiples. La dosis

de eCG varía en relación a la raza, el peso del animal, época del año, efecto macho o factores ambientales (Lozano *et al.*, 2012). La eCG no puede ser utilizada sola o recurrentemente, ya que existe la posibilidad de que la cabra desarrolle anticuerpos anti-eCG, lo que se traduce en estros tardíos, por lo que se recomienda hacer rotación de protocolos de control del ciclo estral, además de que se ha observado que a la larga hay una mayor incidencia de folículos anovulatorios (Olivera *et al.*, 2011).

- **Progesterona + Prostaglandina + eCG**

La progesterona será liberada por una esponja o CIDR. Una vez cumplido el tiempo de permanencia se colocan 48 horas antes del retiro de los dispositivos, en dosis únicas 100 a 600 UI de eCG y 10 mg de prostaglandinas intramuscularmente para lograr una mayor tasa de ovulación y la ruptura del folículo de Graaf (Lozano *et al.*, 2012).

- **Progesterona + GnRH + Prostaglandina + eCG**

El dispositivo para el control del ciclo estral se coloca y a su vez una dosis de GnRH o análogos en dosis de 10 mg vía intramuscular con la intención de reiniciar el ciclo folicular. Una vez que se retira el dispositivo, dependiendo del que se trate, se colocan prostaglandinas en dosis de 10 mg vía intramuscular, las cuales darán paso a la ovulación del folículo dominante y 48 horas posteriores se aplica eCG a dosis de 400 UI vía intramuscular. Una vez aplicada la eCG se espera que el estro se presente en las 48 horas posteriores, pudiéndose realizar la inseminación artificial 10-17 horas después de la aplicación de la eCG. Cabe mencionar que la GnRH tiene una menor acción en comparación con el estradiol (10% menor), sin embargo, su efecto es casi inmediato. Se puede utilizar cipionato de estradiol o benzoato de estradiol en lugar de GnRH, pero el efecto después de su aplicación tarda aproximadamente 48 horas tras la metabolización (Lozano *et al.*, 2012).

- **GnRH + Prostaglandina + GnRH**

Se aplica vía intramuscular 10 mg de GnRH para el reinicio del ciclo folicular, 5 días después se coloca vía intramuscular 0.29 mg de prostaglandinas con el fin de ovular el folículo dominante y por último una dosis de 10 mg de GnRH vía intramuscular 2 días posteriores a la aplicación de las prostaglandinas. Con este protocolo es posible realizar una inseminación artificial a tiempo fijo, es decir, la predicción del ciclo estral con la subsecuente inseminación 10 a 14 horas después de la última dosis de GnRH (Lozano *et al.*, 2012).

<b>Método</b>	<b>Marca</b>	<b>Tiempo de permanencia</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Referencias</b>
Esponja intravaginal.	Chronogest® MSD Salud Animal (acetato de flurogestona).	11 días.	Una sola aplicación Mantienen 1/3 de su efectividad tras el primer uso.	Cambio de microbiota y citología vaginal. Vaginitis ( <i>Arcanobacterium pyogenes</i> ).	<a href="https://www.msd-salud-animal.mx/productos/chronogest-cr-entus-ovejas/">https://www.msd-salud-animal.mx/productos/chronogest-cr-entus-ovejas/</a>
	Serigan Esponjas vaginales® Internacional Prode (Acetato de medroxiprogesterona).	12-14 días.			<a href="https://interpretode.com/producto/serigan-esponjas-vaginales/">https://interpretode.com/producto/serigan-esponjas-vaginales/</a>
Dispositivo vaginal.	CIDR 330 Sheep and Goat Insert® Zoetis (progesterona).	12-14 días.	Se puede volver a utilizar con el cuidado debido (50% efectividad). Una sola aplicación.	Costo elevado.	<a href="https://www2.zoetis.mx/content/es/pages/productos-y-soluciones/Ganaderia/PDFs/GA_FT_2022_CIDR_330_zLVb4Z.pdf">https://www2.zoetis.mx/content/es/pages/productos-y-soluciones/Ganaderia/PDFs/GA_FT_2022_CIDR_330_zLVb4Z.pdf</a>
	DibActive® Virbac (progesterona).	8 días.			<a href="https://mx.virbac.com/products/inseminacion-a-tiempo-">https://mx.virbac.com/products/inseminacion-a-tiempo-</a>

					<a href="#">fijo/dibactive-600</a>
Fotoluminiscencia .		1-2 meses dar días largos 1-2 meses dar días cortos.	Bajo costo. Natural.	Enfermedades respiratorias, podales y parasitarias.	<a href="https://www.edalyc.org/pdf/939/93924484002.pdf">https://www.edalyc.org/pdf/939/93924484002.pdf</a>
Efecto macho.		13 días; 4-6 semanas antes de la estación reproductiva.	Natural Usado para dar uniformidad antes del uso de hormonas.	Compra y mantenimiento del macho, mayor número de corrales.	Álvarez, L, Ducoing, A.E. (2006).
GnRH (análogos).	Fertagyl® MSD Salud Animal (acetato de gonadorelina).	Dependiendo del tipo de protocolo a seguir será la cantidad de aplicaciones.			<a href="https://www.msdsalud-animal.mx/ofload-downloads/fertagyl-ficha-tecnica/">https://www.msdsalud-animal.mx/ofload-downloads/fertagyl-ficha-tecnica/</a>
	Conceptal®MSD Salud Animal (acetato de buserelina).				<a href="https://www.msdsalud-animal.mx/productos/conceptal-vacuna/">https://www.msdsalud-animal.mx/productos/conceptal-vacuna/</a>
Prostaglandinas.	Lutalyse® Zoetis (dinoprost trometamina).				<a href="https://www.zoetis.mx/products/porcino/lutalyse.aspx">https://www.zoetis.mx/products/porcino/lutalyse.aspx</a>
	Celosil® MSD Salud Animal (cloprostenol sódico).				<a href="https://www.msdsalud-animal.mx/productos/celosil-solucion-inyectable/">https://www.msdsalud-animal.mx/productos/celosil-solucion-inyectable/</a>
Gonadotropina Coriónica Equina.	GonActive® Virbac (Gonadotropina sérica de yegua preñada).				<a href="https://mx.virbac.com/products/inseminacion-a-tiempo-fijo/gonactive-ecg">https://mx.virbac.com/products/inseminacion-a-tiempo-fijo/gonactive-ecg</a>
	Folligon® MSD Salud Animal (PMSG, gonadotropina sérica de yegua preñada).				Ramírez <i>et al</i> (2001).

**Tabla 1.** Métodos de sincronización con mayor uso en caprinos, así como algunas marcas comerciales, tiempo de uso, ventajas y desventajas de uso.

### **Métodos de empadre utilizados en la actualidad.**

El empadre es el proceso de apareamiento y fecundación en un rebaño y ocurre de manera natural en las estaciones de otoño e invierno con mayor intensidad. Para elegir entre una u otra técnica de empadre se debe tener en cuenta el tipo de producción, ya que en algunas no es tan necesaria la producción de leche o es indeseable la gestación de las hembras al ser un sistema extensivo. Los empadres se pueden clasificar de acuerdo al control que ejerce el productor o el médico veterinario:

#### **- Empadre continuo o a campo:**

Es el más utilizado en México. Los machos se encuentran junto con las hembras durante el pastoreo y se recomienda una proporción de 1-3% con las hembras del rebaño o de 1 semental por cada 20 a 40 hembras. Es muy fácil de emplear, ya que el semental monta a las cabras en cuanto detecta alguna en celo, además de que el productor interviene en lo mínimo, sin embargo, es difícil conocer la fecha en la que se llevó a cabo la monta y de igual manera diagnosticar la gestación. El número de montas tiende a ser menor en comparación con otro tipo de empadres debido a la extensión de terreno que deben caminar, lo que debilita al animal, además de tener menor control de los calores o estros. También es común la transmisión de enfermedades de transmisión sexual como la tricomoniasis y clamidiasis. No es recomendada para producciones de pie de cría (Álvarez y Ducoing, 2006).

#### **- Empadre en corral.**

Este método puede ser utilizado cuando se busca elevar el valor genético del rebaño al poder seleccionar los machos y las hembras que entrarán en contacto durante la época reproductiva, o bien, tras un control del ciclo estral. La proporción de machos en relación a las hembras varía de 1:25 a 1:100 dependiendo de la disponibilidad de machos y su permanencia. La desventaja de éste es que se necesita de instalaciones donde los animales puedan permanecer sin estresantes y en caso de que el rebaño se encuentre normalmente en pastoreo, se debe construir en un lugar donde el

productor pueda observarlos. Se puede hacer uso de machos celadores para hacer la tarea más sencilla en caso de no llevar un control del ciclo estral. Se recomienda su uso para producciones en las que se busca la producción de carne y de leche (Álvarez y Ducoing, 2006). En áreas de México donde la producción de forraje es mayor se realiza de octubre a junio, mientras que en áreas donde la dieta se basa en residuos de la cosecha se realizan a mediados de año a pesar de que hay escasez de forraje y la actividad sexual tiende a disminuir, por lo que se recomienda que esté acompañado del control del ciclo estral (Mellado, 2008).

### **Inseminación artificial.**

Actualmente se encuentra entre los métodos más utilizados por tener la ventaja de utilizar una reducida cantidad de pajillas (recomendándose más de una aplicación para una mayor seguridad de gestación), y los precios de las pajillas varían en relación al mérito genético del macho. Algunas de las ventajas de esta son: Es más económico comprar únicamente el semen que el macho debido al mantenimiento y alimentación que debe tener este, puede utilizarse semen congelado de un macho que ya ha muerto, es más práctico de trasladar a lugares alejados del sitio donde se encuentra el macho, se evitan enfermedades de transmisión sexual y hay mejora genética. El semen puede ser utilizado fresco, refrigerado o congelado; de ser empleado fresco debe mantenerse a 30°C mínimo y aplicarse lo más pronto posible para evitar disminución de la viabilidad espermática y la consecuente disminución de concepciones (Martínez *et al.*, 2008; Hafez y Hafez, 2000).

La inseminación artificial tiene mayor probabilidad de ser exitosa si se realiza en la última mitad del ciclo estral, es decir, 48 horas antes del estro y 13 a 17 horas después de la detección del estro y para un mejor resultado pueden administrarse dos dosis de semen, la primera en las 48 a 56 horas después de la extracción el dispositivo de control del estro y la segunda 12 horas después de la primera, con lo que aumenta 5 a 10% la tasa de concepción. Cuando se utiliza semen fresco la

inseminación se debe realizar en las 36 a 48 horas posteriores al retiro del dispositivo para control del ciclo estral (Hafez y Hafez, 2000). Es importante mencionar que la fertilidad no aumentará con un mayor número de inseminaciones, teniendo así mayor importancia de un correcto control del ciclo estral (Gibbons y Cueto, 2013).

- **Inseminación artificial vaginal**

Este método se basa en el depósito de semen en la vagina, introduciendo la pipeta de inseminación sin la previa localización del cérvix. Debe tenerse sumo cuidado al introducir la pipeta para evitar la uretra, la cual se encuentra ventralmente en la vagina (Aguilar, 2010).

- **Inseminación artificial cervical**

El semen es depositado en la entrada o dentro del cérvix, en los pliegues cervicales. Se considera un método fácil y barato en el cual se utiliza generalmente semen fresco o refrigerado (Aguilar, 2010).

Gibbons y Cueto (2013) mencionan que para obtener una inseminación artificial cervical exitosa es necesario utilizar una dosis mínima de 400 a 600 millones de espermatozoides provenientes de semen fresco.

- **Inseminación intrauterina por laparoscopia**

Consiste en depositar el semen con la ayuda de un laparoscopio directamente en el útero en los cuernos uterinos mediante dos incisiones paramediales pequeñas por donde se introducirá la pajilla de semen y el laparoscopio. Se obtiene un porcentaje de concepción de 70% a 85%, además de poderse utilizar una cantidad menor de espermatozoides y se realiza en menor tiempo si el MVZ tiene experiencia en la aplicación. Ofrece mejores resultados en comparación con otras técnicas de inseminación. Es necesario ayunar a las cabras antes de la inseminación para evitar lesionar vísceras (Aguilar, 2010).

La cantidad de espermatozoides necesarios para una inseminación óptima es de 100 millones de espermatozoides con semen fresco o congelado (Gibbons y Cueto, 2013).

### **Superovulación.**

Se denomina como superovulación al aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de una especie y se basa en administración de hormonas para estimular el crecimiento y proliferación folicular para su posterior ovulación (Mogollón y Burla, 2013).

Esta opción depende en gran medida de la respuesta del ovario, el cuidado que se tenga al recuperar los embriones, así como la inseminación artificial. Inicialmente, para obtener mejores resultados en la inseminación artificial se busca colocar el semen lo más cercano al oviducto (siendo la laparoscopia el método más útil), invariablemente del método de conservación de éste para evitar la prematura muerte de los espermatozoides.

Los tratamientos para inducir la superovulación tienen mejores resultados antes del reclutamiento folicular y en época no reproductiva. Las opciones son: eCG, FSH y extracto hipofisiario equino (HAP) (Mogollón y Burla 2013).

El uso de 1000 a 1200 UI de eCG 48 horas antes de que finalice el protocolo de control del ciclo estral induce a un mayor crecimiento de los folículos y de esta manera puede haber mayor cantidad de folículos preparados para la ovulación. Como se ha mencionado anteriormente, su uso ha sido cuestionado al fomentar la aparición de folículos anovulatorios, crecimiento folicular desigual, reducción de la fertilidad, luteinización prematura de folículos y disminución de la recuperación y calidad embrionaria, razones por las cuales la inducción a la superovulación se realiza con FSH en lugar de eCG, al tener una vida media más corta (3 a 4 horas), razón por la que debe ser administrada cada 12 horas. 60 horas posteriores al retiro de los dispositivos liberadores de progesterona se observará la superovulación (Gibbons y Cueto, 2013).



Pueden utilizarse siete dosis decrecientes de FSH (desde 200 mg). La sincronización para aumentar la cantidad de folículos ovulados y obtener una mayor cantidad y calidad de estructuras recuperadas (embriones) (Gibbons y Cueto, 2013; Cueto *et al.*, 2011). La FSH ha sido una hormona cuyo uso continuo no está recomendado debido a la aparición de anticuerpos, observándose desde la segunda o tercera sincronización con uso de la FSH. Además, la reactividad de la cabra a esta gonadotropina se encuentra en relación al origen de la hormona (por ejemplo, porcino, caprino y ovino) y la raza del caprino, por lo que, si se desea hacer uso de ésta en un rebaño se debe realizar una curva dosis-respuesta y estandarizar el uso de mg, siempre teniendo en cuenta sus limitantes. Se debe también tener en cuenta que el origen de la FSH influye en la respuesta y calidad embrionaria, por ejemplo, la FSH ovina da calidad embrionaria superior en relación al uso de FSH porcina. El uso de FSH da mayores tasas de ovocitos y embriones, así como embriones transferibles en comparación con la eCG (Gibbons y Cueto, 2013).

Se puede inducir a un aumento en la tasa de ovulación por medio de la dieta, realizando un flushing. La manera en que ésta funciona es que la glucosa y la insulina favorecen el desarrollo folicular además de que éstos responden mejor a las gonadotropinas. Por su parte, la glucosa junto con la glucosamina aumenta la capacidad esteroideogénica de los folículos al aumentar el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (Aguilar *et al.*, 2016).

La administración de 100 ml G al 90%, junto con la administración de PGF2 $\alpha$  al inicio de la luteólisis aumentan la cantidad de glucosa, insulina y leptina en la sangre a las 12 horas, y con esto hay aumento del receptor para LH, una inhibición del estradiol folicular y como compensación aumenta la FSH que estimula la foliculogénesis, habiendo así más de un folículo listo para ovular. Puede haber folículos de más de 6 mm 48 horas después del tratamiento (Gutierrez *et al.*, 2011).

La condición folicular interfiere en la respuesta al tratamiento para inducir la superovulación, siendo el folículo dominante el que puede afectar la maduración y ovulación de otros folículos más

pequeños; por esta razón se recomienda un tratamiento que permita luteinizar cualquier folículo existente antes de iniciar (Olivera et al., 2011).

El siguiente es el ejemplo de un protocolo de superovulación utilizando P4, eCG y FSH. Se hace el uso de esponjas o dispositivos intravaginales con liberación de progestágenos y la aplicación intramuscular de eCG en una dosis de 1000 UI 48 horas antes del retiro del dispositivo para un mayor desarrollo del folículo ovulatorio, o bien, se puede colocar en el cuarto día dando una mayor estimulación gonadotrópica. La FSH será administrada cada 12 horas debido a su corta vida media, comenzando la administración de tal manera que la última aplicación se realice 12 horas antes del retiro de la esponja, con lo que se espera haya una mayor respuesta ovulatoria (Zanetti *et al.*, 2014).

#### **Obtención y conservación de embriones.**

La obtención de embriones se puede realizar mediante la recuperación de los embriones directo de la cabra (*in vivo*) o desarrollo a partir de gametos en medios de cultivo especiales y en condiciones que asemejan a lo ocurrido en el organismo (*in vitro*). La importancia de estas técnicas radica en la recuperación de ovocitos de hembras con alto valor genético, teniendo en cuenta que una hembra adulta no fecunda siquiera la mitad de la reserva de ovocitos (Gonella *et al.*, 2013).

##### **- *In vivo.***

Esta técnica se puede llevar a cabo con o sin hembra receptora, y una donadora. De ser este el caso, la receptora debe cumplir con ciertos requisitos como: tener uno o dos cuerpos lúteos correspondientes al 6° o 7° día del ciclo estral, esto debido a un mejor resultado en la sobrevivencia embrionaria conforme la cantidad de cuerpos lúteos funcionales que existan (Gibbons y Cueto, 2013).

El uso de meglumina de flunixin una a dos veces al día entre el 2° y el 4° día después del estro evita la síntesis de prostaglandina sintetasa, lo que puede evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo y de esta manera incrementar el número de embriones viables recuperados. En condiciones

fisiológicas normales, la maduración de los ovocitos ocurre en respuesta al aumento de LH preovulatoria, lo que induce cambios en el núcleo y cambios morfológicos en el citoplasma.

(Olivera et al., 2011).

Se ha observado que el uso de esponjas intravaginales u otros dispositivos liberadores de P4 pueden inducir irregularidades en la síntesis de P4 endógena, agotándose los receptores sensibles a P4 y se inicia la síntesis de receptores de estradiol, lo que estimula la producción de PGF $2\alpha$  prematura. La presencia de folículos anovulatorios también es un factor que induce una alta concentración de estradiol (Hernández *et al.*, 2010).

#### - **Recuperación**

Una técnica para la recuperación de embriones es por medio de laparoscopia o método quirúrgico, en el cual la cabra es colocada sobre la mesa quirúrgica con una ligera inclinación, colocándose la cabeza hacia abajo. Se colocan agujas de calibre 18 en el útero, una en la bifurcación de los cuernos uterinos a nivel del ligamento intercornual y otro 3 cm en dirección hacia los ovarios, para posteriormente realizar un lavado retrógrado con Buffer Fosfato Salino (PBS) (20 ml aproximadamente) a 38°C que será colectado en un matraz entibiado. Se realiza la sutura de los planos y la posterior administración de antibióticos. Un abordaje quirúrgico puede implicar la generación de adherencias en la donadora o un acortamiento de la vida reproductiva de la cabra, por lo que se recomienda que no se realice más de una o dos veces (Gibbons y Cueto, 2013).

También se puede hacer uso del lavado para la colecta de embriones a través de un método en el que, bajo anestesia general, se inyecta a los cuernos uterinos solución PBS adicionado con suero inactivado de un caprino adulto previamente centrifugado, filtrado y calentado para inactivar las proteínas, además de haber sido conservado a bajas temperaturas. La colecta de embriones puede

ser realizada en el octavo o noveno día posterior al retiro del dispositivo, cuando se encuentra en mórula compacta o blastocisto temprano (Gibbons y Cueto, 2013).

La recolección vía transcervical puede ser utilizada para evitar las dificultades que una recolección laparoscópica supone, sin embargo, los anillos cervicales son un obstáculo para su realización y es por esta razón que se hace uso del ácido hialurónico inyectado en el cuello del cérvix a razón de 1 mg por ml. El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano primario que relaja el cuello uterino al tener gran afinidad por el agua. Esta dinámica entre ácido hialurónico y agua puede ser observada también en el estro cuando la vulva se encuentra edematizada (Lopes, 2011).

Una vez que se ha introducido una sonda (pudiendo ser Foley de tres vías de calibre 8) al útero, se introduce aire al globo del catéter cuando se encuentre a nivel de un cuerno uterino y posteriormente se puede hacer el lavado con 20 a 30 ml de PBS a 38°C, recolectándose en jeringas o drenando el líquido hacia un matraz entibiado, mientras que en el otro orificio de la sonda se inyectará la solución PBS (Gibbons y Cueto, 2013).

La recolección debe ser llevada a cabo de la manera más delicada, ya que la integridad del ovocito será clave para el crecimiento embrionario, al ser el citoplasma de éste prácticamente el que tendrá el embrión (Gonella *et al.*, 2013).

#### - **Búsqueda e identificación**

En esta etapa del proceso se deben colocar los embriones en medios de cultivo a 38°C después de ser identificados con la ayuda de un microscopio estereoscópico y una micropipeta para poder movilizarlos. Éstos deben colocarse en una placa térmica durante la examinación. Se recomienda realizar dos búsquedas, por lo que la temperatura debe mantenerse. Los embriones son colocados delicadamente con micropipetas en los medios de cultivo. La calidad de los embriones buscados son 1 y 2, siendo las principales características: cantidad igual o mayor a 32 células, 70% al 98%

de masa activa, células del cúmulo ovífero compactas con coloración clara, sin opacidad (Gibbons y Cueto, 2013).

- **Siembra**

- ***In vivo***

Se recomienda que el tiempo entre la recuperación de los embriones y la colocación en los medios de crecimiento no sea mayor a 2 horas en el medio de conservación. En el caso de que los embriones hayan sido previamente manipulados y seleccionados es necesario realizar la siembra en un tiempo no mayor a media hora. El procedimiento más exitoso es mediante la laparoscopia, realizándose una incisión pequeña por la que se exterioriza un cuerno uterino. Normalmente se siembra en el cuerno donde se encuentra el ovario con cuerpo lúteo, depositándose el embrión en la luz uterina (acondicionado en 10 µl de PBS). Cabe mencionar que la sobrevivencia embrionaria se encuentra ligada a la permanencia de un cuerpo lúteo en el ovario (Gibbons y Cueto, 2013).

- ***In vitro***

Este método se puede dividir en cuatro etapas: Recuperación, maduración, fertilización y cultivo. Como suceso predecesor de esta técnica se encuentra el nacimiento de un conejo en los años 20 a través de una fertilización *in vitro*, mientras que en los 80 se registra el nacimiento de un bovino a partir de ésta (Gonella *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que las tasas de supervivencia post-vitrificación de los embriones por técnica *in vitro* dependen en gran medida de los medios de cultivo y los nutrientes que se les adicionan.

- **Recuperación.**

El crecimiento *in vitro* de embriones puede realizarse a partir de la recuperación guiada por ultrasonido transvaginal o de ovarios en rastros, de folículos maduros o inmaduros, significando la recolección en el rastro una ventaja económica al obtenerse una gran cantidad de ovocitos en una

cantidad de tiempo menor. El mejoramiento genético no es tan viable con esta última opción al no tener certeza del origen de las hembras, por lo que se recomienda con fines de estudio y no como mejoramiento de un hato. Una vez que los ovocitos son recolectados en un rastro, son disecados y transportados normalmente en solución salina de NaCl al 0.9% a 30-35°C hacia el laboratorio, donde son lavados con solución salina, suero fisiológico y antibióticos como penicilina, gentamicina y estreptomina. Se hace uso de agujas de diversos calibres, siendo el calibre 18 o 16 con bisel corto los más utilizados para este fin, además de poderse conectar a jeringas con 1 ml de medio de cultivo (Gonella *et al.*, 2013).

En otras especies se ha observado la diferencia entre la recuperación de ovocitos a partir de la disección con escalpelo o bisturí y con agujas de calibre 18, teniendo ambas técnicas sus ventajas y desventajas. La recuperación a partir de la disección con bisturí da como resultado ovocitos con mayor calidad del cúmulo, pero menor practicidad al tener que dedicársele mayor cantidad de tiempo; en contraparte, la recuperación con punción con aguja presenta menores tasas de recuperación de ovocitos en buen estado del cúmulo, pero se pueden obtener cantidades aptas para una investigación que exige gran cantidad de éstos (Quintana *et al.*, 2012).

La obtención de folículos *in vitro* mantiene la arquitectura folicular y conserva las interacciones entre el folículo y las células circundantes, siendo ésta más rápida y menos laboriosa que si se hiciera con los folículos aislados ya que, además de que el sistema debe ser más refinado, se debe hacer con folículos secundarios (De Figueiredo *et al.*, 2011).

Esta etapa de la obtención de ovocitos *in vitro* es primordial. Un ovocito no competente no puede completar la meiosis y, por consiguiente, es incapaz de recombinar su cromatina con la del espermatozoide para la formación de los pronúcleos y la activación del desarrollo embrionario. También es importante mencionar que los ovocitos recuperados de un folículo con un diámetro menor a 2 mm o uno mayor a 8 mm pueden no ser viables, por lo que un ovocito en buenas

condiciones debe presentar citoplasma con granulaciones marrones en un citoplasma homogéneo, además de tener una cantidad considerable de células del cúmulo. Durante el transporte al laboratorio donde se realizarán los siguientes pasos los ovocitos deben permanecer en contenedores con medios como el Tissue culture medium 199 (TCM-199), Hepes, polivinil alcohol y heparina (Gonella *et al.*, 2013).

- **Maduración.**

Para esta fase los ovocitos son depositados en pozos de maduración a 38.5°C. La activación de los folículos primarios se puede realizar con factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9), viéndose a su vez la reanudación de la meiosis (diploteno fase 1) (De Figueiredo *et al.*, 2011). También se ha observado que ROS están involucradas en la activación de la meiosis de ovocitos en diploteno, además de estimular la fusión entre gametos (Torres *et al.*, 2018).

En condiciones fisiológicas normales, los ovocitos en crecimiento dentro del folículo adquieren enzimas, ARN, proteínas y sustratos que tendrán importancia en su desarrollo posterior. Los ovocitos que han sido recuperados de folículos muy pequeños tienen menores tasas de maduración y producción de blastocistos en comparación con aquellos recuperados de folículos de mayor tamaño (Gonella *et al.*, 2013).

Un medio de cultivo embrionario debe tener características muy parecidas a las observadas en el útero, conservando una osmolaridad (entre 245 a 280 mOsm/kg), pH (7.2 a 7.6) y un nivel de oxígeno alto (20%). Es importante manejar los niveles adecuados de oxígeno, ya que una alta concentración puede dar lugar a la formación de ROS que dañan el ADN, generan apoptosis y bloqueo del desarrollo embrionario (Torres *et al.*, 2018; Mucci *et al.*, 2006).

La insulina es una hormona que inhibe la apoptosis celular en condiciones de estrés oxidativo y puede ser adicionada al medio de cultivo de tejido ovárico, estimulando la sobrevivencia de los ovocitos. Los ovocitos de cabra, tras ser cultivados con 10 ng/ml de insulina por 7 días mostraron

integridad celular, aumento del crecimiento y activación de folículos preantrales (Nogueira *et al.*, 2011).

El uso de ácido ascórbico a 50 µg/ml aumenta el desarrollo de los folículos preantrales de caprino después de su cultivo *in vitro*, además de aumentar la síntesis de enzima metaloproteasa 9 (MMP9), cuyo papel es la remodelación de la membrana extracelular celular durante la formación de la placenta y la implantación al endometrio (Higa y Fornes, 2011; Silva *et al.*, 2011).

El SFB se ha utilizado como medio indefinido para el crecimiento de ovocitos de bovino aportando proteínas que reducen la tensión superficial, propiciando que los embriones no se adhieran a los instrumentos utilizados para su manipulación, sin embargo, se ha observado que mientras por un lado acelera el desarrollo en estadios más avanzados, en estadios tempranos cuando comienzan las divisiones celulares son inhibidas por éste, además de que hay una mayor probabilidad de que el éxito en la criopreservación de los ovocitos sea bajo al tener una mayor cantidad de lípidos citoplasmáticos. En los medios semi-indefinidos el SFB puede ser reemplazado con BSA, suponiendo una fuente de aminoácidos para el embrión. La desventaja de este tipo de medios es que hay posibilidades mayores de contaminación y la consecuente falla en la maduración. Cuando se adiciona BSA y co-cultivos a los ovocitos se habla de un medio semi-definido. Se cree que la BSA provee de nutrientes al embrión al ser una gran fuente de aminoácidos, además de generar mejores resultados en la criopreservación en comparación con el SFB pero por otro lado tiende a contaminarse con mayor facilidad, lo que puede causar fallas durante la maduración y desarrollo embrionario. Cabe mencionar que el SFB es considerado inductor de formación de ROS debido a la presencia de la enzima amino oxidasa que oxida aminas primarias dando como resultado peróxido de hidrógeno. Para evitar que aparezcan estas ROS se pueden adicionar ácido ascórbico y alfa tocoferol, los cuales son antioxidantes con efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de los blastocistos (Torres *et al.*, 2018; Celestinos y Gatica, 2002).



Los medios definidos están representados por polivinilpirrolidona y polivinil alcohol, que, a pesar de eliminar la facilidad de contaminación de los medios de cultivo anteriores, presentan menor tasa de crecimiento embrionario y una menor tasa de blastocistos (Gonella *et al.*, 2013).

En un proyecto llevado a cabo por Marco y Vicente (2003) realizado en corderas, se utilizó como medio de cultivo 500 µl de medio TCM199, suplementado con SFB 10%, factor de crecimiento epitelial (EGF) (10 g/ml), 1 UI de hormona gonadotrópica coriónica humana (hCG), 17β estradiol (1 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml). La maduración *in vitro* se realizó a 38,5°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y saturada de humedad.

Existen formas de categorizar los ovocitos de acuerdo al cúmulo ovífero y el citoplasma, siendo signos como vacuolización, aplanamiento de células del cúmulo ovífero y expansión incompleta de las células del cúmulo lo indeseable. A continuación, cito una clasificación que se puede tomar en cuenta (De Loos *et al.*, 1992):

1. Calidad excelente: Células ovíferas compactas presentes, conteniendo más de tres capas de células. Citoplasma con granulaciones finas y homogéneas, zona pelúcida llena, completa y de coloración marrón.
2. Calidad buena: Células ovíferas compactas parcialmente presentes con menos de 3 capas de células. Citoplasma con granulaciones distribuidas heterogéneamente, pudiendo estar más concentradas en el centro y más distribuidas en la periferia o condensadas en una sola zona aparentando una mancha oscura.
3. Calidad media: Células ovíferas compactas presentes, pero expandidas. Citoplasma contraído con espacio entre la membrana celular y la zona pelúcida, degenerado, vacuolizado o fragmentado.
4. Calidad mala: Oocito desnudo sin células del cúmulo ovífero (Gonella *et al.*, 2013).

Además, se puede hacer adición de azul de cresilo brillante (BCB) para indicar la presencia de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, la cual provee de nucleótidos y NADPH al ciclo de la

ribosa fostato. Conforme los ovocitos maduran, la cantidad de esta enzima disminuye y al ser adicionado el BCB aquellos que quedan marcados con el colorante (BCB+) tienen una mayor maduración en comparación con los que no se colorean (BCB-), teniendo estos últimos menor cantidad de la enzima que descompone el BCB (Rodríguez *et al.*, 1999). A pesar de ser una técnica rápida, se han reportado en algunos estudios realizados en ovocitos de porcino que induce cambios en la cantidad de ARNm, interfiriendo con una exitosa fertilización, además de haber anomalías en el embrión por fallas en el cromosoma, por lo que su uso es controversial y no del todo aceptado. También se ha sugerido que hay una relación entre la cantidad de lípidos, el diámetro y la coloración de los ovocitos, siendo los BCB+ los de mayor diámetro, lípidos y cantidad de mitocondrias activas (Castañeda *et al.*, 2013).

En un estudio en bovinos realizado por Aké-Villanueva *et al.* (2015), consideraron como ovocitos maduros aquellos donde se pudieron observar cromosomas en Metafase II y la extrusión del primer cuerpo polar.

Es también durante la última etapa de la maduración cuando las células del cúmulo ovígeno sintetizan ácido hialurónico, hidratando las células del cúmulo y de esta manera se cierran los espacios entre éstas. Este proceso puede observarse después de 24 horas.

#### - **Fertilización.**

Después de la maduración, los ovocitos deben ser lavados. Este paso se puede realizar con medio amortiguador Tris. Los espermatozoides utilizados para esta técnica pueden ser provenientes de sementales y deben ser sometidos a tratamientos para que obtengan capacitación, además de ser separados de las fracciones pre y post seminales y los criopreservadores, o bien, pueden ser obtenidos a partir de una colección seminal por medio de una vagina artificial y posteriormente se evalúa macro y microscópicamente, para realizar una centrifugación e incubación a 37° C por 45 minutos como paso final. Los espermatozoides deben ser cubiertos de la exposición a la luz para

evitar la producción de ROS que impiden una correcta reacción acrosomal y motilidad (Torres *et al.*, 2018).

Una vez que los espermatozoides y los ovocitos han obtenido un nivel de capacitación/maduración adecuada, son puestos en medios de cultivo que no comprometan la capacidad motora de los espermatozoides para llegar a la zona pelúcida de los ovocitos. Ambos se colocan en un medio de fertilización por 18 a 22 horas, una temperatura de 39°C y una saturación de 5% de CO<sub>2</sub>. La penetración del espermatozoide activa la segunda división meiótica, junto con la expulsión del segundo cuerpo polar (Gonella *et al.*, 2013).

En un trabajo realizado en caprinos por Soberano *et al.*, (2011), después de incubados los espermatozoides, se colocaron junto con los ovocitos en una incubación posterior en medio amortiguador Tris con BSA durante un día a 38.5°C con humedad a saturación y 5% de CO<sub>2</sub> por 9 días; aquellos que mostraron dos o más blastómeros fueron considerados ovocitos fertilizados. El mismo grupo de trabajo comenta que la fertilización tiene más éxito en medio HECM-9 adicionado con aminoácidos no esenciales y factor de crecimiento epidérmico, al estar posiblemente involucrados en la síntesis de proteínas, regulación de pH intracelular, osmorregulación y quelantes de metales pesados. Durante la meiosis los aminoácidos son utilizados para la producción de proteínas, ácidos nucleicos y energía. Un medio de fertilización usado comúnmente es el TCM-199.

Es importante mencionar que el cambio de medios de cultivo entre cada etapa de la producción *in vitro* puede inducir condiciones de estrés celular, por lo que la proliferación celular y morfología del ovocito se ven afectados, teniendo como resultado problemas congénitos y muerte posnatal (Soberano *et al.*, 2011).

- **Cultivo**

Luego de la fertilización, los ovocitos fertilizados son llevados a la etapa de cultivo donde llevaran a cabo el desarrollo necesario para poderse transferir a la hembra receptora o ser crioconservados. A pesar de que la glucosa es la principal fuente de energía para las células embrionarias, se ha colocado lactato y piruvato en su lugar debido a que la adición de la glucosa puede generar radicales libres intracelulares. La carga de oxígeno que debe llevar el medio de cultivo debe oscilar entre 3.5 a 8%, siendo lo más similar a las condiciones fisiológicas promedio, de lo contrario podría ocurrir apoptosis y generación de radicales libres (Gonella *et al.*, 2013).

Schwarz *et al.* (2008) añadieron óxido nítrico a ovocitos de bovino durante el cultivo embrionario, observando que resultaba benéfica una alta cantidad, sin embargo, se observó un aumento de apoptosis en células. El óxido nítrico se ve involucrado en la síntesis de cGMP, un segundo mensajero desencadenante de múltiples funciones celulares, entre ellos el control de la meiosis y la función de las células de la granulosa.

Se ha observado que en caprinos la división celular tiende a detenerse cuando hay 8 a 16 células, por lo que se ha optado por el uso simultáneo de células de la granulosa y células epiteliales del oviducto que estimulan el desarrollo de los embriones, siendo las células epiteliales del oviducto las que tienen mejores tasas de maduración al eliminar las sustancias embriotóxicas y aportar sustancias clave al embrión. Una vez que los embriones han logrado un desarrollo exitoso, la implantación en la madre no sólo depende de éstos, si no de la funcionalidad de al menos un cuerpo lúteo y los niveles adecuados de progesterona para mantener la gestación, además, en caso de que se coloque una cantidad elevada de embriones éstos sintetizan factores competitivos. Se puede determinar el éxito de un cultivo embrionario a partir del movimiento de “agregado celular” en las primeras 24 horas, para posteriormente comenzar la adherencia a la caja de Petri (Bosch *et al.*, 2006).

## **Vitrificación.**

### **Antecedentes de la vitrificación embrionaria en medicina veterinaria.**

La conservación de embriones como método de RAA ha sido pieza clave en la reproducción animal, buscándose así mejoras en las técnicas utilizadas para evitar la merma en la calidad y viabilidad de éstos. Es una técnica que permite el almacenamiento de órganos y tejidos por un largo periodo de tiempo para su posterior descongelamiento y uso, y que es ampliamente utilizada por sus numerosos beneficios (Izadi *et al.*, 2018).

Anteriormente la congelación era el método utilizado para la criopreservación de tejidos biológicos. En los 70, Willadsen elaboró un protocolo en que embriones ovinos fueron congelados lentamente hasta alcanzar temperaturas entre -30 a -40°C para después ser sumergidos en nitrógeno líquido (Elliot y Whelan, 1977).

La criopreservación se ha utilizado desde el siglo XX, cuando Polge adicionó G como criopreservador a los espermatozoides, observando que recuperaban la movilidad después de un periodo largo de congelación. Los primeros intentos de criopreservación se realizaron con Tris-citrato yema de huevo como crioprotector (Horta *et al.*, 2017). A partir de la búsqueda de nuevas alternativas se realizaron diferentes protocolos usando embriones mamíferos. En uno de ellos se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), acetamida, propilenglicol (PG) y polietilenglicol (PEG), siendo después llamada técnica de criopreservación libre de hielo por vitrificación (Elliot y Whelan, 1977).

Se tienen diferentes técnicas de criopreservación: congelación, vitrificación de superficie sólida y vitrificación criogénica. La congelación fue utilizada por mucho tiempo en la reproducción animal para la conservación de espermatozoides, ovocitos y embriones, sin embargo, después del descongelamiento la viabilidad era menor al presentarse rupturas en las membranas y organelos por la presencia de cristales de agua generados por el tiempo en que tardaba en completarse el

congelamiento, por lo que se ha observado que la vitrificación tiene ventajas en este sentido sobre la congelación, al sustituir el agua intracelular por los crioprotectores durante la fase de equilibrio, además de ser más simple y de menor costo (Souza *et al.*, 2011).

La vitrificación se ha empleado por ejemplo en bovinos para la conservación de embriones producidos *in vitro*, ya que presentan mayor calidad morfológica y menor criodaño en comparación con los embriones producidos *in vivo* que se pueden utilizar frescos para la transferencia o se puede hacer uso de la congelación. Se han hecho una gran cantidad de investigaciones al respecto y se ha demostrado que estas diferencias son debido a una menor cantidad de células en los embriones producidos *in vitro* que en los producidos *in vivo* (Ramírez y Bernal, 2012), además de que hay un aumento en la concentración de lípidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, siendo así más susceptibles al ataque de virus, hongos y bacterias (Celestinos y Gatica, 2002). Algunas de las desventajas que se pueden encontrar en embriones producidos *in vivo* contra *in vitro* son: mayor fragilidad de zona pelúcida, menor compactación embrionaria, menor número de blastómeros conformacionales de la teca interna, alteraciones de la expresión génica, aumento de apoptosis y mayor cantidad de lípidos citoplasmáticos (Rizos *et al.*, 2003).

En humanos la técnica ha sido utilizada para la preservación de ovocitos principalmente. Son tratamientos utilizados por parejas con problemas de fertilidad o personas que han pasado por quimioterapia (Izadi *et al.*, 2018).

### **Definición.**

La vitrificación es un proceso físico utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones mediante el uso de una serie de criopreservadores a altas concentraciones, pero bajos volúmenes, que, junto con el embrión, son enfriados a altas velocidades por debajo del punto de cristalización, disminuyendo así el daño que pueda haber por la formación de cristales de hielo en la zona pelúcida

y organelos intracelulares (Ruiz *et al.*, 2010). Durante la vitrificación se produce un incremento de la viscosidad de los criopreservadores, no una cristalización, además de proveer un rango menor de degeneración en el embrión durante la descongelación (Ramírez y Bernal, 2012).

### **Ventajas y desventajas de la vitrificación.**

Las ventajas son:

- Menor uso de equipo especializado para su realización.
- Menor costo.
- Métodos más sencillos.
- No hay formación de cristales de H<sup>2</sup>O en las membranas ni organelos del embrión.
- Uso de menor volumen de crioprotectores.
- Menor aparición de criodaño.

A pesar de ser pocas las desventajas en la vitrificación, como en todo método de preservación se habla de diferentes protocolos, que de acuerdo al médico que lo realice, serán diferentes los volúmenes y los criopreservadores utilizados, además de las temperaturas y el tiempo en que tardarán en lograr su propósito. El criodaño puede aparecer en menor o mayor cantidad de acuerdo a factores propios del embrión como el tamaño, la forma de las células, la permeabilidad de membranas, la sensibilidad del embrión y el grado de desarrollo embrionario, observando una mayor resistencia a la vitrificación cuando el blastocisto tiene un gran número de células; a su vez, es importante que la temperatura de congelación disminuya de manera rápida para evitar el punto crítico, que se encuentra entre -15°C y -5°C. Las soluciones utilizadas (crioprotectores) tienen una alta toxicidad en las concentraciones necesarias para llevar a cabo el objetivo de manera exitosa. Otra desventaja relativa es la utilización de nitrógeno líquido, el cual puede no encontrarse fácilmente en localidades alejadas o rurales (Ramírez y Bernal, 2012; Cabrera *et al.*, 2006). Estos

son los factores más importantes en el momento de decidir entre la congelación tradicional y la vitrificación.

### **Soluciones empleadas.**

- Solución de equilibrio.

El equilibrio es considerado punto clave para la supervivencia de los embriones, en la cual se deshidratan gradualmente para dar paso a los crioprotectores y está orientada a evitar embriotoxicidad y estrés osmótico. Se lleva a cabo a temperatura ambiente (25-32°C), pudiendo ser en uno o hasta cuatro pasos. Los crioprotectores se colocan en una menor concentración que en la solución de vitrificación, aumentando gradualmente tanto la concentración como la cantidad de crioprotectores a consideración del médico que lo realiza. Es necesario que el tiempo de permanencia en esta solución no sea tan corta, ya que traería como consecuencia una incorrecta penetración de los crioprotectores, pero que no sea tan prolongada que pueda causar toxicidad. Una correcta selección de criopreservadores para el equilibrio puede conjugarse con mayor cantidad de pasos y mayor tiempo de permanencia en cada uno (Celestinos y Gatica, 2002).

El uso de distintas soluciones como DMSO, etilenglicol (EG), Ham's F-10 para la solución de equilibrio son utilizadas para el equilibrio en ovocitos de humanos (Izadi *et al.*, 2018).

Hong, *et al.* (2006), realizaron una investigación cuyos resultados indicaron que el EG produce menor cantidad de cristales post congelación y menor toxicidad en comparación al DMSO, teniendo un mejor comportamiento si se utilizan ambos en una concentración de 30 al 50%; además de que el tiempo recomendado para el equilibrio es de 2 minutos, ya que con 1 minuto no hay una buena penetración de las soluciones y con más de 2 minutos hay mayor toxicidad de EG / DMSO.

- Solución base.



Estas soluciones tienen un pH que oscila entre 7.2 a 7.4. La solución más utilizada es el PBS, observándose una mayor tasa de desarrollo *in vitro* en embriones vitrificados con base de PBS + medio Ham's F-10, un medio que contiene L-glutamina y bicarbonato de sodio y que originalmente era usado para el crecimiento sin suero de células ováricas de hámster chino. También se han utilizado medios de cultivo embrionarios como TCM-199, HEPES-Ham's F-10 y combinaciones entre éstos, aunque se ha observado que en el medio PBS las tasas de reexpansión y eclosión embrionaria no presentan diferencias respecto a los demás medios de cultivo (Cabrera *et al.*, 2006).

- Crioprotectores.

Son compuestos que evitan la degeneración de las proteínas y estructuras citoplasmáticas durante la crioconservación de los embriones. Estos a su vez deshidratan a los embriones. Los embriones únicamente sobreviven la vitrificación al ser sometidos al tratamiento previo con estas sustancias (Celestinos y Gatica, 2002). Las características que debe tener un crioprotector son: debe permanecer vítreo al calentarse, no ser tóxico a los embriones antes de la vitrificación y después del calentamiento (Cabrera *et al.*, 2006).

Se pueden utilizar varios tipos de crioprotectores:

- Permeables: Se introducen en la célula para de esta manera poder proteger el citoplasma. Algunos son: G, DMSO, etilenglicol EG, propilenglicol PG, propanodiol, PEG, etanol y otros alcoholes. Actualmente el uso de G y DMSO han ido en decremento, siendo sustituido por EG al mostrar menor toxicidad celular al combinarse con trehalosa o sucrosa, disminuyendo el tiempo de exposición a éste. Los crioprotectores permeables protegen organelos intracelulares y a las células durante el enfriamiento (Begin *et al.*, 2003; Celestinos y Gatica, 2002).

- Impermeables: No pueden introducirse a la célula haciendo uso únicamente de la presión osmótica para controlar la cantidad de agua libre intracelular. Son capaces de proteger la membrana celular, facilitan la deshidratación y disminuyen la formación de hielo durante el enfriamiento. Algunos ejemplos son: polivinilpirrolidona (PVP), dextrano, sucrosa, lactosa, sorbitol, trealosa, fructosa y glucosa (Begin *et al.*, 2003; Celestinos y Gatica, 2002).

Dentro de estas categorías se pueden clasificar a su vez en otras tres de acuerdo a su peso molecular:

- Bajo peso molecular y permeables: Metanol, EG, PG, DMSO, 2,3 butonediol y G (Celestinos y Gatica, 2002).
- Bajo peso molecular y no permeables: Glucosa, sucrosa, trehalosa y galactosa (Celestinos y Gatica, 2002).
- Alto peso molecular y no permeables: PVP, alcohol polivinílico y hialuronidato de sodio (Cabrera *et al.*, 2006).

Se ha observado además que el desarrollo del embrión definirá el grado de acción de los crioprotectores, siendo las etapas más tempranas las óptimas. Cuando se utiliza etilenglicol la etapa óptima de desarrollo embrionario es la mórula. Los criopreservadores de bajo peso molecular permeables son necesarios durante la criopreservación por lo que son añadidos a la solución vitrificante para evitar daños en las membranas durante el enfriamiento y calentamiento, siendo su característica permeable la que confiere la facultad de proteger “incompletamente” las células y de esta manera tener menor toxicidad química y daño osmótico. Estos son capaces de penetrar en el embrión a temperatura ambiente (Cabrera *et al.*, 2006; Celestinos y Gatica, 2002).

El uso de criopreservadores como sucrosa, y dextrosa evitan una excesiva entrada al interior de la célula de otros criopreservadores más permeables como el etilenglicol, además de ser de gran ayuda en la mejora de la tasa de sobrevivencia embrionaria. El mecanismo por el cual confieren protección ante otro tipo de crioprotectores es a partir de la introducción leve a la célula, al mismo

tiempo que se deshidrata. A pesar de que tienen efectos benéficos durante la vitrificación, es importante que su concentración no sea alta, ya que puede interferir con la eclosión de los embriones (Cabrera, 2006; Celestinos y Gatica, 2002).

La embriotoxicidad puede ser química, a partir de la desnaturalización enzimática o por estrés osmótico. Se pueden emplear combinaciones de soluciones permeables e impermeables, por ejemplo, EG + DMSO + G + Sucrosa. Estos deben ser utilizados a altas concentraciones para una deshidratación a mayor velocidad y así disminuir los efectos tóxicos y formación de cristales, o bien, se puede manejar como que la cantidad de criopreservadores puede ser inversamente proporcional a la temperatura de congelación (Ramírez y Bernal, 2012).

En un estudio llevado a cabo por Hong *et al.* (2007) se llegó a la conclusión de que los factores que afectan la eficiencia de la vitrificación son la composición de los crioprotectores usados, el tiempo de equilibrio de los embriones y el contenedor o tipo de pajilla utilizada para el almacenaje de los embriones.

#### - **Solución de vitrificación.**

Para la vitrificación de ovocitos caprinos han sido utilizadas soluciones como PVP, EG, sacarosa y trehalosa. En ovocitos de humano son utilizados DMSO, EG, Ham's F-10 y seroalbúmina humana (Izadi *et al.*, 2018).

En un proyecto llevado a cabo por García-Amador *et al.*, (2009), en ovocitos de humano se utilizó EG al 15%, DMSO al 15% y sucrosa, 0.5 M como solución vitrificante. Éstos fueron puestos en cryotops, unas pipetas de polipropileno especialmente diseñadas para usarse con nitrógeno líquido.

Marco *et al.*, (2016), realizaron vitrificaciones con embriones de conejo utilizando un medio de vitrificación consistente en 20% EG y 20% de DMSO en solución base.

Aké-Villanueva *et al.* (2015), utilizaron embriones en pipetas de 0.25 ml, las cuales colocaron en un medio de vitrificación de TCM + 7.5% de DMSO + 7.5% de EG por 3 minutos. Posteriormente los colocaron en un segundo medio de vitrificación de TCM + 16% de DMSO + 16% de EG + 0.4 M de sacarosa por menos de un minuto. Una vez realizados estos pasos se colocaron inmediatamente las pipetas en nitrógeno líquido y se almacenaron ahí hasta su descongelación.

Cabe mencionar que los crioprotectores con mayor permeabilidad, como es el caso del EG causan menor daño osmótico y menor tiempo de exposición, sin embargo, poseen mayor citotoxicidad. Los crioprotectores con menor permeabilidad otorgan menor toxicidad al disminuir la concentración de crioprotector dentro de las células, siendo esta la razón principal por la que se utilizan mezclas de éstos y evitar que las células pierdan viabilidad y función metabólica para el embrión. Los crioprotectores con mayor uso son EG + DMSO o EG + 1-2 propanediol (Vajta y Nagy, 2006)

Se han utilizado (Jiatsa *et al.*, 2019) como solución vitrificante el medio esencial mínimo (MEM) + HEPES suplementado con 10 mg/ml BSA, 20 UI de catalasa, 0.25 M de sucrosa, 10% EG y 10% DMSO; soluciones como DMSO y EG.

En un estudio llevado a cabo por González-Silvestry *et al.* (2022), se llegó a la conclusión de que el uso de una solución vitrificante de DMSO al 15%, SFB al 20%, EG al 15% y Sucrosa a 0.4 M no otorgan una buena calidad al desarrollo embrionario *in vitro*, estando por encima los resultados obtenidos en embriones para cuyo desarrollo no se utilizó ningún crioprotector o criopreservación.

### **Técnicas de vitrificación.**

En la mayoría de las especies domésticas se han utilizado pipetas para semen (0.25 ml), sin embargo, éstas no están hechas para la vitrificación, ya que los materiales son más gruesos al estar diseñadas para congelaciones lentas, además de que no cuentan con la capacidad para calentarse a grandes temperaturas (2000°C) (Celestinos y Gatica, 2002).

Begin *et al.* (2003), realizaron en caprinos la vitrificación en base sólida (solid surface vitrification; SSV) y bucle criogénico (cryoloop). La base sólida es una técnica realizada en una placa fría que puede ser una lámina de aluminio que ha sido previamente enfriado con nitrógeno líquido. Los embriones, previamente mezclados con la solución vitrificante, son dejados caer sobre la lámina, creando gotas que pueden ser transferidas mediante el uso de pinzas de disección previamente enfriadas hacia un vial con nitrógeno líquido. El bucle criogénico es un instrumento parecido al utilizado en microbiología para la siembra de bacterias, que consiste en un pequeño lazo de 0.5 a 0.7 mm en el que recoge una cantidad mínima de solución, creando una capa fina de crioprotector en la que se cubrirán los tejidos. Estos investigadores demostraron que el uso del bucle criogénico tiene mayores ventajas al utilizar menor cantidad de solución, mayor contacto de superficie embrión-crioprotectores, menor tiempo de uso y facilidad para usarse en campo; además se observaron mayores tasas de embriones sobrevivientes en comparación con la técnica de base sólida. En las últimas décadas se ha hecho común el uso de las pajillas abiertas estiradas (open pulled straw; OPS), que son pajillas cuya capacidad máxima es de 1 ml, de las cuales únicamente 0.25 ml. serán utilizadas con este fin. Estas tienen un extremo cerrado y el otro abierto, lo que incrementa la velocidad de enfriamiento al ser una pequeña cantidad de crioprotectores que contienen los embriones, mejorando el intercambio de temperatura. A pesar de estas ventajas, la mayor desventaja de esta técnica es el contacto de los criopreservadores-embryones con el nitrógeno líquido, siendo éste en muchas ocasiones el causante de la transmisión de agentes infecciosos. La técnica OPS ha mostrado baja incidencia de fractura de la zona pelúcida, buenas

tasas de eclosión y de gestación, por lo que se han investigado variantes que ofrecen las mismas ventajas: nitrógeno líquido filtrado, close pulled straw (CPS), técnica OPS modificada (mOPS), super open pulled straw (SOPS), CryoTip, microgota y punta de carga de gel (GL-Tips) (Cabrera *et al.*, 2006).

De acuerdo al número de pasos se puede dividir a la vitrificación en dos: de uno y dos pasos.

La vitrificación de un paso consiste en la carga de los embriones en el tipo de contenedor elegido previamente cargado con alcohol polivinílico y se deja equilibrar por 1 a 2.5 minutos. Posterior a esto se sumerge en nitrógeno líquido.

En el caso de la vitrificación de dos pasos se requiere un “pretratamiento” donde se colocan los embriones en una solución de 10% de EG / DMSO o de ambos crioprotectores por 5 minutos. Posterior a esto se colocan los embriones en el contenedor elegido precargado con solución vitrificante, que posteriormente será sellada con alcohol polivinílico para ser introducido en nitrógeno líquido. En ambos casos para calentar la pajilla se pueden dar baños con agua corriente a 25°C por 10 segundos y seguido de esto se incuban en sucrosa (0.5mol/l) por 5 minutos. Los remanentes de crioprotectores se retiran lavando 3 veces con PBS (Hong *et al.*, 2006).

### **Situación actual de la vitrificación en embriones de caprino en México.**

En la actualidad se siguen haciendo estudios para encontrar una mezcla adecuada de crioprotectores para los ovocitos caprinos y posterior obtención de embriones. Se han descrito anteriormente una gran cantidad de combinaciones que, a pesar de ser utilizadas sin mayor problema en otras especies, en caprinos son tóxicas y tienden a causar daño durante la meiosis (González-Silvestry *et al.*, 2022).

A lo largo de esta revisión bibliográfica hemos observado que en otras especies como ovinos y bovinos hay mayor cantidad de información dada la rentabilidad que significan estas especies, además de un cierto estigma que acompaña a la especie caprina, siendo sinónimo de bajo nivel socioeconómico en algunas granjas y rancherías en lugares de México donde las cabras tienen la ventaja de ser resistentes a climas adversos y poco recurso alimenticio.

Para lograr avances significativos en la reproducción de caprinos en México, y que realmente convengan al país, es necesario reeducar a los productores haciéndoles ver que el valor de cada especie se encuentra en los recursos de la región que puedan brindárseles de manera más económica y fácilmente. Si bien, es cierto que esta especie es muy noble en relación a sus necesidades, también es importante señalar que la vitrificación está siendo un tema cada vez más conocido pero se necesita mayor difusión mediante programas reproductivos por parte del gobierno, o que lo poco que se sabe de vitrificación en embriones de caprino sea compartido en Facultades de Medicina Veterinaria del país con el fin de demostrar que a la larga no es un gasto, si no una manera de aminorar costos (transporte de hembras o machos para reproducción mediante monta, características seleccionadas de acuerdo al clima donde radica el productor, menor pérdida de embriones producidos *in vitro* en comparación con la congelación).

Es necesario que los MVZ dedicados a esta especie ahonden más en el tema, para que a su vez sea este servicio un plus en el desarrollo de un hato manejado adecuadamente. Es importante que este tema se explore más en exposiciones ganaderas, así como el material o soluciones se encuentren a la venta de manera más

## **Conclusiones.**

La vitrificación de embriones es una técnica cuya importancia ha ido aumentando al compararse con la técnica tradicional de congelamiento, siendo económica y fácil de realizar si se tiene conocimiento en el tema. En caprinos este tema no ha sido estudiado y es necesario realizar más investigación para poder estandarizar un método en esta especie, lo que podría significar la búsqueda de la mejora genética en México y poder aumentar su producción y extensión como la observada en bovinos y porcinos.

Como resultado de la búsqueda realizada en este trabajo, la mejor etapa de recolección de un embrión es en mórula o blastocisto temprano, siendo necesario un medio de cultivo que pueda estar enriquecido con SFB, ácido ascórbico y óxido nítrico como antioxidantes, insulina si se requiere de más nutrientes.

La técnica en la que se han obtenido mejores resultados post-vitrificación en diversas especies, así como facilidad de uso es la vitrificación con cryoloop con crioprotectores equilibrados de tal manera que se cause la menor toxicidad a los embriones y su correcto desarrollo post-vitrificación.

## **Bibliografía de figuras.**

- Fatet, A.; Pellicer-Rubio, M.T.; Loboef, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 24(3-4), 211-9. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.029
- Scaramuzzi R.J.; Adams N.R.; Baird D.T.; Campbell B.K.; Downing J.A.; Findlay J.K.; Henderson, K.M.; Martin, G.B.; McNatty, K.P.; McNeilly, A.S.; Tsonis, C.G. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev.*5(5), 459-78. doi: 10.1071/rd9930459



## Bibliografía.

- Aguilar, U.; Hernández, J., Domínguez, Y., Gutiérrez, C.G. (2016). Tasa de ovulación, prolificidad y tasa de gestación en cabras tratadas con glicerol por vía oral. *Revista Veterinaria México OA* 3(1), <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.1.360>
- Aguilar, Z. (2010). *Sincronización de celo e inseminación artificial en ovinos*. México, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro [Tesis de licenciatura de Ingeniero Agrónomo Zootecnista].  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5382/T18429%20AGUILAR%20DOMINGUEZ,%20ZAID%20%20MONOG..pdf?sequence=1>
- Aké-Villanueva, J.R., Aké-López, J.R., Centurión, F.G., Ordóñez, E.A. (2015). Efecto de las células del cúmulus sobre la viabilidad postdescongelación de ovocitos bovinos vitrificados. *Revista Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2(5), 183-191.  
<https://doi.org/10.19136/era.a2n5.126>
- Álvarez, L., Ducoing, A.E. (2006). *Aspectos reproductivos del ganado caprino*. Universidad Nacional Autónoma de México.  
[https://amaltea.fmvz.unam.mx/textos/escrito\\_Repro.pdf](https://amaltea.fmvz.unam.mx/textos/escrito_Repro.pdf)
- Barcat, J.A. (2009). Lazzaro Spallanzani y la inseminación artificial. *Revista Medicina* 69(4) 483-486.
- Begin, I., Bhatia, B., Balssadarre, H., Dinnyes, A., Keefer, C.L. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59, 1839-1850.  
doi: [10.1016/s0093-691x\(02\)01257-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01257-8)

- Bosch, P., Blanch, M.S., Ferrero, S., Díaz, H., Piccatto, F., Bosch, R.A. (2006). Desarrollo de embriones caprinos in vitro: Efecto del co-cultivo con células epiteliales de oviducto. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia* 16 (3), 273-281. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15201/15177>
- Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (2002). Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* 277(41), 38895-38900. doi: [10.1074/jbc.M204755200](https://doi.org/10.1074/jbc.M204755200)
- Cabrera, P., Fernández, A., Bastidas, P., Molina, M., Bethencourt, A., Díaz, T. (2006). Vitrificación: Una alternativa para la criopreservación de embriones. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 47 (1), 9-23. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=373139065002>
- Cánovas, S., Coy, P. (2008). Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Revista de Investigación Clínica* 60 (5), 403-413. <https://www.um.es/grupo-fisiovet/CAnovaS-Coy2008.pdf>
- Carillo, D., Lenis, Y., Rodríguez, N. (2014). *Reproducción de la vaca manual didáctico sobre la reproducción, gestación, lactancia y bienestar de la hembra bovina. Capítulo 4: Conceptos básicos de desarrollo embrionario en la vaca.* Universidad de Antioquia. Corporación Universitaria Remington. 69-96.
- Carrillo, E., Meza, C.A., Véliz, F.G. (2010). Estacionalidad reproductiva de los machos cabríos de la raza Alpino-Francés adaptados al subtrópico Mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1(2), 169-178.

- Castañeda, C.A., Kaye, P., Pantaleon, M., Phillips, N., Norman, S., Fry, R., D'Occhio, M.J. (2013). Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology* 79(3) 417-422.
- Castañeda, L. (2009). *Fisiología de la reproducción desde la fecundación hasta la implantación embrionaria*. Colombia, Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias. [Tesis de licenciatura de Medicina Veterinaria]. [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1312&context=medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1312&context=medicina_veterinaria)
- Celestinos, M., Gatica, R. (2002). Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 32(2), 157-165. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200002>
- Correa, L.M. Fernández, J.L. (2017). Influencia de la melatonina sobre la fisiología y la conducta de ungulados. *Revista de Investigación Altoapndin* 19(3), 337-350. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.298>
- Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra, F., Silvestre, P., González-Bulnes, A. (2011). under field conditions. *Reproduction in Domestic Animals* 46(5), 770-775. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01738.x
- Cuicas, R., Aké, R., Estrada, E., Gómez, J., Guadarrama, V., Montiel F., Muñoz, C. y Segura, J. (2018). Efecto del tratamiento de desinfección de los dispositivos intravaginales usados en la concentración de progesterona de vacas bajo condiciones de trópico seco. *Abanico Veterinario* 8 (2), 24-32. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.82.2>
- De Figueiredo, J.R., Ribeiro, A.P., Rocha, V. (2011). In vitro culture of goat preantral follicles. *Acta Scientiae Veterinariae* 39(1), s43-s44.

- De Loos, F.A.M., Jeunken, M., Zeinstra, E., Bevers, M.M. (1992). Structural aspects of bovine maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 31(3), 208-214. doi: 10.1002/mrd.1080310308.
- Delgadillo, J.A., Duarte, G., Flores, J.A., Vielma, J., Hernández, H., Fitz-Rodríguez, G., Bedos, M., Graciela Fernández, I., Muñoz-Gutiérrez, M., Retana-Márquez, M.S., Keller, M. (2012). Control de la actividad sexual de los caprinos sin hormonas exógenas: Uso del fotoperiodo, efecto macho y nutrición. *Revista tropical and subtropical agroecosystems*, 15 (1), s15-s17.
- Duarte, G, Flores, J., Malpoux, B., Delgadillo J. (2008). Reproductive seasonality in females goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Revista Domestic Animal Endocrinology* 35 (4), 362-370. doi: 10.1016/j.domaniend.2008.07.005
- Elliott K, Whelan, J. (1977). The Freezing of Mammalian Embryos. Ciba Foundation Symposium 52. Elsevier. doi: 10.1002/9780470720332.ch9
- Espinoza-Villavicencio, J.L., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J., Aréchiga, C.F. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia* 32(2), 93-99.
- Eurell, J.O., Frappier, B.L. (2006). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6a edición. Willey-Blackwell.
- García, A. (2018). *Fisiología veterinaria*. 2ª edición. Tebar Flores.
- García-Amador M.I., Chávez-Badiola A., Medina-Flores J., Montoya-Sarmiento J.E., Quiroz-Torres E., MartínezArmas R., Ruvalcaba-Castellón LA. (2009) Vitricación en

cryotop: un método altamente eficaz para la criopreservación de ovocitos humanos. *Gaceta Mexicana de Oncología* 8 (5), 189-194.

- Gibbons, A., Cueto, M. (2013). Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. *Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria, Área de investigación en producción animal*. [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_ovina/inseminacion\\_ovinos/28-MANUAL.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/28-MANUAL.pdf)
- Gómez, L., Gaspar, C., Lalli, D., Cobo, A., Zoratti, O. (2016). Sincronización del estro en caprinos de la zona centro de santa fe con doble dosis de prostaglandina en días crecientes. [https://www.produccionanimal.com.ar/produccion\\_caprina/inseminacion\\_transferencia\\_caprino/47-sincronizacion\\_en\\_dias\\_crecientes.pdf](https://www.produccionanimal.com.ar/produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprino/47-sincronizacion_en_dias_crecientes.pdf)
- Gonella, A.M., Atuesta, J.E., Bernal, S.M., Chacón, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4 (1) 65-80.
- González C., Ninoska, B. (1993). Ciclo estrual y momento de ovulación en cabras criollas. *Revista Científica FCV-Luz* 3(1), 99-111.
- González-Silvestry, F. B., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Medina-Reyes, E. I., Kjelland, M. E., Parra-Forero, L. Y., Hernández-Ochoa, I., López-Baños, B., Delgado-Tiburcio, G. A., Romo, S. (2022). Evaluation of chromosome organization and microtubule arrangement in goat (*Capra aegragrus*) oocytes after vitrification, in vitro maturation and fertilization, and early embryo development. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i11.2420>

- Gutierrez, C.G., Ferraro, S., Martinez, V., Saharrea, A., Cortez, C., Lassala, A., Basurto, H., Hernandez, J. (2011). Increasing ovulation quota: more than a matter of energy. *Acta Scientiae Veterinariae* 39(suppl 1), s305-sG316.
- Hafez, B., Hafez, E.S.E. (2000). Reproduction in farm animals. Lippincott Williams & Wilkins. doi: 10.1002/9781119265306
- Hernandez, J., Navarrete, R., Alonso, M., Benitez, J., Gómez, A., Bernal, H., Moreno, L. y Orozco, M. (2015). Efecto del reuso de dispositivos internos de liberación controlada de hormona en la sincronización y comportamiento reproductivo en cabra. *Zootecnia Tropical* 33(3), 249-25.
- Higa, R., Fornes, D. (2011). Rol de las metaloproteasas en la gestación e impacto de la diabetes materna. *SAEGRE* 18(2), 39-45.
- Hong, Q.H., Tian, S.J., Zhu, S.E., Feng, J.Z., Yan, C.L., Zhao, X.M., Liu, G.S., Zheng, S.M. (2007), Vitrification of Boer Goat Morulae and Early Blastocysts by Straw and Open-Pulled Straw Method. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 34-38. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00720.x>
- Horta, F., Alzobi, H., Jitanantawittaya, S., Catt, S., Chen, P., Pangestu, M. Temple, P. (2017). Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice. *Asian Journal of Andrology* 19 (1) 107-112. doi:10.4103/1008-682X.183378.
- Izadi, M.; Eftekhar, S.H.; Akbari, H.; Asadi, M.; Mokhtari, T. (2018). Assessment of Mouse Oocytes Ultrastructure Following Vitrification Before and After in vitro Maturation. *International Journal of Morphology* 36 (1), 180-188. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022018000100180>

- Jiatsa, N., Alves K.A., Alves B.G., Pedrosa, R.M., Bruno, J.B., Lobo, C.H., Bertolini, M., Dos Santos, R.R., Taumaturgo, M.O., Raposo, R.D.S., de Figueiredo, J.R., Smitz, J., Ribeiro, A.P.(2019). Xenotransplantation of goat ovary as an alternative to analyse follicles after vitrification. *Reproduction in Domestic Animals* 54 (2), 216-224. doi: 10.1111/rda.13340
- Lopes, A. (2011). State of the art in the transcervical embryo collection in goats and sheep. *Acta Scientiae Veterinariae* 39, s37-s42
- Lozano, J.F., Uribe, L.F., Osorio, J.H. (2012). Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas. *Veterinaria y Zootecnia* 6(2), 134-147.
- Madrid, N. (2014). Reproducción asistida en los animales domésticos. *Revista Científica FCV-LUZ* 24(1), 7-9.
- Manes, J., Fiorentino, M.A., Hozbor, F., Paolicchi, F., Alberio, R., Ungerferld, R. (2013). Changes in the aerobic vaginal bacteria load and antimicrobial susceptibility after different oestrous synchronisation treatments in goats. *Animal Production Science* 53(6), 555-559. <https://doi.org/10.1071/AN12191>
- Manes, J., Ungerfeld, R. (2015). Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad. *Revista Brasileña de Reproducción Animal* 39 (1), 104-108.
- Marco, F., Jiménez, E., Almela, V., Salvador, J. (2016). Development of Cheaper Embryo Vitrification Device Using the Minimum Volume Method. *PLoS One* 11 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148661>
- Marco-Jimenes, F., Vicente, J.S. (2003). Determinación del tiempo óptimo de maduración in vitro de óvulos de corderas prepúberes. *ITEA Extra* (24), 261-263

- Martínez, R., Hernández, I., Hernández, H., Michel, A., Valencia, J. (2008). Inseminación artificial intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado 40(1), 71-77.
- Mellado, M. (2008). Técnicas para el manejo reproductivo de las cabras en agostadero. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 9(1), 47-63.
- Mogollón, E.M., Burla, A.J. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*. 9(18), 37-47. <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.545>
- Mucci, N., Aller, J.F., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Alberio, R.H. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivo de Medicina Veterinaria* 38 (2), 97-104. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002>
- Murray, R. (2016). *Bioquímica Ilustrada de Harper*, 324.
- Nogueira, R., Costa, A.M., Rocha, L., Pinho, C.A., Lima, K.P., De Figueiredo, J.R. (2011). Addition of insulin to the in vitro culture medium promotes survival and development of follicles preantral goats. *Acta Scientiae Veterinariae* 39.
- Organización Panamericana de la Salud PAHO. (1997). La melatonina como hormona reguladora del sueño. *Revista Panamericana de Salud Pública* 1(3), 241.
- Olivera, J.; Fierro, S.; López, V., Gil, J. (2011). Comparison of prostaglandin and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*. 75(7), 1232-1238. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.036>
- Pastrana, X., Ramírez M., López, J., Villagómez-Amezcuca, E., González, E., Vera, H.R. (2008). Desarrollo folicular y tasa ovulatoria en cabras criollas después de un periodo corto



de consumo de trigo protegido de la degradación ruminal. *Técnica Pecuaria en México* 46(4), 449-462.

- Pérez, R., Gareze, J.A., Fleischmann, R., Ganzábal, A., González, C. (2012). Sincronización de celos en cabras en estación reproductiva: uso de esponjas de medroxiprogesterona o aplicación de prostaglandina después de cinco días de detección de celos. *Revista Científica* 22 (3), 245-251.
- Quintana, M.D., Campos, P.E.C., Herrera, P., Gallego, C.; Padrón, E. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista Salud Animal* 34 (1), 53-56.
- Quites, A., Ernani, L., Coelho, J., Ross, T. (2011). Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. *Ciencia Rural* 41(1), 176-185.
- Ramírez A., Álvarez R, Ducoing, A.E., Trujillo G.A.M., Gutiérrez M., Zarco Q. (2001). Inducción de actividad ovárica en cabras anéstricas mediante diferentes grados de contacto con hembras en estro. *Veterinaria México* 32(1), 13-17.
- Ramírez, O., Bernal, S. (2012). Vitricación de embriones bovinos producidos in vitro. *Actualidad y Divulgación Científica* 5(2), 419-429.
- Recabarren, S.R., Muñoz, P., Lobos, A., Vilches, C., Parilo, J. (2006). Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38(1), 39-46.
- Rizos, D., Gutiérrez, A., Pérez, A., de la Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P. (2003). Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst

Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biology of Reproduction* 68, 236–243.

- Rodríguez, E., López, M., Velilla, E., Oter, M., Paramio, M.T. (1999). Selección de ovocitos de cabras prepúberes mediante la tinción vital brilliant cresyl blue. *Interprofesional para el Desarrollo Agrario* 20 (2), 687-689.
- Ruiz, J., Correa, J.E., Martínez, M. (2010) Vitricación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico en embriones. *Archivos de medicina veterinaria* 42(1), 79-83. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100011>
- Sánchez, G., Ambríz, D., Navarro, M.C. (2011). La reproducción animal asistida: Un instrumento para el concierto de la conservación. *UAM Iztapalapa* 81, 62-67.
- Schwarz, K. R. L., Pires, P. R. L., Adona, P. R., Câmara de Bem, T. H., Leal, C. L. V. (2008). Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 20 (4), 529-536. doi: 10.1071/rd07209
- Silva, G.M., Araújo, V.R., Duarte, A.B.G., Chaves, R.N., Silva, C.M.G., Lobo, C.H., Almeida, A.P., Matos, M.H.T., Tavares, L.M.T., Campelo, C.C., Figueiredo, J.R. (2011). Ascorbic acid improves the survival and in vitro growth of isolated caprine preantral follicles. *Anim. Reprod.* 8(1/2), 4-24.
- Soberano, A., Bravo, A., Olivo, I., Cajero, M., Herrera, J., Navarro, M.C., Segura, J.C. (2011). Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14 (1), 301-307.

- Souza, J., Batista, R., Melo, L., Freitas, V.J. (2011). Biotecnologias reprodutivas aplicadas à conservação de ruminantes ameaçados de extinção – passado, presente e futuro. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 106, pp. 31-38.
- Teijón, J.M., Garrido, A., Blanco D., Villaverde, C., Mendoza C., Ramírez, J. (2006). Fundamentos de la bioquímica estructural. 2ª edición. Tebar
- Torres, V.; Urrego, R.; Echeverri, J.J.; López A. (2018). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10(2), 433-459.  
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>
- Urviola, A.P., Riveros, J.L. (2017). Factores moduladores de la estacionalidad reproductiva en ungulados. *Revista de Investigaciones Altoandinas* 9(3), 319-336.  
<http://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.297>
- Vajta, G., Nagy, Z, P. (2006). Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* 12(6), 779-796. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61091-7.
- Zanetti, E.S., Munerato, M.S., Cursino, M.S., Duarte, J.M. (2014). Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1), 24. doi:10.1186/1477-7827-12-24