

33  
Res.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## FERTILIDAD DE EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS TRANSFERIDOS POR LAPAROSCOPIA EN CABRAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A :  
**VERONICA CABALLERO GUTIERREZ**

ASESORES: MVZ. ADRIANA SAHARREA MEDINA  
MVZ. DVM. JAVIER DE JESUS VALENCIA MENDEZ  
MVZ. MPA. JUAN ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ  
MVZ. MPA. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA  
MVZ. PHD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN





## **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 está 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.

**FERTILIDAD DE EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS  
TRANSFERIDOS POR LAPAROSCOPIA  
EN CABRAS**

Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de  
**Médico Veterinario Zootecnista**

Por

**VERONICA CABALLERO GUTIERREZ**

**ASESORES: MVZ. ADRIANA SAHARREA MEDINA  
MVZ. DVM. JAVIER DE JESUS VALENCIA MENDEZ  
MVZ. MPA. JUAN ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ  
MVZ. MPA. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA  
MVZ. PHD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO**

México, D.F.

1995

# FERTILIDAD DE EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS TRANSFERIDOS POR LAPAROSCOPIA EN CABRAS



## DEDICATORIA

A mis padres: ISABEL GUTIERREZ Y ARMANDO CABALLERO OROZCO

Este nuevo logro en mi vida es de ustedes tanto como mío, y espero que lo disfruten tanto como yo. Gracias por su apoyo y confianza a lo largo de mi vida.

A mis hermanos: LUCILA, J. ALBERTO, J. ARMANDO, ROBERTO, GUSTAVO, M. ANTONIO Y M. ANGEL ( todos son mis hermanos), por su apoyo incondicional aún en los momentos mas difíciles donde me han demostrado su cariño y amor, aunque no me lo digan, yo lo sé. **MUCHAS GRACIAS.**

A los pequeños: ABRIL, ANDREA, LORENA, ERIK E IVAN (mis sobrinos). Ustedes dan a la vida esa chispa de alegría que en ocasiones perdemos de vista los adultos. **GRACIAS POR ESTAR.**

A JACK: Porque no importa a la hora que llegue, y como llegue, me recibes siempre con una gran **sonrisa**, tu nobleza es admirable. **TE ADORO.**

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: Adriana Saharrea, Javier Valencia, Alberto Balcazar, Octavio Mejía y Luis Zarco. Que además de tenerme paciencia en la realización de este trabajo me han demostrado su amistad, y han confiado en mí.

A la gente que me ayudo los días de trabajo en el CEPIER: Israel Brito, José Luis Cerbón, Octavio Mejía, Alberto Balcazar, Carolina Luyando, Julio Rosas, Adriana Saharrea, Javier Valencia, Max, Ramón Mier. Por que más que aprender juntos cirugía, comprendí que la convivencia en grupo no es fácil pero se aprende mucho más.

Al CEPIER: Por los animales otorgados

A Clara Murcia y Susana Rojas: Por los diagnósticos de gestación por medio de RIA. Y sobre todo por el cariño brindado.

A Carolina Luyando: Por esas tardes relajantes y tan llenas de terapia (gratis) en Coyoacán.

A Adriana Saharrea: Por la confianza otorgada para la realización de éste trabajo y por los momentos difíciles en el CEPIER.

A Chepo y Ramón: Por la amistad incondicional a lo largo de toda la carrera y aún más.

A Manuel Sánchez: Por enseñarme a **HACER DE LA FELICIDAD UNA FORMA DE VIDA.**

A mis amigos: Karmina, Emilio, Gachi, Andrea, Isabel, Cecilia, Ismael. Por que la amistad hace que tenga más confianza en la vida, gracias a gente como ustedes.

A los compañeros del Depto. de Reproducción: Carlos Esquivel, Rosa Páramo, Juan Zarate, Mariana Bernal, Araminta, Joel Hernández, Antonio Porras, Miriam Boeta, Salvador Romo, Luis Galicia, Vero Campos, Vero Garza, Pilar, Enrique. Por que en el tiempo que llevo en este departamento solo he recibido cariño de su parte.

A Silvia Carrizosa: Aquí estoy, y estaré hasta el final.

Al laboratorio INTERVET por las esponjas otorgadas, pero más que nada por apoyar y confiar en la investigación.

A Patricia, Martha, Angélica y Rogelio (mis cuñadas (o)): Por su apoyo y amistad, pero sobre todo por aguantar a mis hermanos.

A LOS ANIMALES: AUTORES DE ESTE TRABAJO Y PRINCIPAL  
MOTIVACION DE TODA MI CARRERA. Y AUNQUE A MI ME DOLIO MAS HACER  
ALGUNAS COSAS, PIDO DISCULPAS Y POR USTEDES ESPERO SER MEJOR  
CADA DIA.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION.....	2
II REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Sincronización.....	4
2.2 Superovulación.....	5
2.3 Colección y Transferencia de Embriones..	7
2.4 Congelación de Embriones.....	9
III MATERIAL Y METODOS.....	11
3.1 Animales experimentales.....	11
3.2 Sincronización del ciclo estrol de las donadoras y receptoras.....	11
3.3 Superovulación de las donadoras.....	12
3.4 Detección del celo e inseminación de las donadoras.....	12
3.5 Detección del celo de las receptoras....	13
3.6 Colección embrionaria.....	13
3.7 Evaluación de los embriones colectados..	14
3.8 Congelación de los embriones.....	14
3.9 Descongelación de los embriones.....	15
3.10 Transferencia embrionaria.....	15
3.11 Diagnóstico de gestación de las receptoras.....	16
IV RESULTADOS.....	18
V DISCUSION.....	20
VI CONCLUSIONES.....	22
VII LITERATURA CITADA.....	23

## RESUMEN

Caballero Gutiérrez Verónica, "Fertilidad de embriones frescos y congelados transferidos por laparoscopia en cabras." Asesores: MVZ Adriana Saharrea Medina, MVZ DVM Javier Valencia Méndez, MVZ MPA Alberto Balcázar Sánchez, MVZ MPA Octavio Mejía Villanueva y MVZ PhD Luis Zarco Quintero.

Este trabajo se realizó en época reproductiva utilizando un total de 30 cabras, de las cuales 24 fueron receptoras de embriones y las otras 6 donadoras. Todas las receptoras y 4 de las donadoras fueron sincronizadas con esponjas vaginales que contenían 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA), que se dejaron por un periodo de 12 días y las dos donadoras restantes se sincronizaron con CIDRs (dispositivos intravaginales liberadores de progesterona) que contenían 0.3 g de progesterona, que se dejaron por un periodo de 14 días. Las donadoras sincronizadas con CIDRs se superovularon con hormona folículo estimulante (FSH), que se administro por vía intramuscular cada 12 horas comenzando 2 días antes del retiro del CIDR. La FSH se aplicó en dosis decreciente hasta completar 188 mg. Las hembras donadoras que se sincronizaron con esponja se superovularon con gonadotropina coriónica equina (PMSG o eCG), aplicando 1000 U.I. por vía intramuscular, como dosis única dos días antes del retiro de la esponja. Se dió inicio a la detección de calores a las 24 horas del retiro de la esponja o el CIDR, dándoles monta a las hembras donadoras. El primer día que aceptaron al macho, se consideró como el día cero. Los embriones se obtuvieron al día 6 por medio de laparotomía media ventral. De los embriones transferibles, 26 embriones se congelaron con una congeladora automática a base de baño María y etanol. Los 22 embriones se transfirieron en fresco. El total de cabras receptoras de embriones frescos fueron 11, y de congelados fueron 13. Los resultados obtenidos en cuanto a porcentajes de preñez fueron de 63.63 % para cabras que recibieron embriones frescos, y del 53.84 % para las que recibieron embriones congelados. Estos datos fueron analizados por medio de una ji cuadrada y no existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre embriones frescos y congelados.

## I.- INTRODUCCION

La transferencia de embriones, es una técnica que consiste en obtener los ovocitos fertilizados (embriones) de una hembra, y transferirlos al útero de otra hembra previamente sincronizada. La donadora provee la base genética de la cría y la receptora sirve de incubadora del embrión y el feto resultante (Flores, 1992).

En la actualidad la transferencia de embriones bovinos tiene una amplia aplicación comercial, mientras que en los pequeños rumiantes esto no ha ocurrido o su desarrollo ha sido más lento (Flores, 1992), a pesar de que las primeras transferencias exitosas en el ganado fueron realizadas en 1934 en ovejas y cabras (Warwick *et al.*, 1934). Uno de los motivos ha sido que la transferencia de embriones en pequeños rumiantes, requiere del empleo de técnicas de cirugía mayor, como la laparotomía media ventral. Esto limita el número de veces que se pueden intervenir a las donadoras y a las receptoras de los embriones, por el daño ocasionado por la intervención quirúrgica (Kraemer, 1989).

Existen varios factores que han contribuido a aumentar el interés en el uso de la transferencia de embriones en caprinos, como son el desarrollo de diferentes métodos para colectar los embriones, el intercambio internacional de germoplasma, así como el rescate de especies en peligro de extinción. En la cabra el interés primordial se ha centrado en reproducción de animales superiores para la producción de leche, pelo y carne (Nutti *et al.*, 1987; Holm *et al.*, 1990).

La transferencia embrionaria implica la correcta aplicación de varias técnicas, como son la sincronización y la detección de calores de donadoras y receptoras; la superovulación y los servicios de las donadoras; la colección y evaluación de los embriones para su posterior transferencia. Por lo que la falla en cualquiera de éstas, afectará el éxito de todo el proceso.

Recientemente se han desarrollado técnicas novedosas que solucionan en parte el problema de la cirugía mayor. En este sentido, varios grupos de investigadores desarrollaron métodos laparoscópicos tanto para la obtención, como para la transferencia de embriones en ovinos (Mutiga y Baker, 1984) y caprinos (Flores, 1992).

Killeen y Cafferty (1982), utilizaron una técnica en ovejas para depositar el semen intrauterinamente, visualizando el útero por medio de un laparoscopio, por lo que se realiza una intervención quirúrgica menos traumática, ya que al no exteriorizar el útero por una laparotomía se elimina el estrés de la cirugía mayor, lo cual soluciona en parte el problema de la baja fertilidad. Otro factor que ha limitado el uso de la transferencia de embriones en ovinos y caprinos, es el costo beneficio. Para que esta técnica tenga impacto en el futuro, deberán reducirse los costos y mejorar los porcentajes de gestación en las receptoras.

La transferencia de embriones congelados ofrece una serie de ventajas sobre los embriones frescos, ya que es el medio más sencillo para introducir alta genética del extranjero al rebaño (Kraemer, 1989). Para que la transferencia de embriones congelados sea costeable, la fertilidad debe ser igual o ligeramente inferior a la que se obtiene con los embriones frescos.

Sin embargo, en la actualidad existen diferencias entre la fertilidad de los embriones frescos, contra los embriones congelados. En bovinos se ha reportado que los resultados de preñez con transferencia de embriones frescos son de 65 a 80 %, mientras que con embriones congelados se reduce a 55-70 %, aún en condiciones óptimas (Hasler, 1992).

En caprinos se ha informado un 66.6% de preñez con la transferencia de embriones congelados (Tsunoda *et al*, 1984; Tsunoda *et al*, 1984), mientras que con embriones frescos se reporta un 82 % de preñez (Holm *et al*, 1990).

El objetivo del presente trabajo es comparar la fertilidad obtenida al transferir laparoscópicamente embriones caprinos frescos o congelados.

## II.- REVISION DE LITERATURA

De acuerdo a la presentación de su actividad reproductiva, las cabras están clasificadas como poliéstricas estacionales. La estacionalidad reproductiva está gobernada por la duración del fotoperiodo. La mayor parte de las razas caprinas están en fase anovulatoria (anestro) durante la primavera y el verano, y comienzan a ciclar durante el otoño conforme decrece la duración del día (Valencia *et al.*, 1993; Hafez, 1993).

### 2.1 SINCRONIZACION DE ESTROS.

Para poder controlar en forma adecuada un programa de superovulación y transferencia de embriones es necesario sincronizar la actividad ovárica de los animales.

La sincronización de estros, consiste en controlar el ciclo estral de los animales que están ciclando normalmente, agrupando los períodos de estro en lapsos cortos (Bretzlaff, 1987).

Existen varios métodos para sincronizar el estro, los cuales pueden clasificarse en dos categorías principales: los farmacológicos y los naturales. Los métodos farmacológicos se pueden dividir en dos tipos, basados en los diferentes principios fisiológicos. El primer tipo se basa en la administración de progestágenos o de progesterona natural, para simular la presencia de un cuerpo lúteo. El segundo tipo se basa en la administración de prostaglandina-F2 alfa natural o prostaglandinas sintéticas, para acortar la duración del cuerpo lúteo (Evans y Maxwell, 1990).

Dentro de los progestágenos más utilizados para sincronizar el ciclo estral en cabras se encuentran el acetato de fluorogestona (FGA) en dosis de 45 mg y el acetato de medroxiprogesterona (MAP) en dosis de 50-60 mg, aplicados ambos por vía vaginal durante períodos de 10 a 21 días. También se ha utilizado un dispositivo intravaginal liberador de

progesterona (CIDR), que contiene 0.3 mg de progesterona natural. Otro método consiste en la colección de implantes subcutáneos impregnados de el progestágeno norgestomet, que se colocan generalmente debajo de la piel de la oreja con ayuda de un aplicador especial (Arbiza, 1986; Evans y Maxwell, 1990).

Para apoyar el tratamiento con progestágenos y promover la ovulación, se utiliza PMSG en dosis de 300 a 400 UI al momento de retirar la esponja (Ritar, 1984). Esta hormona tiene actividad tanto de FSH como de LH, predominando la primera (Derivaux, 1976).

Las prostaglandinas naturales o sintéticas se utilizan con frecuencia para la sincronización de calores; pero solamente pueden ser utilizadas en hembras que estén ciclando, lo cual confiere cierta desventaja, comparativamente contra los progestágenos. Las prostaglandinas pueden ser utilizadas en dos esquemas: a) Una sola aplicación (existiendo la posibilidad de no encontrar en ese momento un cuerpo lúteo maduro, por lo cual no se sincronizaría cierto porcentaje de las hembras). b) Utilizando una doble aplicación de prostaglandinas con un intervalo de 11 días, lo cual asegura que si en la primera aplicación existe un cuerpo lúteo lisible, lo alcance a desarrollar para la segunda aplicación, logrando así mayor eficiencia que en el primer esquema de sincronización.

El método natural para sincronizar el estro consiste en introducir machos durante algunas semanas, antes del momento en que se quiere sincronizar a grupos de hembras que estaban aisladas (efecto macho). Este método de sincronización sólo ha demostrado ser efectivo en ciertas épocas del año, normalmente antes del comienzo de la estación reproductiva (Evans y Maxwell, 1990).

## **2.2 SUPEROVULACION**

La superovulación es el proceso por el cual los ovarios son estimulados para producir más del número normal de folículos ovulatorios, logrando así la obtención de más ovocitos para explotar el potencial genéticamente superior de una especie para la transferencia de embriones. Para la superovulación de las hembras donadoras de embriones se utilizan

diferentes hormonas, como son la hormona folículo estimulante (FSH), la gonadotropina coriónica equina (PMSG o eCG), la gonadotropina menopáusica humana (HMG) y el extracto de la pituitaria anterior equina (HAP). Las más utilizadas son la FSH y la PMSG, debido a su fácil adquisición y a su mayor respuesta superovulatoria. Para la superovulación con FSH la hormona debe ser aplicada en repetidas ocasiones, ya que su vida media es corta, además su costo es más elevado, por lo que en muchas situaciones se utiliza PMSG (Doijode *et al*, 1992).

Las dosis empleadas para la superovulación de las diferentes hormonas son muy variables. Tratando de englobar las dosis que utilizaron varios autores, comparando la FSH y la PMSG, se obtuvieron los siguientes datos: Utilizando dosis de FSH que van de 10 a 20 mg, hay un rango en cuanto a la recuperación de embriones que va de un promedio de 4.9 embriones (la recuperación más baja), que se obtuvo con una dosis de 20 mg de FSH, a 11.9 embriones (la recuperación más alta), que se obtuvo con una dosis de 18 mg de FSH; estos datos comparados contra la PMSG en un rango que va de 500 a 1500 UI, aquí la recuperación de embriones más baja en promedio fue de 0.8 embriones, con una dosis de 500 UI y la más alta fue de 7.9 embriones, en promedio utilizando una dosis de 750 UI (Armstrong *et al*, 1983; Mahmood *et al*, 1991; Rosnina *et al*, 1992; Pendleton *et al*, 1992).

Rosnina *et al* (1992) compararon diferentes dosis de PMSG que iban de 500 a 1500 UI, no encontrando diferencia significativa, siendo en promedio la recuperación de embriones más baja de 0.8 (con 500 UI), y la más alta, de 3.8 embriones en promedio (con 1000 UI).

En cuanto a las comparaciones de dosis de FSH, utilizando dosis que van de 10 a 20 mg en promedio, se recolectaron en el rango más bajo 4.9 embriones (utilizando 20 mg de FSH), y el más alto, con 13.5 embriones (utilizando 14 mg de FSH) (Taneja *et al*, 1991; Rosnina *et al*, 1992).

Respecto al número de los cuerpos lúteos existe una mejor respuesta utilizando FSH, que con la PMSG, ya que al superovular con esta última hormona, se obtienen menores rangos ovulatorios con altas cantidades de folículos anovulatorios (Armstrong *et al*, 1982); Nandy *et al* (1990) encontraron que la PMSG produce muchos folículos de Graaf luteinizados.

## 2.3 COLECCION Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Existen diferentes técnicas para la colección y la transferencia de embriones como son: la laparoscopia, la laparotomía media ventral y la transcervical (Agrawal y Bhattacharyya, 1982; Flores, 1992).

La colección de embriones por laparoscopia, se considera una cirugía invasiva menor, ya que elimina la exteriorización y manipulación del tracto genital, evitando de esta manera las adherencias, teniendo entonces como ventaja, que se podrían hacer varios lavados al mismo animal con buenos resultados. Esta técnica requiere de material específico (laparoscopio con sus implementos), y de personal capacitado, por lo que ésta es una técnica sofisticada y costosa (Mckelvey *et al.*, 1986; Scudamore *et al.*, 1991; Flores, 1992).

Para la técnica de colección con laparoscopio se hacen dos incisiones en la pared abdominal, a 2 ó 4 cm de la línea media, y aproximadamente 5 a 7 cm anterior a la ubre. Una es para la inserción del laparoscopio y otra para el manipulador de vísceras. Una vez localizado el útero, se inserta otra cánula en la línea media a 0.5 cm anterior a las otras incisiones, y se introduce una aguja roma para hacer una pequeña incisión en la pared uterina craneal, en la bifurcación del útero. Posteriormente se remueve la aguja y se inserta una sonda de Foley con un estilete metálico a través de la cánula, de manera que éste quede dentro del lumen uterino. Se insufla el balón de 3 ml en el cateter, y se remueve el estilete, en el extremo opuesto del cuerno uterino, se inserta un catéter intravenoso con estilete, se remueve el estilete para permitir el paso del medio, de colección, y este sea recuperado a través de la sonda de Foley, finalmente se obtiene el medio en un filtro colector, y se repite la operación en el otro cuerno uterino (Flores, 1992).

La colección de embriones por el método no quirúrgico (transcervical), se lleva a cabo también estando anestesiada la hembra y colocada en decúbito dorsal. Se pone un espéculo lubricado en la vagina, y se visualiza el cérvix. Se retrae un lado de la os externa del cérvix con unas pinzas de Allis hacia el vestibulo vaginal. Posteriormente se introduce un catéter

dentro de la os externa del cérvix . Se retira el espéculo y se guía el catéter, una vez que el cateter está en el cuerpo dei útero, se infla el balón y se comienza a lavar pasando el medio para embriones (BonDurant *et al*, 1984; Flores, 1992). Este método, es más fácil de aplicar en hembras de varios partos, porque su canal cervical se pasa fácil, pero en hembras primalas se ha obtenido mayor índice de embriones con la colección quirúrgica (Bessoudo *et al*, 1988 ).

Flores-Foxworth *et al* (1992), compararon las técnicas de colección de embriones por laparoscopia y transcervical, y encontraron diferencia en cuanto al número de embriones colectados, obteniendo mejores resultados con la técnica de laparoscopia, ya que por la técnica transcervical puede haber pérdida de embriones por oviducto.

La colección de embriones por el método quirúrgico, es por medio de una laparotomía media ventral, que permite exteriorizar el útero y los ovarios para conocer la respuesta a la superovulación. Agrawal y Bhattacharyya (1982), describieron dos técnicas de colección de embriones. En la primera se inserta la aguja hipodérmica a través de la unión útero-tubárica dentro del lumen del oviducto y por medio de una cánula insertada a través del ostium de la fimbria, se colecta el medio en una caja Petri; en la segunda técnica la aguja hipodérmica es insertada en la punta del cuerno, y se dirige directamente hacia el cuerpo del útero; el medio se colecta en una caja Petri de la base del cuerno uterino, a través de un tubo de polietileno.

La técnica de colección de embriones por laparotomía trae consigo traumas postoperatorios muy importantes, como son las adherencias que se ocasionan por el proceso quirúrgico, las cuales interfieren con la fertilidad posterior de la donadora (BonDurant *et al*, 1984).

La técnica de elección para la transferencia de embriones es la de laparoscopia, ya que por medio de una cirugía menor se puede conocer la respuesta ovárica, para depositar el embrión en el cuerno ipsilateral al mejor o mejores cuerpos lúteos, y permite exteriorizar la punta del cuerno uterino, para introducir el embrión (Flores 1992). Agrawal y Bhattacharyya (1982), obtuvieron un 40 % de gestaciones con transferencia no quirúrgica (transcervical). La

desventaja de esta técnica, es que no se sabe con certeza la respuesta de los ovarios, por lo que se ignora la presencia del cuerpo lúteo.

La transferencia de embriones por laparotomía media ventral, también permite la evaluación de la superovulación al exteriorizar el útero y ovarios, pero tiene la desventaja de que hay formación de adherencias, las cuales pueden verse disminuidas al minimizar el manejo del tracto reproductivo e irrigar constantemente el útero con solución salina heparinizada (Armstrong *et al*, 1983).

## **2.4 CONGELACION DE EMBRIONES**

El desarrollo de métodos efectivos para congelar embriones de mamífero, es de gran importancia desde el punto de vista clínico, de investigación y de aplicación comercial. Permite crear bancos de germoplasma de animales que son de importancia tanto económica como científica, y facilita la movilización internacional de animales libres de enfermedades (Smith *et al*, 1994). Además, facilita la programación de las hembras receptoras y la realización del trasplante en un momento preciso, de acuerdo a los días después del estro de la receptora y el estadio del embrión (mórula o blastocito en diferentes etapas de desarrollo).

En 1976, Bilton y Moore informaron por primera vez el nacimiento de crías caprinas obtenidas al transferir embriones congelados-descongelados.

Para la congelación de los embriones caprinos se han utilizado diferentes crioprotectores, como el glicerol (Rao *et al*, 1988; Wang *et al*, 1988), el sulfóxido de dimetilo (DMSO), (Rao *et al*, 1988; Amoha y Gelaye, 1991), o el etilenglicol (Le Gal *et al*, 1993). La sobrevivencia de los embriones caprinos es ligeramente superior con glicerol que con DMSO (Amoha y Gelaye, 1991). Antes de la congelación, los crioprotectores se han añadido en dos pasos (Rao *et al*, 1988; Wang *et al*, 1988; Le Gal *et al*, 1993) o tres pasos (Le Gal, *et al*, 1993).

El envase de elección para los embriones, ha sido la pajilla francesa de 0.25 ml (Rong y Guangya, 1989; Le Gal *et al*, 1993), aunque en los caprinos, también se han utilizado tubos de vidrio de 5 ml (Rao *et al*, 1988), o ampolletas (Wang *et al*, 1988).

Existen diversos protocolos de congelamiento, que por lo general no presentan grandes variaciones. Los embriones, una vez envasados, se llevan de temperatura ambiente a 0°C y se enfrían a 1°C/min hasta -6°C, temperatura a la que se induce la formación de cristales dentro de la pajilla (seeding). Posteriormente se desciende la temperatura a 0.5°C/min hasta -30°C (Rong y Guangya, 1989), ó -35°C (Wang *et al*, 1988) y se sumergen directamente en el nitrógeno líquido a -196°C. El almacenamiento a largo plazo de los embriones congelados y mantenidos a -196°C, permite conservarlos indefinidamente (Amoah y Gelaye, 1991).

Al comparar los embriones frescos contra los embriones congelados, se observó una disminución en la sobrevivencia después del trasplante de un 15 a 20% para los embriones congelados (Trounson y Pugh, 1982).

### III.- MATERIAL Y METODOS.

Este trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el Km. 29 de la carretera federal México-Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° latitud oeste, a una altura de 2760 msnm, con una temperatura promedio de 19° C. El clima de la región es de tipo c (w) (w) b (ij), que corresponde a semifrío - semihúmedo, con lluvias en verano y una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm (García, 1981).

#### 3.1 Animales Experimentales.

Se utilizó un total de 30 cabras adultas de las razas Alpino Francesa, Toggenburg, Murciana y cruzas, de diferente número de parto, de las cuales 6 fueron donadoras de embriones y las 24 restantes receptoras.

Los animales fueron mantenidos en condiciones de manejo intensivo, y alimentados con alfalfa achicalada, heno de avena, ensilado de maíz y concentrado.

#### 3.2 Sincronización del ciclo estral de las donadoras y receptoras.

Las 24 hembras receptoras y 4 de las donadoras fueron sincronizadas con esponjas intravaginales que contienen 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA)\*, durante un periodo de 12 días; dos días antes de retirar la esponja se aplicaron 15 mg de luprostiol\*\* (prostaglandina sintética), por vía intramuscular con la finalidad de lisar los cuerpos lúteos que aún estuviesen presentes (Hafez, 1993).

\* Chrono-gest. Intervet, S.A. de C.V. México, D.F.

\*\* Prosolvin. Intervet, S.A. de C.V. México, D.F.

Dos donadoras fueron sincronizadas con CIDRs\* (Dispositivos intravaginales liberadores de progesterona), (0.3 g de progesterona), que se dejaron por un período de 14 días (Bessoudo *et al.*, 1988).

### 3.3 Superovulación de las donadoras.

Para la superovulación de las 4 donadoras que fueron sincronizadas con esponjas vaginales, se aplicaron 1000 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG)\*\*, administrada por vía intramuscular dos días antes del retiro de la esponja (Goel y Agrawal, 1990; Cameron y Batt, 1991).

Las otras dos donadoras fueron superovuladas con 188 mg (dosis total) de hormona folículo estimulante (FSH)\*\*\*, en dosis decreciente que se aplicaron de la siguiente manera: al día 12 de colocado el CIDR 28 mg en la noche. El día 13, 28 mg en la mañana y 28 mg en la noche. El día 14, 24 mg en la mañana y 24 mg en la noche. El día 15, 20 mg en la mañana y 20 mg en la noche. El día 16, 16 mg en la mañana (J. Hepburn, comunicación personal).

### 3.4 Detección del celo e inseminación de las donadoras.

A partir de las 24 horas del retiro de la esponja o del CIDR, se detectaron los celos con machos provistos con mandil.

Las donadoras detectadas en celo recibieron monta natural cada 12 horas, y las de CIDR cada 6 horas mientras aceptaron al macho. El día en que las donadoras se sirvieron por primera vez se consideró como el día cero.

---

\* CIDR. Eazy Breeder. New Zeland.  
\*\* Folligon. Intervet, S.A. de C.V. México, D.F.  
\*\*\* Folltropin V. Vetrefarm. Ontario, Canadá.

### **3.5 Detección del celo de las receptoras.**

Las receptoras fueron detectadas a partir de las 24 horas del retiro de la esponja con machos provistos con mandil.

Las receptoras detectadas en celo sólo fueron identificadas, y se tuvo especial cuidado que estuvieran en sincronía con las hembras donadoras.

### **3.6 Colección embrionaria.**

La colección de los embriones se realizó el día 6 del ciclo, considerando como día cero al día del inicio del estro y se realizó mediante laparotomía media ventral.

Las cabras se dietaron de agua y alimento 24 horas previas a la obtención de embriones (Flores, 1992).

Para realizar la intervención quirúrgica se sometió a las cabras a anestesia general. Se tranquilizaron con hidrocloreto de xilacina al 2 %, utilizando una dosis de .01 g/ kg de peso vivo por vía intramuscular; 10 minutos posteriores a la tranquilización se aplicó ketamina base como anestésico, a una dosis de 2 mg/kg de peso vivo por vía endovenosa, para lograr una anestesia disociativa (Rosnina *et al.*, 1992).

Para la técnica de colección de embriones por laparotomía se realizó una incisión sobre línea media de 10 cm de largo y 4 cm anterior a la ubre, suficiente para permitir exteriorizar el útero y los ovarios. El útero se estuvo irrigando con solución salina fisiológica constantemente con la finalidad de evitar las adherencias. Para conocer la respuesta a la superovulación, se consideraron animales superovulados aquellos que presentaron más de tres cuerpos lúteos. La calidad de los cuerpos lúteos se determinó en base a su tamaño y color. Posteriormente se lavó por separado cada cuerno uterino mediante la inserción de un angiocatéter calibre 18 G. En la punta del cuerno uterino se introdujeron aproximadamente 40 ml de medio PBS (solución salina buferada), adicionado con 4 % de SFB (suero fetal bovino). El medio se recuperó a través de una sonda de Foley calibre 10 fr, colocada en la base del cuerno. El medio colectado se concentró en un filtro Em Con. Finalmente al útero se le hizo

una sutura con Dexon 4 ceros en el orificio por donde pasó la sonda de Foley, y se regresó a la cavidad abdominal. La incisión fue suturada por planos con Dexon de 2 ceros y la piel con Nylon. Los animales fueron medicados con antibiótico de larga acción por vía intramuscular (Flores, 1992; técnica modificada).

### 3.7 Evaluación de los embriones colectados.

Todos los embriones colectados fueron posteriormente evaluados de acuerdo a su estadio y clasificados en una célula, 2 células, 4-8 células, 8-16 células, mórula temprana (16-32 células), mórula compacta (32-64 células), blastocito temprano (160 células), blastocito maduro (200 células) y blastocito eclosionado ( más de 200 células), y clasificados en base a su calidad en excelentes (1), buenos (2), regulares (3) y malos (4) (Pedleton *et al.*, 1992).

Únicamente se transfirieron aquellos embriones que estaban en un estadio clasificado de mórula compacta en adelante, y que se hubieran clasificado como excelentes o buenos.

La figura 1 muestra algunas de las estructuras (óvulos y embriones) no transferibles y embriones transferibles (mórulas y blastocitos).

### 3.8 Congelación de los embriones.

Los embriones transferibles se colocaron en un medio que contenía PBS, más 0.4 % de BSA (Albúmina sérica bovina), más 10 % de glicerol, y se envasaron en pajillas francesas de 0.25 ml. En cada pajilla, se envasaron dos embriones transferibles cuyo estadio y calidad se anotó en uno de los extremos.

Para la congelación de los embriones se utilizó una congeladora automática a base de baño María de etanol.

Los embriones se congelaron de acuerdo al siguiente programa: de 0°C a -6°C a 1°C/min, al llegar a -6°C se indujo la cristalización (seeding) y permanecieron durante 10 min a -6°C, posteriormente a 0.3°C/min hasta -36°C, después de lo cual, se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (Wang *et al.*, 1988).

### **3.9 Descongelación de los Embriones**

Para su descongelamiento, una vez identificada la pajilla se mantuvo en el aire, a temperatura ambiente durante 15 seg y en baño María a 35° C, hasta que desaparecieron los cristales de hielo (aproximadamente otros 15 seg), (John Hepburn, comunicación personal). Inmediatamente después la pajilla se secó, se cortó el extremo sellado y con la ayuda de un estilete se bajó el embrión al primer medio de descongelación.

Para la remoción del glicerol, los embriones permanecieron 5 min en cada uno de los siguientes medios:

1. PBS, 0.4 % de BSA, 1M de sacarosa y 6% de glicerol.
2. PBS, 0.4 % de BSA, 1M de sacarosa y 3% de glicerol.
3. PBS, 0.4% de BSA, 1M de sacarosa.
4. PBS, 0.4% de BSA.

Al terminar la descongelación, los embriones se evaluaron para determinar su viabilidad, y posteriormente se envasaron en una pajilla de 0.25 ml para su transferencia.

### **3.10 Transferencia embrionaria.**

La transferencia de los embriones se realizó con la ayuda de un laparoscópio. Los embriones en fresco se transfirieron el mismo día en que se colectaron (día 6) y para los embriones congelados se verificó que las hembras receptoras se encontraran en el día 6 del ciclo. En todos los casos se transfirieron dos embriones por receptora.

Los animales que se transfirieron fueron sometidos a dieta de agua y alimento 24 horas previas a la transferencia.

Para su tranquilización se utilizó hidrocloreuro de xilacina al 2 % (0.01 g/kg de peso por vía intramuscular), y como anestesia se utilizó ketamina base ( 2 mg/kg de peso por vía endovenosa), (Rosnina *et al*, 1992).

Para la transferencia de los embriones se colocó a las cabras en una mesa reclinable y se puso al animal de modo que su cabeza quedara hacia abajo en un ángulo aproximado de 45 grados, esto con la finalidad de localizar el útero más fácilmente con el laparoscopio.

Se hicieron dos pequeñas incisiones en la pared abdominal, aproximadamente a 4 cm a ambos lados de la línea media y 10 cm anteriores a la ubre. Por una de las incisiones se introdujo una cánula para el laparoscopio, y por la otra incisión una segunda cánula para las pinzas de Babcock.

Después de revisar el aparato reproductor, se visualizaron los ovarios con el laparoscopio y se localizó el ovario que presentó mejor o mejores cuerpos lúteos, para posteriormente extraer a través de la herida la punta del cuerno ipsilateral al mejor cuerpo lúteo, con la finalidad de exteriorizarlo. Se realizó una punción en la pared uterina con un angiocatéter calibre 18 G, para posteriormente introducir los embriones con la ayuda de un catéter Tom Cat.

Después de la transferencia, el cuerno uterino se regresó a la cavidad abdominal y se suturaron cada una de las incisiones con un punto de Dexon 2 ceros y Nylon en piel. Todas las receptoras recibieron un antibiótico de larga acción por vía intramuscular (Flores, 1992; Técnica modificada).

### **3.11 Diagnóstico de gestación en las receptoras transferidas.**

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo de diferentes maneras:

- Verificando el no retorno al estro, utilizando machos receladores provistos de un mandil, entre los días 18 a 22 del ciclo estral (Flores, 1992 ).

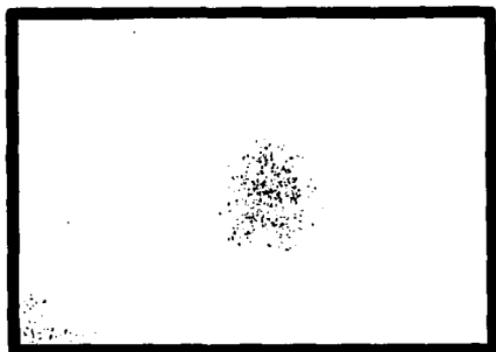
- Realizando un muestreo sanguíneo entre los días 21 a 23 del ciclo estral, por punción yugular en tubos heparinizados. Las muestras se almacenaron en una caja con hielo y se centrifugaron para la separación del plasma, el cual fue congelado a una temperatura de -20° C hasta que se realizó la determinación de progesterona mediante el método de Radioinmunoanálisis en fase sólida (Srikandakumar et al, 1986) en el laboratorio de

Endocrinología del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Las muestras de animales cuyos valores fueron mayores a 1.0 ng/ml de progesterona fueron dadas como positivas al diagnóstico de gestación, y las de menos de 1.0 ng/ml de progesterona fueron dadas por negativas (Flores, 1988).

- Al día 40 se utilizó ultrasonografía de imagen para confirmar el diagnóstico de gestación. Se consideraron gestantes aquellos animales que presentaban carúnculas y cotiledones o la vesícula con el producto (Bretzlaff *et al.*, 1993).

Los porcentajes de preñez obtenidos en el grupo de receptoras que recibieron embriones frescos o embriones congelados fueron comparados por medio de la prueba de Ji cuadrada (Daniel, 1985).

# Figura 1



1) *Ovulo.*



2) *Ovulos y embriones no transferibles.*



3) *Un blastocito maduro, dos expandidos de calidad excelente y un óvulo (abajo).*



4) *Dos blastocitos maduros y una mórula compacta calidad pobre (izquierda).*

#### IV.-RESULTADOS

De las 6 cabras donadoras se obtuvieron 48 embriones transferibles, 22 de los cuales se transfirieron en fresco y 26 se congelaron.

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de fertilidad. No existió diferencia significativa en el porcentaje de preñez entre el grupo de receptoras que recibieron embriones frescos (63.63%), y las que recibieron embriones congelados (53.84%) ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 1. Porcentaje de preñez obtenido en cabras receptoras de embriones frescos y congelados

Tipo de embrión	Número de receptoras	Porcentaje de preñez
FRESCOS*	11	63.63a
CONGELADOS*	13	53.84a

\* Cada receptora recibió 2 embriones

Valores que comparten literal no son estadísticamente diferentes ( $P > 0.05$ )

De las 11 receptoras de embriones frescos, parieron 7, de las cuales 3 tuvieron parto gemelar, lo que representa una prolificidad de 1.42. De las 13 receptoras de embriones congelados, una aborto y 6 llegaron al parto, teniendo 3 de ellas parto gemelar (prolificidad de 1.50) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Prolificidad obtenida en las cabras receptoras de embriones frescos y congelados**

Tipo de embrión	Número de receptoras	Prolificidad
FRESCOS*	11	1.42a
CONGELADOS*	13	1.50a

\*Cada receptora recibió 2 embriones

No existió diferencia significativa ( $P > 0.05$ )

**Cuadro 3. Diagnóstico de gestación midiendo niveles de progesterona por radioinmunoanálisis (RIA).**

METODO DE DIAGNOSTICO	RECEPTORAS DE EMBRIONES			
	FRESCOS Gestantes/Transferidas (%)	CONGELADOS Gestantes/Transferidas (%)		
RIA(Progesterona)	8/11	72.72	9/13	69.23

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## V.- DISCUSION

En el Cuadro 1 se puede observar que no existió diferencia significativa en el porcentaje de gestaciones obtenida al transferir embriones frescos (63.63%), o congelados (53.84%).

El porcentaje de gestación obtenido al transferir embriones frescos (63.63) es similar al encontrado por otros autores, quienes han obtenido porcentajes de gestaciones de un 75% (Kraemer, 1989), y 76 % (Vallet *et al.* 1991 citado por Thibier y Nibart 1992) al transferir embriones frescos por medio de laparoscopia.

Al comparar los porcentajes de gestaciones de 53.84% obtenidos en este trabajo con embriones congelados contra los de otros autores, se observa una mayor variabilidad en los resultados. Así, Mani *et al.* (1994) informaron un mejor porcentaje de fertilidad (66.6%), mientras que Rao *et al.* (1988) informan un 37.5% de gestaciones en transferencias con embriones congelados. Estas diferencias pueden deberse a que al transferir embriones congelados puede haber diferencias en la sobrevivencia debido a diferencias en el método que se utilizó para congelarlos, al crioprotector o al método de descongelación (Rao *et al.* 1988).

Una desventaja relativa de los embriones congelados, es el tiempo que se requiere para la descongelación, que en este trabajo fue de 20 min (en 4 pasos) y su sincronización con la cirugía. Rao *et al.* (1988), utilizaron un método para descongelar embriones caprinos en etapas más tempranas de desarrollo (16 células), en sólo 2 pasos, pero cada paso era de 10 min, por lo que aunque redujeron el número de pasos, el tiempo sigue siendo el mismo.

A pesar de que se obtienen menores porcentajes de gestaciones al transferir embriones congelados, esta técnica permite la posibilidad de que sean almacenados por tiempo indefinido sin afectar su viabilidad (Amoah, 1991). Lo anterior, podría servir para gestar cabras receptoras inducidas a ciclar durante la época de anestro, o preservar el material genético de animales superiores. La congelación de embriones es indispensable cuando se pretende realizar movilización internacional de embriones.

No se encontró diferencia significativa ( $P > 0.05$ ), en cuanto a la prolificidad entre las hembras receptoras de embriones frescos (1.50), contra las receptoras de embriones congelados (1.42), y tanto en el primero como en el segundo grupo, el número de partos dobles fue igual (3/7) (Cuadro 2). Esto indica que la mortalidad embrionaria posterior a la transferencia fue similar en ambos grupos, lo que sugiere que la congelación no causa un daño marcado en los embriones. Armstrong y Evans (1983), obtuvieron una prolificidad de 1.3 transfiriendo 2 embriones frescos a cada cabra receptora, no así en las cabras que se les transfirió un embrión, las cuales tuvieron una prolificidad de 0.5.

Existe un número mayor de cabritos nacidos si se transfieren 2 embriones en lugar de uno, debido a que cuando hay dos embriones existe un sinergismo en el mensaje antiluteolítico para el reconocimiento de la gestación. Este posible mensaje puede ser una mayor cantidad de protefna trofoblástica, la cual impide el proceso luteolítico enviando mensajes al endometrio, para que se realice así el proceso de implantación (Amoah y Gelaye, 1991).

Al analizar el porcentaje de gestaciones obtenidos por medio de radioinmunoanálisis (RIA) al día 21 del ciclo estral tanto de hembras transferidas con embriones frescos como de congelados, es diferente al porcentaje de fertilidad (RIA: 72.72 % y 69.23 % respectivamente), (Hembras Paridas: 63.63 % y 53.84 %), esta diferencia se debe a que con RIA se pueden obtener "falsos positivos". debido a que al inicio de la gestación puede haber mortalidad embrionaria temprana la cual puede ocurrir poco después de analizar los resultados del RIA, o pudiera existir una mucometra, la cual ocasiona que se mantenga el cuerpo lúteo por más tiempo presentado niveles de progesterona elevados ( Armstrong y Evans, 1983).

## **VI.- CONCLUSIONES**

**En este trabajo se concluye que la transferencia laparoscópica de embriones frescos o congelados son igual de factibles, ya que no existen diferencias significativas en la fertilidad.**

**La prolificidad, tampoco se ve dañada por el hecho de congelar los embriones, por lo que se tiene la misma probabilidad de éxito en cualquiera de los dos casos.**

## LITERATURA CITADA

Agrawal, K.P. and Bhattacharyya, N.K.: Non surgical transplantation of embryos in goats. Proc. 3rd Int. Cong. on Goat Prod. and Disease. Dairy Goat J. Publ. Co. 340 (1982).

Agrawal, K.P.; Mongha, I.V. and Bhattacharyya, N.K.: Collection and transfer of embryos in goats: Surgical method. Indian Vet. J. 59: 297-303 (1982).

Amoah, E.A. and Gelaye, S.: Embryo recovery, evaluation, storage and transfer in goats. Small Ruminant Research. 6: 119-129 (1991).

Armstrong, D.T.; Pfitzner, A.P.; Porter, K.J.; Warnes, G.M.; Janson, P.O. and Seamark, R.F.: Ovarian responses of anestrous goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotropin. Anim. Reprod. Sci. 5: 15-23 (1982).

Armstrong, D.T. and Evans, G.: Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology. 19: 31-42 (1983).

Armstrong, D.T.; Pfitzner, A.P.; Warnes, G.M. and Seamark, R.F.: Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. J. Reprod. Fert. 67: 403-410 (1983).

Arbiza, I.: Producción de Caprinos 1a ed. Ed. AGT, Editors S.A. México D.F., 1986.

Bessoudo, E., Davies, L., Coonrod, S., Gamez, J. and Kraemer, D.: Non-surgical collection of caprine embryos under commercial quarantine conditions. Theriogenology. 33:221 (1988).

Bilton, W.F. and Moore, N.W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci. 29: 125-129 (1976).

BonDurant, R.H.; Skirrow, S.; Anderson, G.B.; Hanson, F. and Rogers, W.H.: Nonsurgical collection of blastocysts from dairy goats. Theriogenology. 22: 423-431 (1984).

Bretzlaff, K.: What about estrous synchronization in small ruminants? Society for Theriogenology Newsletter. 10 (1) (1987).

Bretzlaff, K.; Edwards, J.; Forrest, D. and Nuti, L.: Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. Veterinary Medicine, January, 12-24; (1993).

Cameron, N. and Batt, A.: PMSG may directly stimulate ovulation in female goats. Anim. Reprod. Sci. 25: 233-239 (1991).

Daniel, W.W. Bioestadística. Editorial Limusa, México, D.F. 1985.

Derivaux, J.: Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1976.

Doijode, S.V.; Bakshi, S.A.; Tandle, M.K. and Mamde, C.S.: Studies on superovulation and recovery of embryos in goats treated as donors. Indian. J. Anim. Reprod. 13: 192-194: 1992.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. 4a. Ed. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. 1990.

Flores, P.G.: Diagnóstico de gestación en ovejas mediante un radioinmunoanálisis rápido de los niveles de progesterona en el día 18 post-servicio. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool., Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1988.

Flores-Foxworth, G.; McBride, B.M.; Kracmer, D.C. and Nuti, L.C.: A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. Theriogenology, 37: 213 (1992).

Flores, F.G. Embryo Transfer in kenyan goats. Proceedings of a workshop on embryo transfer. Naivasha (1992).

García, M.E.: Modificación del sistema de clasificación climatológica de koeppen. Ed. Offset Larios S.A., México. (1981).

Goel, A. and Agrawal, K.: Superovulation and embryo collection in Jamunapari goats. Theriogenology, 33: 232. (1990).

Hafez, E. Reproduction in Farm Animals. 6th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1993.

Hasler, J.F.: Current Status and Potential of Embryo Transfer and Reproductive Technology in Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 75: 2857-2879 (1992).

Holm, P., Petersen, J., Hepburn, K., Krogh, Dagnaes-Hansen, F. and Callesen, H.: Transfer of angora goat embryos imported into Denmark from New Zealand under quarantine conditions. Theriogenology, 33: 252 (1990).

Killen, I.D. and Cafferty, G.J.: Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscopy. Aust. Vet. J. 59 1982.

Kraemer, D.C.: Embryo collection and transfer in small ruminants. Theriogenology, 31: 141-148 (1989).

Le Gal, F.; Baril, G.; Vallet, J.C. and Leboeuf, B.: In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. Theriogenology, 40: 771-777 (1993).

Mahmood, S.; Koul, G.L. and Biswas, J.C.: Comparative efficacy of FSII-P and PMSG on superovulation in Pashmina goats. Theriogenology, 35: 1191-1196 (1991).

McKelvey, W.A.C.; Robinson, J.J.; Aitken, R.P. and Robertson, I.S.: Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. Theriogenology, 25: 855-865 (1986).

Mani, A.U., Watson, E.D. and McKelvey, W.A.C.: The effects of subnutrition before or after embryo transfer on pregnancy rate and embryo survival in does. Theriogenology, 41: 1673-1678 (1994).

Mutiga, E.R. and Baker, A.A.: Transfer of sheep embryos through a laparoscope. Vet. Rec. 114: 401-402 (1984).

Nandy, D.K.; Agarwal, K.P. and Bhattacharya, N.K.: Ovarian response to superovulation in nondescript does. Indian J. Anim. Sci. 60: 972-973 (1990).

Nuti, L.C., Minhas, B.S., Baker, W.C., Capehart, J.S. and Marrack, P.: Superovulation and recovery of zygotes from nubian and alpine dairy goats. Theriogenology, 28: 481-488 (1987).

Pendleton, R.J.; Youngs, C.R.; Rorie, R.W.; Pool, S.H.; Memon, M.A. and Godke, R.A.: Follicle stimulating hormone versus pregnant mare serum gonadotropin for superovulation of dairy goats. Small Ruminant Research, 8: 217-224 (1992).

Rao, V.H.; Sarmah, B.C.; Agrawal, K.P.; Ansari, M.R. and Bhattacharyya, N.K.: Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. Anim. Reprod. Sci. 16: 261-264 (1988).

Ritar, A.J., Maxwell, W.M. and Salamon, S.: Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge-PMSG treatment. J. Reprod. Fert. 72: 559-563 (1984).

Rong, R. and Guangya, W.: Simplified quick freezing of goat embryos. Theriogenology, 31: 252 (1989).

Rosnina, Y.; Jainudeen, M.R. and Nihayah, M.: Superovulation and egg recovery in goats in the tropics. The Veterinary Record, 1: 97-99 (1992).

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

Smith, C.L.; Peter, A.T. and Appell, K.M.: Effects of stepwise cryodilution to freezing and stepwise post-thaw rehydration on viability of ovine embryos. Theriogenology, 41: 1267-1271 (1994).

Srikandakumar, A.; Ingraham, R.H.; Ellsworth, M.; Archbald, L.F.; Liao, A. and Godke, R.A.: Comparison of a solid phase no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. Theriogenology, 26: 779-793 (1986).

Taneja, M.; Pawshe, C.H.; Guron, C.S.; Singh, G.; Totey, S.M. and Talwar, G.P.: Superovulation of Barbari goats with Follitropin: the effect of dose. Theriogenology, 35: 280 (1991).

Thibier, M. and Nibart, M.: Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. Animal Reproduction Science, 28: 139-148 (1992).

Trounson, A. and Pugh, A.: Embryo Freezing. In: Proc. Symp. Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats. Canberra, Australia, May, Aust. Soc. Reprod. Biol. 53-58 (1982).

Tsunoda, Y., Wakasu, M., Yasui, T. and Sugie, T.: Micromanipulation and freezing of goat embryos. 10th Inter.Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champa 249-250 Univ. of Illinois (1984).

Valencia, J., Zarco, L., Ducoing, A., Murcia, C. and Navarro, H.: Breeding season of criollo and Granadina goats under constant nutritional level in the Mexican highlands. Livestock Reproduction in Latin America. Intern. Atomic Energy Agency. Vienna, 1990.

Wang, G., Bachuca, Ma., Wang, J., Qian, J. and Zhang, Y.: Embryo freezing and transfer in milk goats. Theriogenology 29:322 (Abstr.) (1988).

Warwick, B.L., Berry, R.O. and Horlacher, W.R.: Result of mating rams to angora female goats. Proc. 27th Ann. Meet. Am. Soc. Anim. Prod. 225-227 (1934).