

01621
66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PRÁCTICA PROFESIONAL SUPERVISADA
PRODUCCIÓN CAPRINA
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
FRANCIA, NOUZILLY.**

**PRODUCCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* EN CAPRINOS**

T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

MARIANA PEDERNEIRA ROMANO

ASESOR: DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR



MÉXICO, D.F.

I

MAYO 2003



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: MARIANA PEDERNEIRA ROMAN
FECHA: 27/05/2003
FIRMA: [Signature]

DEDICATORIA

A todos aquellos animales que se han sacrificado por la enseñanza y la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mamá y papá, que siempre me han apoyado en todo, me han enseñado, han sido un ejemplo y me permitieron esta gran oportunidad de estudiar en Francia, los quiero muchísimo.

A mis hermanos Esteban, Cecilia y Julieta, que siempre han estado a mi lado que me han ayudado, han sido una guía y con cada uno he compartido momentos inolvidables.

A mi novio Sergio, que conocerte y compartir tanto tiempo contigo me ha hecho la más feliz, siempre me has motivado a seguir adelante y te agradezco todo el apoyo que me diste cuando estuve fuera de México. Te amo.

A toda la familia de Argentina, que a pesar de la distancia siempre hemos estado unidos.

A mis amigos:

Paulina, Paloma y Gabriela que son mis hermanitas del alma, que hemos ido creciendo juntas y que forman parte de mi vida.

Las Reinis: Gaby L, Gaby S, Tere, Lilia y Dinora que sin ustedes la carrera no hubiera sido la misma, todos los momentos que compartimos dentro de la facultad buenos y malos y los momentos fuera han sido maravillosos y muy divertidos. Los amigos que se hacen en la universidad nunca se pierden así que nos vemos en La Placa.

Mis hermanos de sopa: Mauro y Paloma, que a pesar que nos veamos poco seguimos juntos y compartiendo cosas que las recordaremos en el asilo. A Ruth, Mercedes y Lisette.

A Tecuani, Godofreda, Garufa, Moka, Camila, Cuasi, Mesechino y Che que a pesar de la lata que dan las quiero mucho.

A Carlos, Arantza y Lucy que me recibieron con una sonrisa en el laboratorio y me enseñaron las bases para mi estancia en Francia.

Al INRA por haberme aceptado. A Gérard Baril que desde el primer día me recibiste con los brazos abiertos y me dedicaste tu tiempo y me enseñaste muchas cosas, eres un ejemplo a seguir. A Yves Cognié y Nati Poulin por todo lo que me enseñaron y me permitieron hacer. A Marylin y Martine, que sin ustedes la hora del café no hubiera sido tan divertida.

A la UEFA que me recibieron super bien e hicieron mi estancia en Tours muy agradable a pesar del frío y estar lejos de casa.

A Micheline, que a pesar de la dificultad de comunicarnos al principio logramos una gran amistad y me enseñaste con tu experiencia muchas cosas de la vida.

A todos los profesores de la facultad que me aportaron su conocimiento y experiencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me hace sentir con orgullo que soy Puma.

CONTENIDO

Página

PRODUCCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* EN CAPRINOS

RESUMEN.....	1
PRESENTACIÓN.....	2
OBJETIVO.....	2
1-INTRODUCCIÓN.....	3
1.1- Historia.....	3
1.2- Importancia.....	4
2- PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	6
2.1- Producción de embriones <i>in vivo</i>	6
2.1.1- Fisiología de la reproducción caprina.....	6
2.1.2- Superovulación.....	11
2.1.3- Problemas asociados a la superovulación.....	14
a) Variabilidad de la respuesta ovulatoria.....	15
b) Luteólisis prematura.....	16
2.1.4- Fecundación.....	17
2.1.5- Colección de embriones.....	18
2.1.6- Métodos de transferencia de embriones.....	20

	Página
2.2- Producción de embriones <i>in vitro</i>	22
2.2.1- Colección de ovocitos.....	22
2.2.2- Maduración de ovocitos.....	23
2.2.3- Fecundación.....	24
2.2.4- Cultivo del embrión.....	25
3- CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.....	27
3.1- Congelación lenta.....	28
3.2- Vitrificación.....	29
3.3- Vitrificación OPS.....	30
4- TRABAJOS EXPERIMENTALES.....	31
4.1 Efecto de un antagonista de GnRH, Antarelix®, en la respuesta ovulatoria y producción de embriones en cabras superovuladas.....	31
4.2 Efecto de la adición de cisteamina en la maduración <i>in vitro</i> en ovocitos caprinos.....	42
5- Conclusión General de la Practica Profesional Supervisada.....	50
6- BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

ROMANO MARIANA PEDERNERA. Producción, conservación y transferencia de embriones *in vivo* e *in vitro* en caprinos (bajo la dirección de: Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar).

La transferencia de embriones es una herramienta que permite el mejoramiento genético por medio de la producción de crías a partir de la selección de machos y hembras altamente productivos, un control sanitario de ciertas enfermedades, facilitar la comercialización de animales y crear bancos genéticos de especies en peligro de extinción. En el presente escrito se dan a conocer los últimos avances en las técnicas de producción de embriones caprinos *in vivo* e *in vitro*, su conservación y transferencia. Así mismo se presentan dos investigaciones la primera analiza el efecto de un antagonista de GnRH, Antarelix ®, en la respuesta ovulatoria y producción de embriones en cabras superovuladas y la segunda evalúa el efecto de adicionar cisteamina en el medio de maduración *in vitro* en ovocitos caprinos.

PRODUCCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* EN CAPRINOS

PRESENTACIÓN

Reporte de la Práctica Profesional Supervisada realizada en Francia en el INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Nouzilly-Tours, durante cuatro meses (septiembre a diciembre 2002) en la unidad de Fisiología de la Reproducción y de Comportamiento.

El INRA fue creado en Francia en 1946, como un instituto nacional público dedicado a la investigación científica, tecnológica y agronómica. El INRA de Nouzilly se crea entre 1965 y 1969 y en el trabajan actualmente 200 investigadores, 285 técnicos, 40 administradores y los estudiantes. Cuenta con 300 bovinos, 250 equinos, 3000 ovinos, 200 caprinos, 200 porcinos, 40000 aves y 200 conejos. El instituto se encuentra dividido en cuatro unidades de investigación, una de ellas es la de Fisiología de la Reproducción y Comportamiento. En esta unidad se encuentran 8 equipos de investigación los cuales son: comportamiento, neurobiología y función sensorial, control central de la ovulación, hipófisis, mecanismos de acción de las gonadotropinas, espermatozoides, reproducción equina y foliculo, ovocito y desarrollo. En este último equipo estuve incorporada durante mi estancia. Entre los temas que se estudian actualmente en el equipo están: la regulación de la foliculogénesis, la calidad de los ovocitos y su desarrollo, mejoramiento de las técnicas de reproducción *in vivo* e *in vitro* en animales domésticos y salvajes y también hay programas para la producción de animales transgénicos (cabras, cerdos y ratones).

OBJETIVO

Conocer las técnicas de producción de embriones caprinos *in vivo* e *in vitro*, su conservación y transferencia. Así mismo, participar en las investigaciones realizadas por el equipo durante mi estancia, que fueron:

1.- Efecto de un antagonista de GnRH, Antarelix ®, en la respuesta ovulatoria y producción de embriones en cabras superovuladas.

2.-La evaluación del efecto de adicionar cisteamina en el medio de maduración *in vitro* en ovocitos caprinos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

La transferencia de embriones es un método de reproducción artificial que se basa en la superovulación de hembras donadoras con alto valor genético, la fecundación de las mismas, la colección de embriones antes de su implantación en el útero y posteriormente su introducción a hembras receptoras. Lo anterior puede realizarse con embriones frescos o después del procedimiento de congelación-descongelación. (4)

La primer herramienta que marcó un gran avance en el mejoramiento de las razas y por tanto de la producción se obtuvo a partir de la inseminación artificial (IA), la cual se reporta por primera vez por el fisiólogo italiano Lazzaro Spallanzani en 1776. Sin embargo, no es hasta 1930 que se comienza a mejorar la técnica, se aplica a nivel de campo y se investigan distintos métodos de almacenaje. (31).

La transferencia de embriones empieza a investigarse unos años después. Los pioneros en la transferencia de embriones en pequeños rumiantes son Warwick y Berry (Texas, EUA) que en 1934 dan a conocer un resumen sobre la transferencia de embriones en ovinos y caprinos y publican el primer artículo en 1949 donde se habla del éxito de la transferencia de embriones (4). En los años siguientes se informan las primeras transferencias de embriones en otras especies: en conejos en 1950 por Dowling (Cambridge, UK), en 1951 en bovinos por Willett *et al.* (Wisconsin, EUA), en 1951 en cerdos por Kvasnikii (ex-URRS). A partir de los 50's Rowson *et al.* y Moore mejoran las técnicas de transferencia tanto en ovinos como en caprinos (31).

La técnica se basaba en la sincronización y superovulación de los animales donantes por medio de la utilización de progesterona y PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin), Posterior a la superovulación las hembras donadoras podían ser fecundadas por IA o por monta natural, después de 7 días se colectaban los embriones por medio de laparotomía y se transferían a hembras receptoras o se almacenaban (46). A partir de 1980 se comienza a

utilizar la FSH porcina en los tratamientos superovulatorios y unos años después la FSH ovina (22).

En 1948 se obtienen los primeros resultados de la congelación de embriones en conejos con glicerol por Chang M.C. En los 70s se presentan los primeros trabajos en relación a la conservación de embriones de rumiantes. En 1976 se logra la primer criopreservación de embriones de cabra (12).

En los últimos 25 años se han dado grandes avances en la producción y tecnología de la transferencia de embriones, tanto en cabras como en otras especies domésticas. (22)

1.2 Importancia

Una de las metas de la producción animal es tener animales con alto valor genético que mejoren la calidad y cantidad de la producción. El primer método utilizado con este fin fue la inseminación artificial. Esta metodología es muy utilizada ya que ha permitido un mejoramiento genético relativamente rápido y a bajo costo. Sin embargo, tiene el inconveniente que sólo se difunde la línea genética paterna, por lo que se desarrolló la técnica de transferencia de embriones (TE) la cual permite también la difusión de los genes maternos. Éste procedimiento se aplica en varias especies domésticas y sigue investigándose y mejorándose cada día (44), Cuadro 1. Actualmente se utiliza más en bovinos debido al alto costo que tiene. En ovinos y caprinos se sigue estudiando y por ahora su aplicación en campo es baja para estas dos especies.

La transferencia de embriones permite:

- El mejoramiento genético por medio de la producción de crías a partir de la selección de machos y hembras altamente productivos.
- La comercialización de animales al disminuir el costo de transporte, prevenir enfermedades, evitar las cuarentenas y facilitar la adaptación del animal al nuevo medio ambiente.
- La creación de bancos genéticos de especies en peligro de extinción.
- El control sanitario de ciertas enfermedades.

Este último punto es de gran importancia actualmente debido a todas las nuevas reglamentaciones sanitarias para el control de las enfermedades. Se ha demostrado que con la transferencia de embriones se reduce el riesgo de transmisión de enfermedades por vía vertical si los embriones son "lavados", por medio de 10 baños de PBS con el fin de eliminar microorganismos y transferidos con la zona pelúcida íntegra. Como es en el caso del Virus de la Lengua Azul (BTV) en donde embriones originarios de madres seropositivas a BTV y transferidos a hembras seronegativas, logran el nacimiento de crías seronegativas a este virus (17), al igual que en el caso de Scrapie (53) en borregos y CAEV (Virus de Artritis Encefalitis Caprina) en caprinos (34). En los caprinos se está haciendo énfasis en esta enfermedad debido a su alta incidencia, y las leyes propuestas, por lo menos en Europa, no van a permitir la producción de semen por machos nacidos de madres seropositivas a CAEV. Existe aproximadamente un 90% de caprinos infectados en Francia, por lo que se está investigando si es posible producir machos seronegativos a partir de donadoras seropositivas por medio de la transferencia de embriones. Hay estudios preliminares que muestran que pueden nacer cabritos libres de la enfermedad a partir de madres seropositivas si los embriones son transferidos con la zona pelúcida íntegra (34). Debido a la importancia de la transferencia de embriones es imprescindible seguir estudiando los problemas que se presentan en cada especie con el fin de perfeccionar la técnica cada día más y así poder obtener los beneficios de su aplicación.

Cuadro 1: Inseminación artificial (IA) y Transferencia de Embriones (TE) en distintas especies realizadas en Francia en 1990.

Especie	Hembras en producción	Número de IA	Número de TE
Vaca	9 000 000	5 598 000	30 000
Yegua	60 609	13 033	33
Oveja	8 400 000	696 955	experimental
Cabra	906 766	51 000	experimental
Cerda	1 000 000	270 000	experimental

Rajnachapel-Messaï 1991

2. PRODUCCION DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO*

2.1 Producción in vivo

Este método requiere de varios pasos que a continuación se mencionan y que son indispensables para tener una buena producción de embriones y crías.

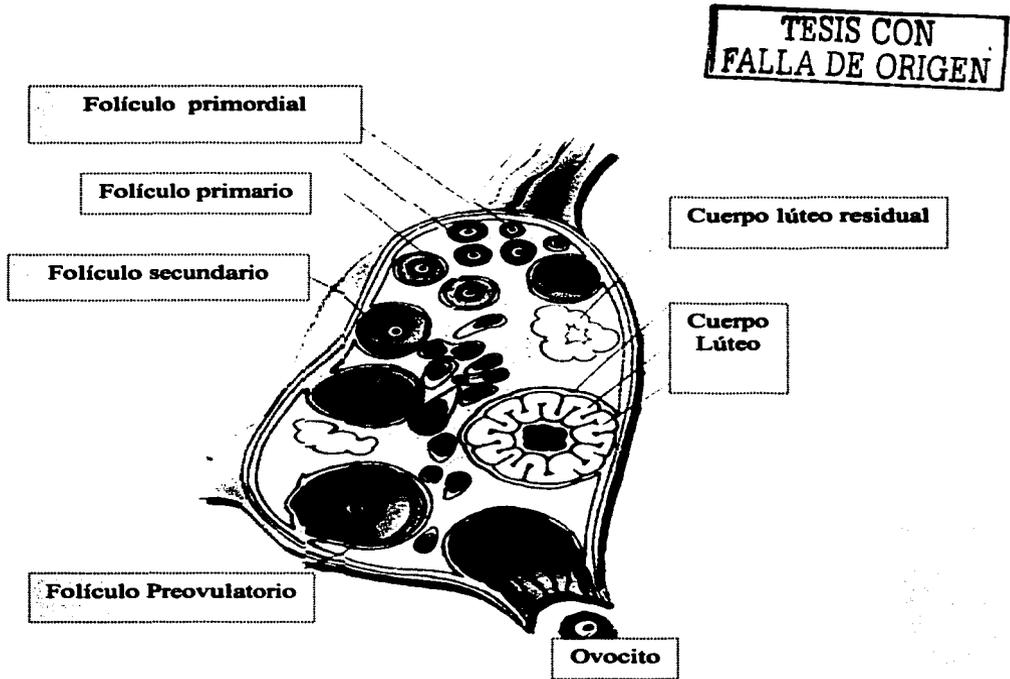
2.1.1 Fisiología de la reproducción caprina

Las cabras son poliéstricas estacionales, cada ciclo estral tiene una duración de 17 a 25 días (33). Durante cada ciclo se presentan varias oleadas foliculares, dentro de la foliculogénesis terminal (más de 1-2mm) se presentan tres etapas las cuales son: reclutamiento folicular, selección y dominancia. Cada etapa está regulada por distintas hormonas. Los primeros reguladores de la foliculogénesis son las gonadotropinas, la FSH (Hormona Folículo Estimulante) y la LH (Hormona Luteinizante). Los folículos primarios son independientes de las gonadotropinas. El reclutamiento se da por el aumento de FSH. La diferenciación de las células de la granulosa durante la época de selección provoca un incremento de estradiol a nivel circulatorio y de inhibina, que produce una reducción de la producción de FSH. Los folículos seleccionados cambian su dependencia de FSH a LH.

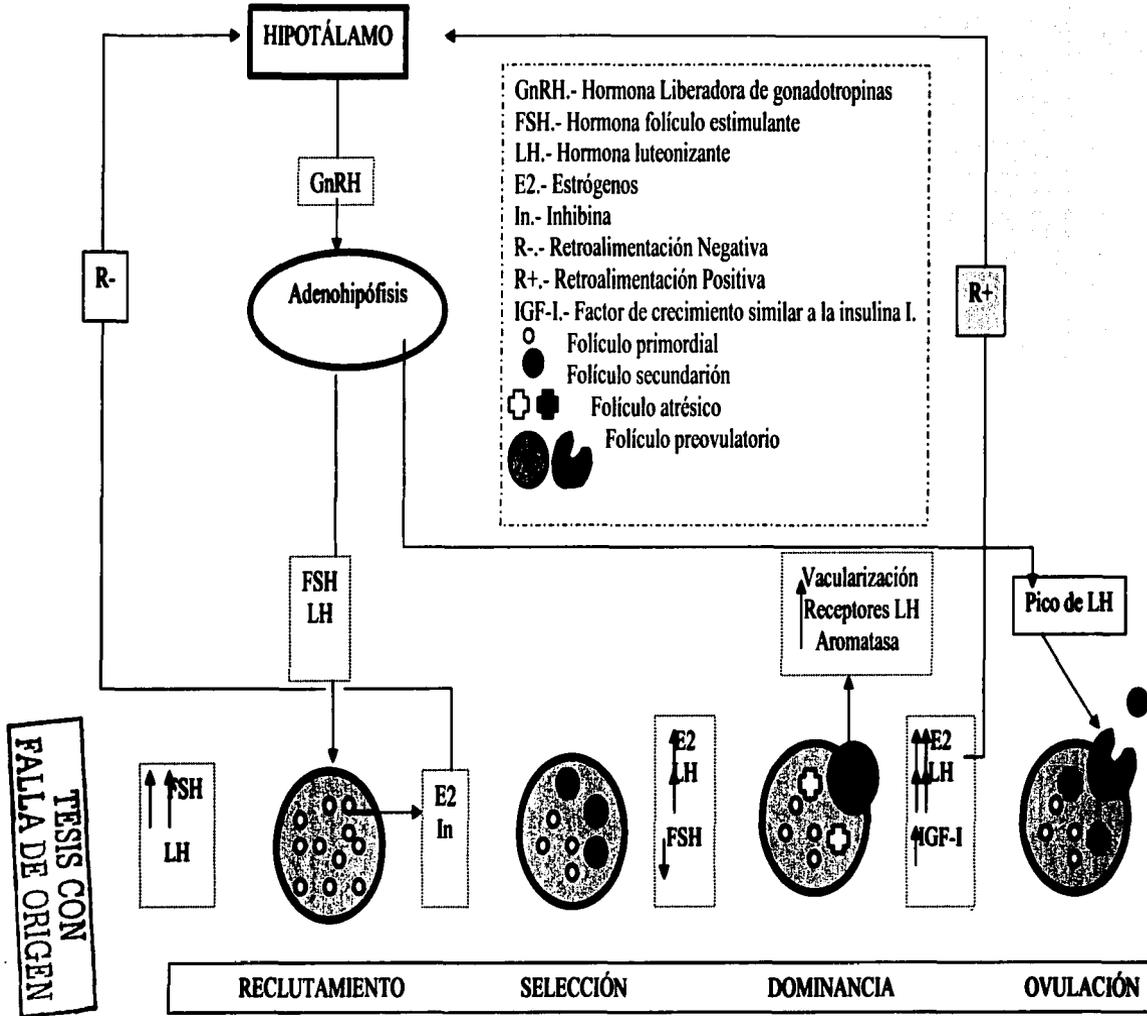
Esta disminución de FSH y el incremento de LH provoca la iniciación de la dominancia haciendo cambiar la bioactividad y biodisponibilidad de los factores de crecimiento intrafoliculares, lo cual lleva a un incremento de la sensibilidad a las gonadotropinas por parte de los folículos seleccionados. Comienzan entonces los folículos dominantes a secretar factores inhibidores del crecimiento folicular, que actúan selectivamente sobre los folículos subordinados, los cuales tiene una menor cantidad de estradiol con relación a la progesterona en el líquido folicular y pierden receptores a LH y se vuelven atrésicos. Mientras que los folículos dominantes continúan creciendo, ganan receptores para LH en la granulosa, disminuyen los de FSH, secretan estradiol y finalmente después del pico de LH óvulan. La pérdida de dominancia coincide con el inicio de otra oleada folicular. Esquema 1 y 2.

La ovulación se da entre 20 a 26 horas después del pico de LH que es inducido por el aumento progresivo de estrógeno durante la fase folicular, e inicia la luteinización del folículo ovulatorio que se transforma en un cuerpo lúteo, el cual comienza con la secreción de progesterona (Fase luteal). La fecundación del ovocito se da en la ampolla tubárica, el ovocito fecundado continúa por el oviducto y llega al útero en forma de mórula, 3- 4días después de haberse producido la ovulación. El día 10 después de la fecundación el trofotoblasto produce interferón τ el cual inhibe la síntesis de la PGF2 α y se preserva el cuerpo lúteo gestacional. Al día 14-16 se implanta el embrión y se desarrolla la gestación (150días). Esquema 3.

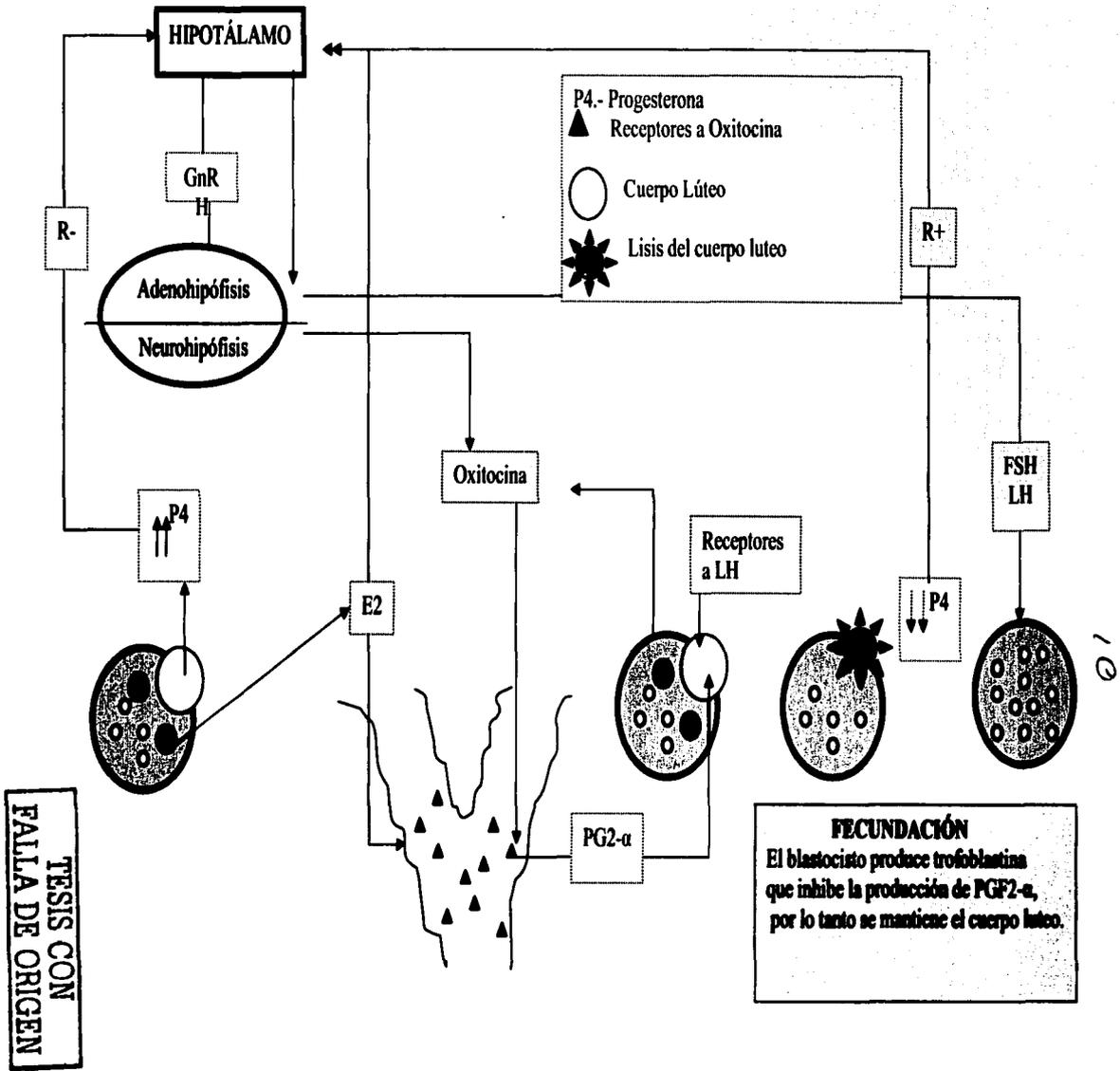
Si no hay fecundación 17 días después del pico ovulatorio, se libera oxitocina por la hipófisis la cual estimula al útero para producir la PGF2 α que destruye al cuerpo lúteo, por lo tanto disminuyen los niveles de progesterona y se estimula la GnRH, lo cual hace que comience otro ciclo estral (16, 15, 4, 45, 2).

Esquema 1.- Estructura ovárica

Esquema 2: Fase folicular y ovulación



Esquema 3. Fase Luteal



2.1.2 Superovulación

Los tratamientos de superovulación tienen la finalidad de aumentar la tasa ovulatoria de las hembras a través de la utilización de hormonas gonadotrópicas.

Antes de realizar cualquier tratamiento se debe seleccionar a las hembras donadoras en base a su calidad genética y productiva. A las hembras receptoras a partir de su estado fisiológico y que estén clínicamente sanas. Las hembras se les debe: identificar, agrupar, realizar los tratamientos de medicina preventiva, establecer los requerimientos nutricionales y además se debe tener el personal adecuado para su cuidado durante todo el tratamiento, gestación y parto.(4)

Cuadro 2: Hormonas más utilizadas en tratamientos de sincronización del estro y superovulación son:

Hormona	Función	Vía de administración	Productos
Progesterona o progestágenos	Inhiben la secreción de GnRH y se encargan del mantenimiento de la gestación. Sincronización de hembras.	Vía intravaginal, subcutánea, oral.	Progesterona Progestágenos sintéticos: FGA (Acetato de fluorogestona), MAP (Acetato de medroxiprogesterona) y Norgestomet
FSH porcina u ovina	Estimulación de los folículos, superovulación.	Vía sistémica	FSH porcina FSH ovina
LH	Ovulación. Maduración del ovocito.	Vía sistémica	LH porcina
Gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG)	Superovulación Induce a la ovulación al tener una doble actividad de FSH y LH.	Vía sistémica	eCG
PGF2 α y análogos	Luteólisis Sincronización y superovulación.	Vía sistémica	Dinoprost (Lutalyse®) y Clorprostenol (Estrumate®)
Agonista de GnRH	Liberación de LH y FSH.	Vía sistémica	Cystorelin®, Factrel®, Receptal®
Antagonista de GnRH	Inhibición de la liberación de LH y FSH.	Vía sistémica	Antarelix®

Existen distintos protocolos para la realización de la superovulación. Los primeros tratamientos se basan en la utilización de progestágenos y de eCG la cual se inyecta a una dosis de 1000-2000UI, 1 ó 2 días al final del tratamiento progestágeno. Esta técnica se ha utilizado por años y se ha ido perfeccionando con el tiempo (40, 7).

La eCG es muy utilizada en tratamientos superovulatorios. Sin embargo, se han encontrado tres inconvenientes: uno es la alta producción de folículos no ovulatorios y que secretan una gran cantidad de estradiol que es ocasionada por la larga vida media de eCG y hace que se dificulte el transporte de gametos y puede provocar luteólisis prematura. El segundo problema que se presenta es activación prematura de la meiosis por su fuerte acción como LH y el tercero y más importante es la aparición de anticuerpos contra eCG que se producen después de tratamientos consecutivos y provocan una disminución de la eficacia del tratamiento (6, 23).

Las superovulaciones inducidas con FSH han mostrado mejor respuesta que los animales tratados con eCG en términos de tasa de ovulación, fertilización y calidad embrionaria. (1). Existen dos tipos de FSH en el mercado la FSH porcina (pFSH) y la FSH ovina (oFSH). Se ha comprobado que el uso continuo de pFSH provoca la aparición de anticuerpos en caprinos, por lo que es recomendable después de aplicar 3 tratamientos de pFSH al mismo animal, cambiar a oFSH o directamente utilizar esta última, pero tiene la desventaja de que es más cara y difícil de conseguir. Su administración es continua debido a su corta vida media. (pFSH=5h), por lo cual la FSH se debe administrar en 6-8 inyecciones, cada 12 horas 3 o 4 días antes de terminar el tratamiento con progestágeno. Existe la alternativa de administrar la FSH en dosis decrecientes y combinarla con LH para inducir el pico preovulatorio y de esta forma aumentar la respuesta ovulatoria. (21, 3). También es posible mezclar FSH con una dosis reducida de eCG (400-800UI) para disminuir los efectos indeseables de ambas (22, 19, 23).

Cuadro 3: Ejemplo de calendario para realizar un tratamiento de superovulación

Día / Hora	1	9	10	11	12	13
Am	Introducción de esponja con FGA	0.4mg FSH + 0.5mg de Cl.	0.2mg FSH	FSH/LH Retiro de la esponja con FGA	FSH/LH	IA
Pm			0.2mg FSH	FSH/LH + 0.5mg Antarelix	FSH/LH 3mg pLH	

FGA: Acetato de fluorogestona

Cl: Cloprostenol.

Antarelix: Antagonista de GnRH

FSH/LH: 2mg FSH+ 6mg LH

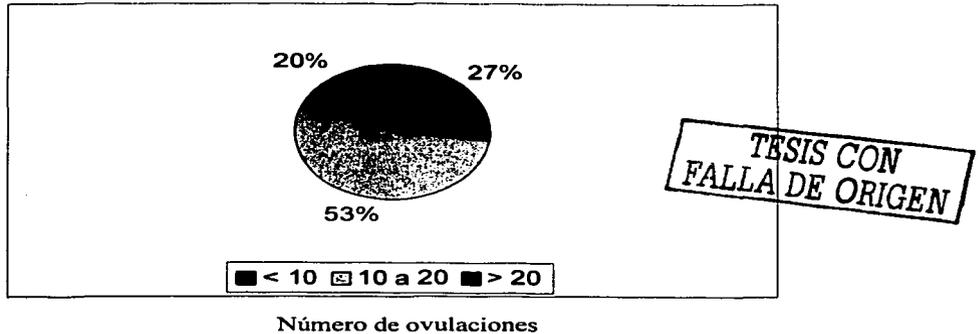
IA: Inseminación artificial

2.1.3 Problemas asociados a la superovulación

a) Variabilidad en la respuesta ovulatoria

A partir de los tratamientos superovulatorios se ha visto que hay una gran variabilidad del número ovulaciones independientemente de la especie. En las cabras lecheras el número de ovulaciones promedio es de 14 a 15 por la donadora, sin embargo hay una gran variabilidad según el individuo, la raza, la estación, la alimentación, y el tipo de tratamiento superovulatorio (14). Por ejemplo al utilizar pFSH, Gráfica A .

Gráfica A: Variabilidad de la respuesta ovulatoria después de la inducción a la superovulación a partir del tratamiento con pFSH en la cabra Alpina y Saanen.



Existen varios factores que producen esta variabilidad, en primer lugar la población folicular al momento de realizar la estimulación ovárica, luego la raza, la edad, la nutrición, tipo y duración del tratamiento, dosis, presencia del macho, número de tratamientos aplicados sobre el mismo animal y fotoperiodo (18).

Se ha comprobado que la eficacia del tratamiento de superovulación depende de la población folicular al momento de realizar la estimulación ovárica con los distintos tratamientos, (48) por lo que se han propuesto distintas estrategias:

Una de ellas consiste en aumentar la concentración de gonadotropinas endógenas en la hembra donadora para limitar la retroalimentación negativa del ovario sobre el sistema hipotálamo-hipofisiario por medio de la inmunización activa contra esteroides o inhibina. Otra estrategia que ha resultado en bovinos consiste en estimular la síntesis de factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF1), la cual interviene en las fases de reclutamiento, selección y en la maduración del ovocito. Otra opción utilizada en bovinos y que tiene el fin de aumentar la población de folículos es por medio de la administración de somatotropina (GH) la semana previa a la estimulación gonadotrópica. Sin embargo, esta última técnica aplicada en borregos y cabras no resultó en un aumento del número de ovulaciones; pero sí se ha visto que en ovejas la GH ayuda a mejorar la calidad y número de los embriones transferibles cuando se administra en el día en que se retira la

progesterona o al momento de aplicar las dos últimas inyecciones de FSH, tiempo que coincide con el crecimiento folicular preovulatorio. También la GH tiene una acción directa sobre la maduración ovocitaria y otra indirecta sobre el medio uterino (11, 23).

Existe la posibilidad de aumentar el número de folículos independientes de hormonas gonadotrópicas (de 1-2mm) inhibiendo la secreción endógena de LH y FSH a través de la administración de un antagonista de GnRH (Antarelix, 0.5mg/día) durante 10 días antes del comienzo de la estimulación gonadotrópica. Después del tratamiento, el número de folículos de 1-2mm se duplica y la tasa de atresia folicular disminuye y finalmente se obtiene 50% más de folículos ovulatorios. En ovinos este tratamiento muestra resultados favorables, se ha visto que permite una producción de 10 embriones transferibles y el nacimiento de 6 a 7 corderos por cada donadora tratada. En cabras los resultados son variados y el procedimiento sigue en investigación (19, 23).

b) Luteólisis Prematura

Otra limitante en los tratamientos superovulatorios en la cabra es la regresión temprana de los cuerpos lúteos provocada por la liberación anticipada de $\text{PGF2}\alpha$, la cual se presenta entre un 10-35% de las hembras tratadas. La destrucción del cuerpo lúteo entre el tercer y quinto día de la fase lútea provoca la disminución de progesterona circulante y detiene el posible desarrollo embrionario (1), siendo ese hecho la recolección embrionaria es nula. Actualmente se desconoce por qué se presenta este problema. Existen distintas teorías al respecto; una de ellas plantea que hay una disminución en los receptores de LH en las células luteínicas grandes, la que provoca una baja reacción luteotrópica posiblemente relacionada a problemas nutricionales. Otra teoría dice que puede haber una estimulación luteolítica por la presencia de concentraciones elevadas de estradiol, el cual proviene del reclutamiento de nuevos folículos durante la fase lútea que es producido por la eCG presente (debida a su larga vida media) y también por la presencia de FSH. (19)

Uno de los tratamientos propuestos contra la regresión prematura que se ha probado, es inhibir la síntesis de $\text{PGF2}\alpha$ por medio de la aplicación de meglumina del flunixin después del día de la ovulación y hasta el día de la recolección embrionaria, sin embargo, la respuesta no siempre es favorable y en ciertos casos sigue presentándose este fenómeno

(23). Otra opción para disminuir este fenómeno, en caso de tratamientos superovulatorios inducidas con eCG, es la aplicación de hCG 84 horas después de la aparición del estro (47).

2.1.4 Fecundación

El primer paso para realizar la fecundación es detectar a las hembras que se encuentran en estro por medio de distintas técnicas como la utilización de machos con mandil o vasectomizados, observación del comportamiento de las hembras y los cambios fisiológicos asociados.

Los métodos para la fecundación y su respuesta son :

-Monta natural.- La cual tiene un alto porcentaje de fecundación de ovocitos (80%), pero el número de hembras cubiertas por macho/día es menor.

-Inseminación artificial (IA).- La cual tiene un porcentaje de fertilidad un poco menor al de la monta natural pero con la ventaja de que el macho puede ser genéticamente seleccionado y se puede cubrir a más hembras. La IA puede ser cervical o intrauterina, presentando ambas un porcentaje de fecundación similar (alrededor de un 65%). El semen congelado, en el caso de caprinos, no baja la tasa de fecundación de forma significativa. Cuando se realiza la IA disminuye la tasa de fecundación ya que los ovocitos se encuentran en distintos estadios de desarrollo porque existe una diferencia individual al momento de la presentación de la ovulación. (4)

Se han desarrollado otras alternativas para sincronizar las hembras disminuyendo la variabilidad del estro y de la ovulación. Una de éstas es la utilización del antagonista de GnRH, a una dosis de 5mg, 12 horas después de retirar el progestágeno, seguido de una inyección intravenosa de 3mg de LH 24 horas después, permitiendo así realizar solo una inseminación artificial 16 horas después de la inseminación. (5, 19).

En cabras los resultados del tratamiento con el agonista de GnRH 1 ó 2 días después de retirar el progestágeno son controversiales. En algunos experimentos, se ha visto favorecida la ovulación y la tasa de recolección de embriones transferibles pero otros resultados muestran una disminución de la tasa de fertilización (41).

En cabras el uso de un antagonista de GnRH 12 horas después del tratamiento con el progestágeno e inyectando LH 24 horas después, muestra buenos resultados superovulatorios y permite la programación de la IA (5).

Sea cual sea el método de fecundación esta comprobado que la tasa de fecundación es más baja en las hembras con mayor tasa de ovulación (1, 3). Cuadro 4

Cuadro 4: Efecto de la respuesta ovulatoria sobre el porcentaje de fecundación

Método de fecundación	Número de ovulaciones / donadora	
	< 15	≥ 15
Monta Natural	82.1 % (335/44)	71.9 % (889/65)
IA cervical	66.3 % (371/59)	47.2 % (487/39)
IA intrauterina por endoscopia	1 62.7 % (467/74)	52.1 % (1031/79)
	2 77.6 % (205/33)	58.7 % (300/30)
	3 67.5 % (431/69)	65.4 % (712/57)

Baril G.

- 1.- IA con espermatozoides congelados 20-24 horas después de la presentación del estro.
- 2.- IA con espermatozoides congelados 16 horas después de la presentación del estro.
- 3.- IA con espermatozoides frescos 20-24 horas después de la presentación del estro.

2.1.5 Colección de embriones

Los embriones en estado de mórula o de blastocisto se pueden congelar, sin embargo se ha observado que la sobrevivencia de los embriones en estado de blastocisto es mayor después de la descongelación (7). Es por ello que la colección de embriones se realiza del día 6 al 7 después de la aparición del estro en bovinos y ovinos, por medio de lavados de los cuernos uterinos. En las cabras se realiza al día 7 ú 8, ya que hay un mayor porcentaje de blastocistos y el embrión se encuentra dentro de la zona pelúcida (Baril, datos no publicados). La recolección de embriones se puede ejecutar por distintos métodos: laparotomía, laparoscopia y por vía vaginal.

Laparotomía.- Fue de las primeras técnicas utilizadas para la recolección de embriones. Para llevarla a cabo es necesaria la anestesia del animal, después de tener la zona de incisión desinfectada se procede a hacer una incisión de 8 a 10 cm sobre la línea alba delante de la ubre y se exteriorizan los cuernos uterinos y se evalúan los ovarios. Se hace una punción en la base del cuerno uterino a nivel del ligamento intercorneal para introducir la sonda Folley en la luz uterina y se infla el globo para evitar la salida del líquido, en el extremo opuesto cerca de la unión útero-tubárica se realiza otra punción donde se coloca un catéter de 1-2 cm y se fija con un clamp vascular para obstruir la luz. Se inyecta el líquido de recolección (40-50ml de PBS a 37°C) en el extremo superior del cuerno y se recolecta por el lado contrario, luego el líquido se coloca en un tubo Falcón y se introduce en un baño María a 37°C. Después de realizar el lavado de ambos cuernos, se introduce una solución con antibiótico (1millon de UI de penicilina) en la cavidad abdominal y se recomienda seguir con el tratamiento por 3 días por vía sistémica. Por último se sutura y se espera la recuperación del animal. La laparotomía presenta un alto porcentaje de recuperación de embriones (70-90%), pero el mayor inconveniente es la presencia de adherencias que afectan las recolecciones posteriores por lo que sólo se puede realizar 3 recolecciones por hembra, sin embargo es la técnica más utilizada por tener la ventaja de ser fácil y rápida (4).

Laparoscopia.- Esta técnica se comienza a aplicar en cabras a partir de 1987. La recuperación de los embriones es de un 10% a un 15% menor que en la laparotomía, pero permite la recolección repetida de las hembras al disminuir las adherencias.

El animal se anestesia y se coloca en la mesa, se rasura y se limpia el vientre, después se realiza una pequeña punción a 4-5cm delante de la ubre y a 10-15cm a la izquierda de la línea alba para insertar la cánula para introducir el endoscopio, se inyecta aire y se realiza otra punción a 5cm de la línea alba al lado opuesto de la primera, donde se introduce la pinza atraumática y se cuentan los cuerpos lúteos de cada ovario. Se realiza una tercera punción al costado de la línea alba donde se introduce la sonda de colección de 3 vías y se hace una punción cerca de la bifurcación uterina para introducir la sonda al cuerno, luego se infla el globo de la sonda para obstruir la luz uterina. A continuación se introduce el catéter por dentro de la sonda y se lleva hasta lo más cerca posible de la unión útero-tubárica. Con una pinza atraumática se fija sobre el istmo para evitar la salida del líquido. El líquido de

recolección se introduce por la sonda (40-50ml por cuerno) y se recupera por el catéter en el caso de la sonda de 3 vías (3, 4).

Vía vaginal.- Este método es ampliamente utilizado en bovinos pero en los pequeños rumiantes se dificulta por razones anatómicas. Sin embargo, los estudios de Pereira (43), muestran que la vía de recolección transcervical con un catéter especial es posible, pero tiene la desventaja que no todas las hembras pueden ser colectadas por diferencias intraespecie o por ser nulíparas y se necesita más tiempo y manejo por animal.

Después de la colecta por cualquiera de los métodos mencionados se buscan los embriones obtenidos y se colocan en una caja de Petri con PBS y 0.4%BSA o 10% de suero ovino o caprino. Se hace el examen morfológico en el cual se evalúa la integridad de la zona pelúcida, el grado de desarrollo embrionario y su apariencia según el estado de desarrollo. Por último se transfieren o se crioconservan por medio de los métodos que se mencionan más adelante.(4)

2.1.6 Métodos de transferencia de embriones

El éxito del trasplante embrionario depende de varios factores fisiológicos, estos son:

1. Calidad de los embriones
2. Número de embriones transferidos
3. Sitio de transferencia embrionaria
4. Transferencia unilateral o bilateral
5. Sincronización donante-receptora
6. Respuesta ovulatoria de la receptora
7. Método de conservación de los embriones

Después de una buena selección morfológica se recomienda la transferencia de 2 embriones por cabra, de forma unilateral y en el cuerno con el ovario con más cuerpos lúteos (1 ó más). Los embriones de 6-8 días se transfieren en el tercio craneal del cuerno uterino. Es muy importante que las hembras receptoras y donadoras estén bien sincronizadas para que el medio uterino sea el apto para el embrión (si hay una diferencia de sincronización mayor a 24 horas la tasa de reabsorción embrionaria aumenta) y que las receptoras poseen dos cuerpos lúteos. (8)

La transferencia de embriones se puede realizar por laparotomía o por laparoscopia ya sea con embriones frescos o congelados.

La transferencia tradicional es la técnica más utilizada actualmente en la cabra. Primero se descongelan los embriones, sumergiendo la pajilla directamente en agua a 35-37°C por 20s. Se debe eliminar el crioprotector mediante baños sucesivos de los embriones para permitir la salida del crioprotector de forma paulatina y la hidratación del embrión. Los baños se pueden realizar de dos formas: una es eliminar el crioprotector utilizando 4 baños (de 5-10min) con cantidades decrecientes del crioprotector (por ejemplo 1.5, 1.0, 0.5 y OM de etilenglicol). La otra opción es por medio de la utilización de sacarosa la cual permite la salida del crioprotector ya que es una molécula de alto peso molecular que no penetra a la célula y crea un aumento en la presión osmótica extracelular permitiendo la entrada de líquido de forma paulatina y facilitando así la salida del crioprotector (4).

Cuadro 5: Procedimiento para lavar embriones descongelados utilizando sacarosa para eliminar el crioprotector.

Baño	Medio de lavado	Tiempo/min.
1	PBS + 0.4% BSA + 0.25 sacarosa	5-7
2	PBS + 0.4% BSA + 0.25 sacarosa	5-7
3	PBS + 4‰ BSA	2-3
4	PBS + 4‰ BSA	2-3

BSA: Albúmina sérica bovina

Ya que se terminó el proceso de eliminación del crioprotector se hace la selección morfológica de los embriones transferibles. Los embriones seleccionados se colocan por pares en una pajilla (medio-aire-medio con embriones-aire-medio) y se transfieren al cuerno uterino.

La transferencia directa es una técnica que se ha aplicado recientemente en varias especies teniendo buenos resultados en cerdos y está en proceso de investigación en la cabra. Para realizar la técnica se necesitan que los embriones congelados estén empajillados de la siguiente forma: PBS--aire-- PBS + etilenglicol 1.5M+ 2 embriones--aire--PBS. Después los embriones se descongelan y directamente se introducen en el cuerno uterino sin

selección y con los crioconservadores. Esta técnica, tiene la ventaja de ser muy rápida, hay menos manejo de los embriones, tiene menor costo, no necesita de un personal tan preparado y puede aplicarse más fácilmente en campo. Pero tiene una gran desventaja y es que en cabras los resultados son inferiores. Parece ser que la causa de la baja viabilidad está más relacionada con la crioconservación que con la técnica en sí y es por eso que actualmente se está investigando este punto en cabras y otras especies. (4, 9)

Comparando la transferencia directa con la tradicional por los resultados de cabritos nacidos/embriones transferidos vemos que hay un mejor resultado a partir de la transferencia tradicional (50% vs 30%). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en la transferencia tradicional hay una eliminación de un 20% de los embriones por su morfología y en la transferencia directa se transfieren todos los embriones por lo que en los resultados finales no hay tanta diferencia entre cada técnica (9).

2.2 Producción de embriones *in vitro*

La producción de embriones *in vitro* se ha desarrollado en los últimos 15 años en ovinos y caprinos. Para llevarla a cabo se necesitan los siguientes pasos: obtención y maduración de los ovocitos (MIV), fertilización (FIV) y el cultivo hasta el estado de blastocisto (CIV).

2.2.1 Colección de ovocitos

El primer paso para desarrollar la producción de embriones *in vitro* es la obtención de los ovocitos la cual se puede realizarse *in vivo* o *in vitro* por tres distintas técnicas: aspiración de los ovocitos, disección del ovario, o haciendo cortes laminados del ovario y recolectando el líquido. Esta última técnica permite obtener un mayor número de ovocitos, pero se ha visto que da mejor resultado la aspiración de ovocitos, ya que el grado de madurez (maduración meiótica y desarrollo) del ovocito está correlacionado con el tamaño del folículo, por lo que al seleccionar los folículos a puncionar se tiene una mayor tasa de recolección de ovocitos viables para la transferencia. Los estudios muestran que los folículos pequeños (2-3mm) a medianos (3-5mm) producen una menor proporción de blastocistos que los folículos grandes (más de 5mm) que producen hasta un 70% de

blastocistos, cifra similar a la obtenida en la producción de embriones *in vivo*. También se ha visto que la MIV es menor en ovocitos obtenidos de hembras prepúberes (23, 19).

Es de gran importancia seleccionar los ovocitos antes de su cultivo. Esta selección se basa en su morfología, donde se busca la integridad de los ovocitos, que estén cubiertos por varias capas de células de la granulosa y que no se vean anomalías aparentes dentro del citoplasma. Para realizar una buena selección es necesario que el operador tenga experiencia. Hay otras formas más específicas para seleccionar a los ovocitos como es el estudio de la organización citoplasmática, ya que se ha comprobado que el patrón y la distribución mitocondrial en el ovocito durante su maduración están directamente relacionados con la habilidad de desarrollo embrionario. La desventaja de esta selección es que requiere de técnicas más sofisticadas lo que implica un mayor costo (32).

2.2.2 Maduración de ovocitos (MIV)

La capacitación y la maduración del ovocito *in vitro* es el factor más limitante en la producción de embriones por esta técnica. Otra limitante es la viabilidad embrionaria después de la transferencia, especialmente en embriones congelados.

La capacidad del ovocito para madurar *in vivo* depende de dos factores: uno es la capacitación del ovocito durante los últimos días de la foliculogénesis y el otro es todos los cambios bioquímicos que suceden dentro del líquido folicular durante la foliculogénesis. Estos cambios fisiológicos y metabólicos hacen que se dificulte la maduración *in vitro*, ya que es necesario crear un medio similar al líquido folicular (36).

Existen una gran cantidad de medios de maduración a nivel comercial (MEM, TCM199, TALP, Waymonth, Ham-F12, SOF, B2, etc.) los cuales han sido ampliamente utilizados, sin embargo el medio más comúnmente utilizado es el TCM199 el cual es un medio tamponado con bicarbonat y que contiene sales minerales, fuentes de carbono y de energía (glucosa y glutamina), aminoácidos y vitaminas. A este medio de maduración, por lo general se le agregan moléculas de alto peso molecular que provocan un efecto surfactante, el cual impide la adhesión de los complejos cumulus-ovocito y da soporte al medio. Entre las moléculas utilizadas están la albúmina sérica bovina (BSA), el suero fetal bovino (FCS) u ovino (FOS), el suero de una hembra en estro y el líquido folicular (49).

Los ovocitos de cabras y ovejas generalmente se maduran en el medio TCM199 suplementado con líquido folicular (de folículos mayores a 4mm, no atrésicos) y 100ng de oFSH. El cultivo de los ovocitos de cabras y ovejas con estos medios muestra la expulsión del primer cuerpo polar entre 16-24 horas de cultivo.

Se ha comprobado que existen otros factores reguladores moleculares que afectan la maduración como son los factores de crecimiento, hormonas y péptidos intraováricos.

Hay estudios que muestran que el cultivo de ovocitos de ovinos con 100ng/ml FSH ó 10ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) produce un aumento en el porcentaje de ovocitos que presentan meiosis II. Esta respuesta no se observa con la utilización de 100ng/ml de factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I). (30)

Si el medio no es adicionado con suero, se requiere la utilización de 17β estradiol adicionado al medio TCM199 con FSH, ya que de lo contrario se ha observado la aparición de anomalías durante la eclosión y malformación del blastocisto.

Se ha comprobado en bovinos y ovinos la relación benéfica del glutatión y la cisteamina en el desarrollo de la competencia ovocitaria. También hay otros factores encontrados en el LF bovino como son la hormona del crecimiento, la activina o inhibina, los cuales pueden estimular la maduración del ovocito y la subunidad α -inhibina puede decrecer el potencial de desarrollo de los ovocitos. La identificación del modo de actuar de estos factores puede ayudar en gran medida al desarrollo de la maduración *in vitro* (11, 37, 23).

2.2.3 Fecundación

Existen distintos protocolos para desarrollar la fecundación *in vitro* (FIV), los cuales tienen un punto en común, de gran importancia, que es el cuidado de la capacitación espermática, el mantenimiento de la temperatura y el pH del medio.

Constantemente se busca la forma de mejorar la viabilidad espermática y sobre todo después de la congelación. Una de las formas de incrementar el porcentaje de capacitación espermática del semen bovino es por medio de la heparina, en ovinos y caprinos no es indispensable y se han visto buenos resultados si además se le coloca suero de oveja en calor (23). También se sabe que el procedimiento de congelación y descongelación permite

la capacitación más rápida de los espermatozoides (30min) en comparación con la capacitación de semen fresco (3 horas).

En el INRA, Tours, una de las técnicas que se utiliza para realizar la FIV es la que se describe a continuación. Después de obtener los ovocitos madurados por 24h en un medio M199 más líquido folicular y oFSH, se lavan y se separan de las células de la granulosa con el medio SOF FIV (más gentamicina y 10% de suero de oveja en celo). Se colocan en las cajas de petri en grupos de 40-50 y se identifican los lotes, y al mismo tiempo se van preparando los espermatozoides. Estos se descongelan y se centrifugan (10 min a 3000r) para activar su motilidad y separarlos de los crioprotectores, se introducen en una solución Gradiente Percoll 45% / 90% (Percoll 90% = 9ml de Percoll 100+1ml de NaCl al 9% y Percoll 45%= 1ml de Percoll 90 +1ml de SOF Hepes (2.38mg/ml) + gentamicina (4µl/ml), luego se diluyen a una concentración de 1×10^7 espermatozoides/ml en un medio SOF FIV y se incuban por una hora. Después se agregan 50µl de espermatozoides a cada grupo de ovocitos y se cultivan por 17 horas a 39°C en una atmósfera con 5% de dióxido de carbono y alta humedad. Finalmente los ovocitos se lavan y se colocan en el medio de cultivo rodeados de aceite mineral. Se cultivan por 7 días se revisa la tasa de fecundación 24 horas después del cultivo y la tasa de desarrollo a los 3 y 7 días. Se están realizando actualmente distintos estudios con el fin de reducir el tiempo de fertilización sin que se afecte y aún mejore la producción de blastocistos y también que se reduzca el contacto de las células con los productos dañinos del esperma (Poulin y Cognié, datos no publicados).

2.2.4 Cultivo del embrión

La formación del blastocisto es esencial para la implantación del embrión y la principal forma de evaluar la calidad embrionaria para después realizar la transferencia (54).

La introducción del co-cultivo con células somáticas para embriones de rumiantes a mediados de los 80's marca un gran avance en la maduración embrionaria, pero no cumplen totalmente las necesidades embrionarias y se necesita la adición de suero, que se ha visto que perjudica el desarrollo fetal (49). Otro punto que ayudó a mejorar la técnica fue la regulación de la concentración de oxígeno durante el cultivo, siendo la óptima entre un 5-10% (32).

Durante años se han hecho investigaciones con relación a la fisiología del ovario y los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario, estos estudios se han implementado básicamente en ratones, bovinos y humanos. Los nutrientes más importantes para el desarrollo de embriones preimplantados son los carbohidratos y los aminoácidos, los cuales, no sólo proveen energía sino que también reducen el estrés celular provocado por las condiciones subóptimas del cultivo *in vitro*. (28)

Después de la fecundación el embrión sufre una primera serie de cambios morfológicos, los cuales son: la duplicación celular hasta el estadio de 16 células, después se forma la mórula y por último se desarrolla el blastocisto. Estos cambios provocan un aumento de la actividad biosintética del embrión y por lo tanto un cambio continuo de los requerimientos nutricionales. Es por eso que para el cultivo de embriones *in vitro* hasta el estadio de blastocisto se requiere agregar distintos nutrientes a los medios de cultivo, entre éstos tenemos a la glucosa que es necesaria para el desarrollo de la mórula *in vivo*. Sin embargo, se ha encontrado que al agregar glucosa al medio de cultivo de embriones de rumiantes, se producen metabolitos tóxicos por su degradación y estos dañan al embrión. Una solución para reducir esta toxicidad es la combinación de glucosa con aminoácidos (aa) y glutamina o EDTA, ya que inhiben esta actividad glucolítica. Los aa juegan un papel importante en los últimos estadios del embrión, sobretodo para la producción de energía y la función celular. En el líquido folicular hay concentraciones elevadas de alanina, glutamato, glicina, serina y taurina. Se ha visto que los aa no-esenciales y la glutamina estimulan la formación del blastocelo e incrementan el número de células del trofotodermo. También hay aminoácidos extracelulares (glicina y glutamina) y poliaminas que ayudan a mantener la osmolaridad protegiendo al embrión de los cambios iónicos y así éste puede mantener su presión intracelular. Se ha visto que el desarrollo de embriones cultivados en medios con alta osmolaridad sin osmolitos se ve afectado, pero se ha comprobado que utilizando osmolitos como la glicina, glutamina, taurina y betaina se incrementa el desarrollo embrionario. También los aa ayudan a mantener el pH (28, 29). Se ha determinado que al cultivar los embriones en volúmenes reducidos incrementa la viabilidad, ya que producen sustancias endocrinas y exocrinas que influyen en los otros embriones.

El medio de maduración embrionario más comúnmente utilizado es el SOF con aa y BSA, sin suero y con células somáticas, cultivándose por 24 horas a una temperatura de 38.5°C,

en una atmósfera compuesta por 5% oxígeno, 5% dióxido de carbono y 90% de nitrógeno, en un ambiente humidificado. En ciertos laboratorios suplementan el medio SOF con 5-10% de suero fetal bovino (FCS) 2 ó 3 días después de la inseminación para promover la viabilidad de los embriones después de ser transferidos. Adicionalmente se están investigando medios secuenciales para bovinos y humanos, en los cuales se van agregando los nutrientes necesarios según la etapa de desarrollo embrionario (28).

La sobrevivencia de los embriones es menor en aquellos que son producidos *in vitro* a comparación de los producidos *in vivo*. En las cabras transferidas con embriones producidos *in vitro* se presenta en varios casos muerte embrionaria entre los 30 y 40 días de gestación. También se ha visto que los embriones producidos con ovocitos de hembras prepúberes se desarrollan menos, baja la fertilidad y no toleran bien la crioconservación.

3 CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Existen dos formas de conservar los embriones. Una es la conservación de corta duración que se realiza durante 24 a 48 horas por medio de la refrigeración, la otra es la conservación larga por medio de la crioconservación en nitrógeno líquido (-196°C).

La crioconservación es una forma de almacenar distintos tipos de células por largos periodos por medio de la congelación. La crioconservación provee métodos para almacenar el germoplasma materno y paterno, ayuda al intercambio genético mundial, incrementa la presión de selección, permite la proliferación o generación de distintas razas, así como la conservación de razas o especies en peligro de extinción, entre otras (35, 26).

Para realizar la crioconservación es necesaria la utilización de crioprotectores que son compuestos hidrófilos (por lo general polialcoholes), que tienen la capacidad de penetrar fácilmente en la célula por simple difusión (osmosis) y que aumentan la presión extracelular provocando la salida del líquido intracelular. De este modo la célula se deshidrata y se evita la formación de cristales intracelulares que puedan dañar la membrana y el funcionamiento celular. Los crioconservadores que se utilizan para congelar embriones son: el glicerol, el etilenglicol y el dimetilsulfóxido (DMSO). Se ha comprobado que el crioprotector menos embriotóxico es el etilenglicol en ovinos (20) y caprinos (36, 7).

Existen tres métodos de congelación que son la congelación lenta, la vitrificación y la vitrificación OPS (Open Pulled Straw) (4).

En 1976 Bilton *et al.* logran la primer crioconservación de embriones caprinos usando glicerol como crioprotector y aplicando el método de congelación lenta. Con los años, esta técnica se ha ido mejorando en las cabras y otras especies, al utilizar el etilenglicol en vez del glicerol y además realizando otros protocolos de congelación que son más rápidos y económicos como es la vitrificación y la vitrificación OPS con distintos resultados según la especie en cuestión (36).

3.1 Congelación lenta

Es de las primeras técnicas utilizadas para el congelamiento de embriones y ha permitido con éxito la conservación de embriones de distintas especies por años. En cabras es la más utilizada y la que tiene mejor tasa de sobrevivencia (45-50%), un porcentaje inferior al obtenido a partir de embriones transferidos frescos (55-60%). (4)

Los embriones obtenidos ya sean *in vivo* o *in vitro* se lavan en una solución de PBS + 4% BSA con una concentración creciente de etilenglicol (0.5-1.0-1.5M por 5-7 min. cada uno). De esta forma el crioprotector va entrando a la célula poco a poco. Después se introducen dentro de una pajilla de 0.25ml como muestra la ilustración según la técnica de transferencia:

Esquema 4: Transferencia tradicional



- PBS + 4% BSA + etilenglicol
- Embriones
- Aire

Transferencia directa



- PBS + 4% BSA
- PBS + 4% BSA + etilenglicol + embriones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Luego las pajillas se introducen en un congelador programable y son enfriadas de la temperatura ambiente (20-25°C) a -7°C a una velocidad de 4°C/min. Después de los primeros 5min a -7°C se realiza la cristalización (seeding) tocando la pajilla por 1-2 seg. con un objeto metálico enfriado con nitrógeno líquido y se esperan otros 5min. Luego se sigue el enfriamiento hasta los -30°C a una velocidad de 0.3°C/min y finalmente se sumerge la pajilla directamente en el nitrógeno líquido (-196°C) y se almacena en los termos.

Para descongelar las pajillas se deben sumergir directamente en agua a baño María a 30-37°C durante 20s y se realizan los lavados de los crioprotectores como se explicó en la transferencia tradicional. Luego se transfieren por el método tradicional o directo, donde no se eliminan los crioprotectores (4, 10).

3.2 Vitrificación

La vitrificación es una técnica de congelación rápida que utiliza una alta concentración de crioprotector (50%) con una disminución de temperatura veloz (1.-2.°C/min), evitando así la formación de cristales.

Para realizar la vitrificación primero los embriones son sometidos a distintos baños: por 5min en una solución de PBS + 0.4 % BSA+10% glicerol, después otros 5min en PBS + 0.4 % BSA +10% glicerol + 20% etilenglicol y por último 30seg. en una solución de vitrificación (PBS + 0.4 % BSA +25glicerol +25% etilenglicol) y se aspiran dentro de la pajilla francesa (0.25ml) entre una solución de PBS+BSA+8M de sacarosa separadas cada una por una burbuja de aire y se sella. Al cumplirse 30seg. se sumergen directamente en el nitrógeno líquido y se descongelan con la misma técnica mencionada en la congelación lenta (55, 10). Esta técnica ha sido utilizada en bovinos y en ovinos con buenos resultados (53% de sobrevivencia; (10). Sin embargo, en cabras sigue en investigación ya que los resultados son muy variados y posiblemente se deba a que los embriones caprinos son más sensibles a la toxicidad producida por el crioprotector.

3.3 Vitrificación OPS

Este método tiene la característica de ser ultrarápido y provocar una disminución de la temperatura de 20°C/min, gracias a que el volumen del medio de vitrificación es menor al utilizado en la vitrificación clásica. A su vez permite un mínimo contacto con los crioprotectores disminuyendo así la toxicidad de los mismos (52).

Esta técnica utiliza pajillas francesas ultradelgadas, las cuales tiene un diámetro aproximado de 1mm en un extremo. Los embriones pasan por tres baños con los crioprotectores de la misma forma que en el procedimiento de vitrificación clásica, después del último baño son colocados en una gota de 1-2µl y se introducen en la pajilla por capilaridad, por último se sumergen directamente en el nitrógeno líquido sin sellar la pajilla.

Para descongelar los embriones se sumerge el extremo delgado de la pajilla OPS en el medio (adicionado con 0.33M de sucrosa a 37°C) permitiendo primero la entrada del medio y después tapando el extremo superior con el dedo para que por gravedad los embriones salgan de la pajilla. Luego se colocan los embriones en otro medio con 0.2M de sacarosa por otro minuto y por último se colocan 5min en un medio sin sacarosa y se procede a la transferencia (27).

Las tres técnicas de criopreservación mencionadas buscan evitar el daño a los embriones por los cristales formados en el proceso de congelación y lo hacen por medio de la utilización de los crioprotectores y el paso rápido por la "zona de peligro" que es a los -7°C. En la congelación lenta la protección se realiza por medio del "seeding" y en la vitrificación y OPS por el alto contenido de crioprotectores y la inmersión directa en el nitrógeno líquido. La OPS es un método simple, rápido, de bajo costo y que ha dado buenos resultados en ciertas especies, especialmente en cerdos. En pequeños rumiantes los resultados son variados es por eso que esta nueva técnica sigue en investigación (9). En comparación con la vitrificación el método OPS proporciona un mayor rango en el cambio de temperatura 20°C/min contra 2°C/min de la vitrificación clásica, reduce el volumen del medio 2µl contra 0.25ml de las pajillas estándar y es más rápida por su forma de empajillar por capilaridad. La desventaja es que al ser las pajillas abiertas se pueden llegar a contaminar por el nitrógeno líquido (51).

Con embriones frescos se obtiene un 60% de cabritos nacidos/embriones, y en el caso de ser congelados con la técnica de congelación lenta se obtienen un 55% de cabritos nacidos/embriones (9). Si se aplica la vitrificación tradicional o la OPS los resultados post-descongelación son mucho menores (20 y 10% cabritos nacidos/embriones respectivamente). Cabe decir, que la transferencia tradicional con embriones ovinos vitrificados tiene muy buen resultado. Esta técnica tiene la ventaja que se puede seleccionar morfológicamente a los embriones aparentemente viables, la desventaja es que el procedimiento es más lento, se necesita personal preparado y tiene un mayor costo.

Hasta ahora los mejores resultados de la transferencia de embriones caprinos congelados se han obtenido a partir de la utilización de embriones congelados por el método de congelación lenta y transferidos tradicionalmente. El problema de esta técnica, es el costo por lo que se está buscando estandarizar la técnica de congelación rápida y con transferencia directa para aplicarla en dicha especie. De esta forma disminuirían los costos y se facilitarían el manejo de las técnicas. Sin embargo, los resultados de fertilidad post-descongelación obtenidos con las técnicas de congelación rápida en cabras son muy bajos actualmente y es necesario seguir investigando (4, 23).

4. TRABAJOS EXPERIMENTALES

4.1 Efecto de un antagonista de GnRH, Antarelix ®, en la respuesta ovulatoria y producción de embriones en cabras superovuladas

Introducción

Los tratamientos de superovulación producen el incremento del número de ovulaciones de los ovarios gracias a la estimulación con hormonas gonadotrópicas. El grado de respuesta a estos tratamientos está ligado al número y tamaño de los folículos presentes al momento de la estimulación gonadotrópica. La utilización del agonista de GnRH (14 días) y del antagonista de GnRH (10 días) antes de la estimulación con FSH/LH produce un aumento de folículos no dependientes del efecto gonadotrópico (< 2mm).

El efecto del antagonista de GnRH , Antarelix®, ha sido estudiado en bovinos y en ovinos, donde se ha visto que induce un aumento de folículos < 2mm (42) lo que permite en ovinos una recolección de más de 50% más de embriones después del tratamiento superovulatorio (14). En cabras este protocolo permite un incremento del número de ovulaciones pero no del número de embriones(Baril, datos no publicados).

Actualmente en caprinos se ha demostrado una baja tasa de fecundación *in vivo* en las hembras donadoras después del pre-tratamiento con Antarelix (Cuadro 7). Todavía se desconoce la razón de este fenómeno, existen dos teorías: una de ellas plantea que a partir del tratamiento con Antarelix hay una alteración en la maduración del ovocito debido a un desbalance esterooidal causado por la inhibición de LH. La otra teoría plantea que puede haber una alteración del medio intrauterino que conlleva a una deficiencia en el transporte de los espermatozoides y/o de la viabilidad.

Par evaluar si el tratamiento con Antarelix afecta la calidad del ovocito y por esa razón baja la tasa de fecundación *in vivo*, se realizó el siguiente experimento, donde se eliminó la variabilidad del transporte de espermatozoides y/o viabilidad por medio de la utilización de la fecundación *in vitro*. A su vez se analizó el efecto de Antarelix sobre la respuesta ovulatoria y la producción de embriones.

Material y métodos

Para la realización del siguiente experimento se utilizaron cabras multíparas, no lactantes y en época reproductiva de las razas Alpina y Saanen. Los tratamientos se realizaron con el siguiente protocolo (Cuadro 6), a continuación del cual se hizo la recolección de ovocitos y el cultivo *in vitro* .

Prevía a esta investigación se realizó la producción *in vivo* de embriones caprinos el mismo protocolo que a continuación se presenta pero a diferencia de esté la fecundación se realizó por IA, los resultados se muestran en el Cuadro 7 (Baril, datos no publicados).

Cuadro 6: Protocolo de superovulación para cabras del grupo testigo y del grupo tratado con Antarelix.

	Testigo (16 cabras)	Tratados (14 cabras)
Lote 1 (octubre 2002)	4	4
Lote 2 (noviembre 2002)	6	5
Lote 3 (diciembre 2002)	6	5
Día /Hora	Testigo	Tratados
1 9-11 horas	Ecografía	Ecografía + Antarelix 0.5mg
2 8horas	Esponja con 45mg FGA	Esponja con 45mg FGA + Antarelix 0.5mg
3 8horas		Antarelix 0.5mg
4 8horas		Antarelix 0.5mg
5 8horas		Antarelix 0.5mg
6 8horas		Antarelix 0.5mg
7 8horas		Antarelix 0.5mg
8 8horas		Antarelix 0.5mg
9 8horas		Antarelix 0.5mg
10 8horas		Antarelix 0.5mg
11 8horas 17horas	Ecografía	Ecografía + Antarelix 0.5mg 6mg FSH + 0.2ml Estrumate *
12 8horas 17horas	4mg FSH + 0.2ml Estrumate	6mg FSH 4mg FSH
13 8horas 17horas	4mg FSH, 3mg FSH	4mg FSH 3mg FSH
14 8horas 21horas	3mg FSH, 2mg FSH/LH + retiro de esponja	3mg FSH 2mg FSH/LH + retiro de esponja
15 8horas	2mg FSH/LH	2mg FSH/LH
16 8horas	2mg FSH/LH + pLH 3mg IV	2mg FSH/LH + pLH 3mg IV
17 13-4horas	Colección de ovocitos	Colección de ovocitos

Relación de FSH/LH = 0.3

*: análogo de prostaglandina inyectable, Schering Plough

pLH: Hormona Luteconizante porcina

Nota : La detección de estro se realizó cada 4 horas a partir de 16h hasta 44h después de retirar la esponja. Estos 3 tratamientos fueron comparados con la respuesta al tratamiento de Antarelix en la producción de embriones in vivo (lote testigo 12 cabras y lote Antarelix 12 cabras)

La primera ecografía se realiza para equilibrar al grupo testigo y al experimental en cuanto al número de folículos pequeños (2-3 mm), medianos (4-5 mm) y grandes folículos (≥ 5 mm) presentes en cada cabra. En el grupo experimental se utilizó la inyección del antagonista de GnRH (Antarelix®: Europeptides, Argenteuil, Francia) por vía subcutánea (0.5 mg/día) por 11 días en la tabla del cuello, con el fin de preparar al ovario antes de la estimulación gonadotrópica y reclutar a los pequeños folículos. En ambos grupos al segundo día se les colocó una esponja vía intravaginal impregnada de 45mg FGA (Chronogest ND, Intervet, Angers, Francia) durante 12 días. Tres días antes de retirar la esponja se inyectó por vía intramuscular 0.2ml de Estrumate con el fin de destruir algún cuerpo luteo existente. La FSH/LH se aplicó vía intramuscular en la tabla del cuello (Stimufol ND-Universidad de Liège et Merial, Bélgica) a partir del día 12 hasta el día 15 (un día después de retirar la esponja intravaginal) a dosis decreciente y para inducir la ovulación se inyectó, 24 horas después de la última dosis de FSH/LH, 3mg de pLH vía intravenosa. ¡5 horas después se realizó la recolección de ovocitos.

En el lote 1 la recolección de ovocitos después de la ovulación se realizó por la técnica de laparotomía previamente (Punto 2.1.5). En el lote 2 y 3 la recolección se realizó a partir de la obtención del aparato reproductor de las cabras inmediatamente después del sacrificio; primero se contaron los cuerpos lúteos de cada ovario y luego se disecó el oviducto junto con la bursa ovárica de cada cuerno uterino y se lavó cada uno con 40ml de PBS a 37°C.

En los 3 lotes, los ovocitos recolectados fueron evaluados morfológicamente, y se realizó el procedimiento de la fertilización *in vitro* (FIV) descrita en el punto 2.2.3, luego se incubaron por 7 días a una temperatura de 39.°C, en una atmósfera con 5% de dióxido de carbono y una alta humedad. A las 24h y 32h se observó la división y se obtuvo la tasa de fecundación. Siete días después de la fecundación se observó el grado de desarrollo embrionario y se realizó la comparación estadística entre el grupo testigo y experimental.

Análisis estadístico: La evolución de la población folicular durante el tratamiento y la comparación del número de folículos, de ovulaciones y de blastocistos entre los tratamientos fueron calculados por un análisis de variancia de una vía (GLM-SYSTAT) y por una Prueba T de comparación de medias. La tasa de división y de desarrollo *in vitro* de embriones fueron comparados por Chi cuadrada.

Resultados

1: Efecto del tratamiento gonadotrópico combinado con Antarelix sobre el estado del ovario y el número de ovulaciones a partir de la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

La preparación del ovario durante 11 días con el tratamiento del antagonista a GnRH permite obtener un aumento significativo en cuanto a los folículos de 1-2mm (P=0.002) y una disminución significativa (P=0.000) de folículos >5mm al final del tratamiento. A partir del tratamiento superovulatorio se observó que el grupo tratado presenta una mayor tasa de ovulación (P= 0.005) sin afectarse el tiempo de aparición del estro después del retiro de la esponja. (Cuadro 8)

2: Efecto del tratamiento con Antarelix en la producción de embriones *in vivo*.

La producción de embriones *in vivo* a partir del tratamiento con el antagonista de GnRH muestra una disminución fuerte (P=0.001) en la producción de embriones transferibles. (Cuadro 7)

3: Efecto del tratamiento con Antarelix en la producción de embriones *in vitro*.

La tasa de recolección de ovocitos en cabras tratadas con Antarelix es menor que en las hembras testigo (64.3% vs 72.6% respectivamente), igualmente la tasa de fecundación disminuyo (86.3% vs 94.8%), aunque sigue siendo una buena tasa de fecundación *in vitro*. (Cuadro 9)

Después del tratamiento en el lote 1 hay un aumento en el número de folículos pequeños y hay una disminución de folículos mayores a 3mm lo cual demuestra que el tratamiento funciona como se esperaba: La tasa de fecundación *in vitro* es mayor en el grupo testigo que en el grupo tratado (93% vs 78%), pero esta última proporción sigue siendo una buena tasa de fecundación en relación a los porcentajes promedio obtenidos en la fecundación *in vitro*. (Cuadro 10)

Cuadro 7: Comparación de la respuesta ovulatoria y producción de embriones de un tratamiento testigo con 16mg de FSH/ 3días contra la utilización de Antarelix 0.5mg/11 días y 30mg de FSH/4 días con fertilización *in vivo*.

Tratamiento	Testigo	Antarelix	Probabilidad
# Cabras	12	12	
# de folículos entre 2-3mm antes del tratamiento con Antarelix	13.8 ± 4.0	13.7 ± 6.0 ^c	
# de folículos entre 3-5mm	2.3 ± 1.6	2.3 ± 2.5	
# de folículos >5mm	2.4 ± 2.3	2.9 ± 1.9 ^c	
#folículos de 2-3mm después del tratamiento con Antarelix	15.0 ± 3.8	18.8 ± 6.6 ^d	P=0.10
# de folículos entre 3-5mm	2.1 ± 1.6	2.0 ± 2.1	
# de folículos >5mm	3.9 ± 2.5	1.1 ± 1.2 ^b	P=0.002
Aparición del estro después de retirar la esponja (horas)	24 ± 2.5	20.7 ± 1.6	P=0.02
# de cuerpos luteos (CL)	16.8 ± 7.4	28.8 ± 11.6	P=0.006
Óvulos colectados/ CL (%)	140/202 (69%)	207/364 (57%)	P<0.01
Tasa de fecundación (%)	131/140 (94%)	59/207 (29%)	P<0.001
Emb.retardados /O. Fecundados %	34/131 (26%)	31/59 (52%)	P<0.001
Emb. Transferibles	8.1 ± 4.6	2.3 ± 2.5	P= 0.001

Baril , datos no publicados a vs b: P < 0.01 ; c vs d: P= 0.06 antes y después del tratamiento

Cuadro 8: Control de la respuesta ovulatoria y producción de embriones a partir de la comparación de un tratamiento testigo con 16mg de FSH/ 3días contra la utilización de Antarelix 0.5mg/11 días y 30mg de FSH/4 días con fertilización *in vitro* e *in vivo*. (5 lotes)

Tratamiento	Testigo	Antarelix	Probabilidad
# Cabras	28	27	
# de folículos entre 2-3mm antes del tratamiento con Antarelix	13 ± 5.8	13.1 ± 5.2 ^a	
# de folículos entre 3-5mm	2.8 ± 2.2	2.4 ± 2.6	
# de folículos >5mm	2.9 ± 2.0	3.4 ± 2.3 ^c	
#folículos de 2-3mm después del tratamiento con Antarelix	14.0 ± 3.8	17.9 ± 5.1 ^b	P=0.002
# de folículos 3-5mm	3.1 ± 2.5	2.6 ± 2.1	
# de folículos >5mm	4.0 ± 2.0	1.0 ± 1.1 ^d	P=0.000
Presentación del estro después de retirar la esponja (horas)	25.0 ± 5.9	22.8 ± 7.2 (n=26)	No significativa
# de cuerpos lúteos (CL)	16.5 ± 9.5	24.3 ± 10.2 (n=26)	P=0.005

a vs b : P<0.001; c vs d : P<0.001 antes y después del tratamiento.

Cuadro 9: Relación de ovocitos recolectados con el número ovulaciones y tasa de fecundación. (L.1-3)

Tratamiento	Testigo	Antarelix
# Cabras	16	15
O. colectados/ CL	188/259 (72.6%) ^a	200/311 (64.3%) ^b
O. Fecundados/ O. utilizados	145/153 (94.8%) ^a	120/135 (86.3%) ^b

a vs b : P < 0.05

Cuadro 10: Comparación de la respuesta ovulatoria y producción de embriones de un tratamiento testigo con 16mg de FSH/ 3días contra la utilización de Antarelix 0.5mg/11 días y 30mg de FSH/4 días con fertilización *in vitro*. (Lote 1)

Tratamiento	Testigo	Antarelix
# Cabras	4	4
# de folículos entre 2-3mm antes del tratamiento con Antarelix	11.25 ± 7	9 ± 4.6
# de folículos entre 3-5mm	3 ± 3.8	3.2 ± 2.4
# de folículos >5mm	2.5 ± 1.7	2.2 ± 0.9
#folículos de 2-3mm después del tratamiento con Antarelix	10.5 ± 2.3	13.3 ± 1.7
# de folículos entre 3-5mm	5.5 ± 3.1	3.7 ± 1.9
# de folículos >5mm	4.5 ± 3.1	1 ± 0.8
Presentación del estro después de retirar la esponja (horas)	24 ± 8	19 ± 3.8
# de cuerpos luteos (CL)	15.7 ± 12.5	23.5 ± 9.9
Ovocitos colectados/ CL (%)	57/63 (90%)	69/94 (73%)
Ovocitos fecundados / Ovocitos utilizados (%)	43/46 (93%)	47/60 (78%)
Blastocistos día 7/Ovocitos segmentados	32/43 (74)	33/47 (70)

Discusión

Para producir un mayor número de embriones es necesario aplicar a las hembras donadoras tratamientos superovulatorios. Estos tratamientos permiten la producción media de 15 ovulaciones por cabra a partir de la utilización de pFSH, sin embargo, existe una variabilidad de la respuesta debido al estado folicular del ovario al aplicar el tratamiento (14). Para disminuir esta variabilidad se pueden utilizar los antagonistas o los análogos de GnRH, los cuales inhiben la secreción de las hormonas gonadotrópicas (LH, FSH). Los antagonistas de GnRH se unen a los receptores de GnRH en la adenohipófisis compitiendo directamente con la GnRH endógena, su efecto es inmediato y de larga duración. La ausencia de FSH y LH a nivel del ovario detiene el desarrollo folicular terminal entonces se suprime el efecto de dominancia y por lo que los folículos grandes (> 3mm) se vuelven atrésicos lo que permite el reclutamiento de otros pequeños folículos (1-2mm) dentro de la segunda oleada folicular (50). En la producción de embriones ovinos se ha comprobado que la utilización de un antagonista de GnRH (Antarelix) como tratamiento para preparar al ovario antes de la estimulación gonadotrópica puede aumentar el promedio de folículos pequeños y por ende de ovulaciones (alrededor del 50%). Sin embargo, sigue presentándose una variabilidad en la respuesta ovulatoria (23). Al igual que en los ovinos, en la cabra se observa cómo este mismo tratamiento permite una disminución de los folículos mayores a 3mm y un incremento del número de folículos pequeños (1-2mm) y por lo tanto del número de ovulaciones después de la estimulación gonadotrópica (Cuadro 8). Pero a diferencia de lo que sucede en ovinos, vemos que en la producción de embriones *in vivo* las tasas de fecundación, de recuperación de embriones y de embriones transferibles (mórula compacta a blastocisto) es muy baja (Tabla 2). Esto se podría deber a algún problema en la fecundación o la maduración de los ovocitos (Baril, datos no publicados).

En la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* vemos que la recuperación de ovocitos de las cabras tratadas con Antarelix es menor en ambos casos, en comparación con el grupo testigo (Tabla 2 y 3). Dado que el Antarelix aumenta la tasa de ovulación y por consecuencia el tamaño del ovario pudiera ser que la bursa ovárica no alcance a captar todos los ovocitos (Baril, datos no publicados).

Cuando se realizó la fecundación *in vitro* de los ovocitos recolectados se observó que la tasa de fecundación es ligeramente más baja en los animales que fueron tratados con el

antagonista de GnRH (Cuadro 9 y 10), esta diferencia puede deberse a una alteración en el desarrollo final del ovocito debido al desbalance hormonal causado por el tratamiento. Sin embargo, no deja de ser una buena tasa de fecundación, por lo que se deduce que la calidad del ovocito no es la causa principal de la baja tasa de fecundación *in vivo* presente en cabras tratadas con Antarelix (Baril, datos no publicados).

Por consiguiente, podría suponerse que el efecto negativo de Antarelix en la tasa de fecundación *in vivo* y la tasa de desarrollo (Cuadro 7) está probablemente ligada a una alteración en el transporte de espermatozoides, a su sobrevivencia en el tracto genital, o a una deficiente unión del espermatozoide con la zona pelúcida.

Estudios en otras especies han comprobado la presencia de GnRH o péptidos similares a GnRH en el tracto reproductivo de la rata, ratones y humanos. En la hembra se ha encontrado en el líquido folicular, en el útero y en los cuernos uterinos y en el macho en el plasma seminal y testículos, por lo que se cree que esta hormona juega un papel local durante la fecundación. Se ha encontrado en humanos que el tratamiento con GnRH aumenta la unión de espermatozoides a la zona pelúcida y en bovinos tiene el mismo efecto en la fertilización *in vitro*, en ambos casos se ha visto que ese efecto es inhibido en presencia del antagonista de GnRH. En ratas y humanos el antagonista de GnRH reduce la tasa de fecundación *in vivo* e *in vitro*, pero no reduce la motilidad, ni el transporte, ni la capacidad para realizar la reacción acrosomal del espermatozoide. Por lo contrario, se ha visto en ratones que el efecto negativo del antagonista de GnRH puede ser invertido al agregar GnRH al medio de cultivo *in vitro* (38, 39).

A partir de estos estudios realizados en otras especies surgen varias hipótesis sobre los factores implicados en la baja tasa de fecundación producida por el tratamiento con Antarelix en la cabra :

1-Un problema en la unión del espermatozoide con la ZP del ovocito: Esta teoría se ha comprobado en ratones (39) y en humanos (38) y sería necesario verificar si no ocurre una situación similar en cabras que recibieron un pre-tratamiento con Antarelix.

2- Una alteración en el medio uterino que afecte el transporte de los espermatozoides o su sobrevivencia: Las hormonas esteroides (estrógenos y progesterona) producidas por los folículos durante el ciclo estral provocan cambios en el medio intrauterino que ayudan a la capacitación y transporte de los espermatozoides (regulado

principalmente por el estrógeno) y la fecundación (donde participa en parte la progesterona la cual induce cambios del flujo de los iones de Ca^{2+} durante la penetración del ovocito). Por lo tanto, el desbalance hormonal causado por la administración de Antarelix y hormonas exógenas puede que altere el medio intrauterino (41, 50). Sin embargo, los estudios de Morales en humanos y ratones muestran que el antagonista de GnRH no afecta el transporte, ni la sobrevivencia de los espermatozoides en estas especies.

A partir de estas hipótesis surgen varios proyectos con el fin de evitar el efecto negativo del tratamiento con el antagonista de GnRH que afecta a las cabras :

a. Evaluar los efectos del antagonista de GnRH sobre los espermatozoides *in vivo* e *in vitro* con un protocolo similar al utilizado en ratones. En el caso de la fertilización *in vivo*, analizar el efecto del antagonista de GnRH introducido directamente en uno de los cuernos uterinos sobre la tasa de recuperación de embriones y la migración espermática. Para la fertilización *in vitro* agregar al semen distintas dosis del antagonista de GnRH y evaluar la tasa de fecundación, la tasa de reacción acrosomal y la capacidad de unión del espermatozoide.

b. Realizar un pre-tratamiento con Antarelix en hembras y comparar la tasa de fecundación a partir de la inseminación con semen fresco con o sin GnRH.

c. En el caso de producción de embriones *in vitro* realizar la fecundación con una dilución del semen mayor a la utilizada de rutina, con y sin el antagonista de GnRH y observar su respuesta sobre la tasa de fecundación. Esto porque se ha visto en cabras que los espermatozoides que llegan a la zona pelucida del ovocito *in vivo* son muy pocos a comparación de los ovinos, y cuando hacemos la fecundación *in vitro* ponemos una alta concentración de espermatozoides, lo que nos puede enmascarar el efecto negativo del antagonista.

d. Buscar la presencia de GnRH en el plasma seminal o de receptores de GnRH en la membrana de los espermatozoides del macho cabrío.

4.2 Efecto de la adición de cisteamina en la maduración *in vitro* de ovocitos caprinos.

Introducción

El glutatión (GSH, γ -glutamyl-cysteinyl-glicine) es un compuesto sulfidrilo no proteico presente en las células de los mamíferos. Es un antioxidante que protege a las células del estrés oxidativo y participa en el transporte de aa, la síntesis de ADN y proteínas y la reducción del disulfido. También interviene en la descondensación y la transformación de la cabeza del espermatozoide al pronúcleo después de la penetración y en paralelo la activación del ovocito. En los ovocitos de los mamíferos la síntesis de GSH se produce durante la primera meiosis, esta parece asegurar la reducción de las proteaminas espermáticas las cuales son responsables de la hipercondensación y del empacamiento del ADN espermático, después de la reducción de los disulfidos, las proteaminas son remplazadas por las histonas del ovocito y el núcleo espermático se transforma en el pronúcleo masculino. (25)

El β -mercaptoetanol y la cisteamina son compuestos tiol (compuestos naturales que participan en la reducción celular) los cuales reducen la cistina a cisteina la que interviene en la síntesis de GSH.

Se ha comprobado en bovinos (25) y ovinos (24) que al agregar de 100 a 200 μ M/ml de cisteamina en el medio de maduración, se favorece la síntesis de glutatión por el ovocito y el desarrollo embrionario al estado de blastocisto.

El presente experimento se realizó con ovocitos caprinos con el fin de estudiar el efecto de la suplementación de cisteamina a distintas dosis y en diferentes medios de maduración. Se analizó la respuesta en cuanto a las tasas de fecundación y la tasa de desarrollo, la cual se evalúa a través del desarrollo del embrión hasta el estado de blastocisto a los 7 días de cultivo. También se midió la concentración de GSH en el citoplasma del ovocito cultivado en el medio de maduración adicionado con diferentes dosis de cisteamina.

Material y Métodos

Se realizó la colección de ovocitos por medio de la aspiración de folículos de más de 2mm de ovarios de cabras sacrificadas en el rastro. El contenido de los folículos se aspiró con un agujero del #19½ con un aspirador automático y se colectó en líquido en tubos Falcón de 50ml con 100UI/ml de heparina, 4mg/mL gentamicina y 10mM de hepes. Se hizo una selección morfológica de los ovocitos y se colocaron en distintos medios de maduración en grupos de 40 a 50 ovocitos en gotas de 0.5ml. Los medios utilizados contenían : TCM199+10% líquido folicular caprino+100ng/ml de oFSH con y sin cisteamina, o bien TCM199+10ng/ml EGF con y sin cisteamina. Parte de los ovocitos se fijaron en etanol 16, 20 y 24 horas después del cultivo y luego se tiñeron con fluorocromo Hoeschst 33342 y se realizaron tres observaciones en el microscopio epifluorescente. Los ovocitos se clasificaron como GVBD (Germinal Vesicle Breakdown), MI (Metafase I) y MII (Metafase II). Los ovocitos degenerados se eliminaron del análisis estadístico y los ovocitos que se encontraban en el periodo de la interfase entre MI y MII se contabilizaron como MII. El procedimiento de la FIV y la MIV se realizó como se menciona en el punto 2.2.3.

En el experimento 1 (7 réplicas) se analizó la maduración nuclear (251 ovocitos), la división celular y el desarrollo (maduración citoplasmática) después de la incubación en presencia de 100µM de cisteamina (759 ovocitos) y sin cisteamina (747 ovocitos), en el medio de maduración TCM199+10% líquido folicular caprino+100ng/ml de oFSH.

En el experimento 2 se analizó el grado de desarrollo embrionario de grupos de 250 complejo ovocito-cumulus (COC) incubados por 24 horas en un medio de maduración TCM199+10ng/ml EGF suplementado con 0, 25, 50, 100 y 200µM de cisteamina y después se pusieron en un medio de cultivo sin cisteamina durante 6, 7 y 8 días de incubación (dpi) y se obtuvo el porcentaje de embriones que llegó al estado de blastocisto. También se comparó el efecto de la cisteamina en el grado de desarrollo de ovocitos cultivados en distintos medios. Para ello los ovocitos se cultivaron en: a) Medio TCM199+100µM de cisteamina y 10 ng/ml EGF, b) Medio TCM199+100µM de cisteamina y 10% de líquido folicular y c) Medio TCM199 con y sin cisteamina.

En el experimento 3 se realizó la medición de la concentración de GSH en grupos de 5 embriones por lote (5 repeticiones), los cuales fueron fertilizados y luego madurados en

medio que contenían cisteamina en dosis de 25, 50 y 100 μ M y sin cisteamina. Por último, se colocaron en medio de cultivo hasta el día 8. Las mediciones se realizaron por “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC) en el laboratorio Isabelle Donnay (Bélgica).

Resultados

Experimento 1:

En la Gráfica 1 podemos observar que la maduración nuclear a las 20 horas (251 ovocitos) en un medio TCM199+10% líquido folicular caprino+100ng/ml de oFSH y cisteamina, presenta una diferencia significativa ($P<0.05$) en la tasa de ovocitos en metafase II en comparación con el control. En los lotes de 16 y 24 horas de maduración el efecto positivo de la cisteamina no es significativo.

En cuanto al grado de desarrollo (1506 ovocitos) se ve en la Gráfica 2 que la adición de cisteamina al medio de maduración permite obtener un mayor número de embriones en estado de blastocisto en relación al total de los ovocitos cultivados y también en relación a los divididos. En la tasa de blastocistos eclosionados no se observó una diferencia significativa entre los dos grupos.

Experimento 2

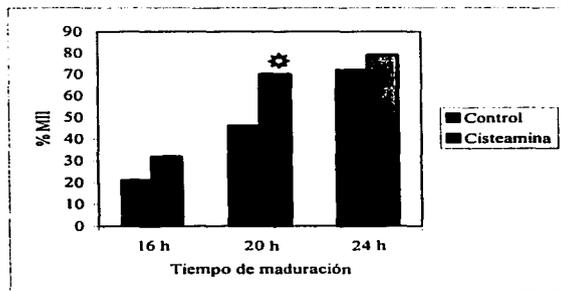
Un total de 250 ovocitos fueron fecundados *in vitro* y madurados en medio TCM con EGF y adicionado con cisteamina a dosis de 0, 25, 50, 100 y 200 μ M para estudiar la respuesta al tratamiento en cuanto a la producción de blastocistos (maduración citoplasmática) a 6, 7 y 8 días después de la incubación. Los resultados que se presentan en la Gráfica 3 muestran que la cisteamina a dosis de 25, 50 y 100 μ M induce un aumento significativo de la maduración citoplasmática.

Por otro lado, se comprobó el efecto benéfico de la cisteamina a dosis de 100 μ M al ser introducida ya sea en el medio TCM con EGF (10 ng/ml EGF) o en el medio TCM con 10% de líquido folicular y oFSH (Gráfica 4). Así mismo ese efecto benéfico de la cisteamina se reafirmó al adicionarla en la misma dosis al medio TCM199. (Gráfica 5)

Experimento 3

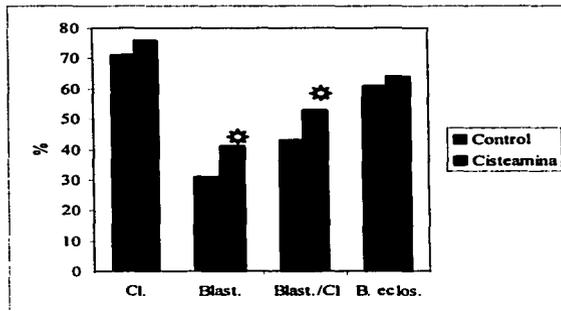
En este experimento se observó que el aumento de la dosis de cisteamina en el medio de maduración esta directamente relacionada con el aumento de la producción de blastocistos y a su vez con la cantidad de GSH en el citoplasma del ovocito.(Gráfica 6)

Gráfica 1: Efecto de la cisteamina sobre la maduración nuclear en TCM199+10% líquido folicular caprino+100ng/ml de oFSH (40-45 ovocitos por grupo).



* Hay diferencia significativa

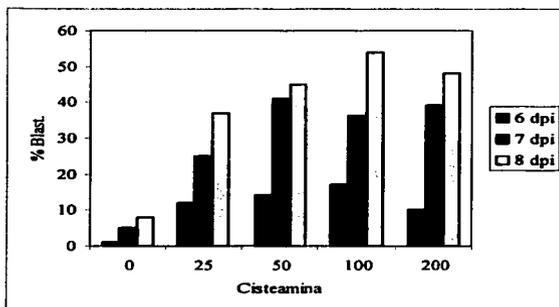
Gráfica 2: Efecto de la cisteamina sobre el grado de desarrollo embrionario en TCM199+10% líquido folicular caprino+100ng/ml de oFSH. ($P < 0.05$)



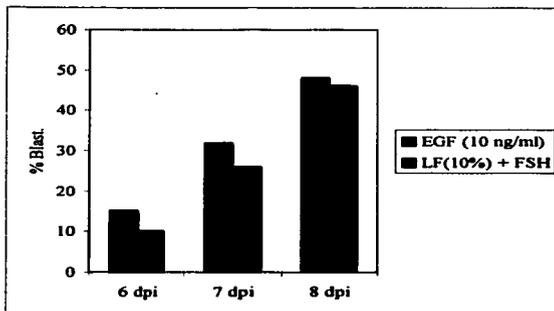
* Hay diferencia significativa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3: Efecto de la dosis de cisteamina (μM) sobre el porcentaje de blastocistos en TCM199 + 10ng/ml EGF.



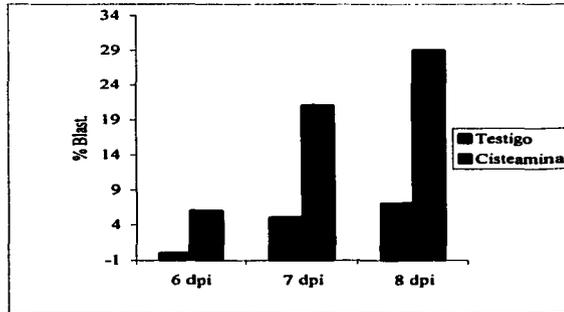
Gráfica 4: Porcentaje de blastocistos en ovocitos cultivados en un medio de maduración con EGF o suplementado con LF+FSH y 100 μM de cisteamina en ambos.



dpi : días post-incubación

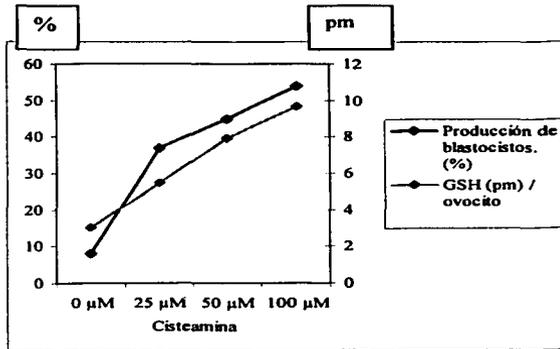
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 5: Efecto de la cisteamina (100 μ M) sobre el porcentaje de blastocistos en TCM 199.



dpi: días post-incubación.

Gráfica 6: Concentración de glutatión por ovocito (pm/ovocito) y producción de blastocistos (%) después de 8 días de incubación en un medio adicionado con 100 μ M de cisteamina.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión

Los resultados de los experimentos descritos más arriba comprueban el efecto benéfico de la cisteamina en los medios de maduración de ovocitos caprinos.

La adición de cisteamina al medio de maduración incrementó el número de ovocitos que alcanzan la fase final de la meiosis. Este incremento es dependiente del tiempo de exposición a la cisteamina y alcanza el pico a las 20 horas. El hecho de que el efecto tienda a igualarse a las 24 horas indica que la cisteamina aceleró el proceso que en ausencia de la misma se lleva a cabo más lentamente como se observa en la gráfica 1.

La cisteamina aumentó el porcentaje de blastocistos, pero tuvo mayor impacto en la tasa de división y en la tasa de blastocistos eclosionados (Gráfica 2). Este efecto se produce por el aumento en la producción de glutatión, gracias a la presencia de cisteamina en el medio de cultivo. La producción de GSH/ovocito aumenta en relación a la cantidad de cisteamina presente hasta $100\mu\text{M}/\text{ml}$. En la Gráfica 5 se observa como el efecto de la cisteamina se hace evidente en un medio simple (TCM199). Estos datos confirman que son varias las sustancias que participan en la maduración del ovocito (28), ya que el porcentaje de blastocistos es considerablemente menor cuando no se le agrega LF o factores de crecimiento al medio de cultivo. Sin embargo, la cisteamina es capaz de causar por si sola un incremento de alrededor de 40% del porcentaje de blastocistos, lo que sugiere que es un potente protector celular durante el proceso de maduración del ovocito (25).

Esta respuesta benéfica de la cisteamina se debe a que es un compuesto tiol el cual ayuda a transformar la cisteina (presente en el medio TCM 199) a cistina la cual participa en la síntesis de glutatión (GSH) durante el ciclo de λ -glutamil. La síntesis de GSH es dependiente de la disponibilidad de cisteina en el medio. El GSH tiene varias funciones entre ellas como agente reductor (antioxidante) que ayuda a proteger a la célula contra el estrés oxidativo que se produce por la formación de óxidos de difulsido durante el proceso de fecundación y maduración. Otra función es que ayuda a la formación del pronúcleo masculino, sin embargo, en estos resultados, se observa que la adición de cisteamina en los medios de maduración *in vitro* no favorece significativamente la tasa de segmentación, pero sí incrementa el desarrollo del cigoto hasta el estado de blastocisto, todo lo cual

sugiere un efecto sobre la proliferación celular a través del aumento de glutatión que su vez podría disminuir la apoptosis (24).

El aumento de GSH en el ovocito y el mejoramiento en el desarrollo embrionario debido a la presencia de cisteamina en el medio se ha comprobado también en ovocitos bovinos (25, 37) y en ovinos (24).

De esta forma se concluye que la utilización de cisteamina en un medio de maduración enriquecido con EGF, es una buena alternativa para estudiar el efecto de otras moléculas sobre la maduración y aumentar la producción *in vitro* de blastocistos en la cabra.

5. CONCLUSIÓN GENERAL DE LA PRÁCTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

La PPS que realicé en el INRA fue importante a nivel académico y personal. La experiencia de trabajar en un grupo dedicado a la reproducción fue muy enriquecedora, debida a la interacción con estudiantes e investigadores de diferentes niveles académicos y nacionalidades. Además de tener la oportunidad de pertenecer temporalmente a un proyecto de investigación de alto nivel, de la mano de un asesor especializado en reproducción caprina y de conocer la disponibilidad de tecnología y equipo que tiene el INRA. Estas experiencias sirven para crear un vínculo entre países latinoamericanos y países europeos como Francia, y sientan un precedente para futuras colaboraciones.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Armstrong DG, Pfizner AP, Warnes GM, Seamark RF. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *J Reprod Fert* 1983; 67: 403-410.
2. Armstrong DG, Webb W. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of reproduction* 1997; 2: 139-146.
3. Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet J.C. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthyg* 1989; 24: 101-115.
4. Baril G, Brebion P, Chesné P. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Roma: FAO; 1995.
5. Baril G, Pougard JL, Freitas VJF, Leboeuf B, Saumande J. A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology* 1996; 45: 697-706.
6. Baril G, Leboeuf B, Remy B, Drion PV, Bernelas D, Bonné JL, *et al.* Effects de la répétition des traitements progestagène/ prostaglandine/ PMSG chez la chèvre. Colloque "Reproduction caprine: nouveaux contextes, derniers acquis" 1998 abril 30. Niort, Francia. 1-5.
7. Baril G, Saumande J. Hormonal treatments to control time of ovulation and fertility of goats. *Memorias del 7º International Conference on Goats, 2000 mayo 15-21; Francia: 400-405.*
8. Baril G, Leboeuf B, Pougard JL, Bernelas D, Bonne JL, Forgerit Y, *et al.* 7a international Conference on goats 2000 mayo France : 15-21.
9. Baril G, Cognié Y, Pougard JL, Leboeuf B, Traldi AS, Guignot F. *et al.* Amélioration des méthodes de cryopréservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Renc. Rech. Ruminants* 2001; 8: 365-368.
10. Baril G, Traldi A-L, Cognié Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 2001; 56: 299-305.
11. Bevers MM, Dieleman SJ, van de Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997; 47: 13-22.
12. Bilton RJ, Moore NW. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust J Biol Sci* 1976;29: 125-129.
13. Brebion p, Cognié Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. 5a Reunión AETE 1989 septiembre 8-9. Lyon, Francia: 106.

14. Brebion P, Baril G, Cognié Y, Vallet JC. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann Zootech* 1992; 41: 331-339.
15. Campbell BK, McNeilly AS, Picton HM, Baird DT. The effect of a potent gonadotrophine-releasing hormone antagonist on ovarian secretion of oestradiol, inhibin and androstenedione and the concentration of LH and FSH during the follicular phase of the sheep oestrous cycle. *Journal of endocrinology* 1990; 126: 377-384.
16. Chemineau P, Gauthier D, Poirier JC, Saumande J, Baril G. Plasma levels of LH, FSH, Prolactine, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in dairy goat. *Theriogenology* 1982; 17: 313-322.
17. Chemineau P, Procureur R, Cognié Y, Lefèvre PC, Locatelli A, Chupin D. Production, freezing and transfer from bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology* 1986; 26: 279-290.
18. Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Leboeuf B. Photopériodisme et reproduction chez les caprins. Colloque "Reproduction caprine: nouveaux contextes, derniers acquis" 1998 avril 30. Niort, Francia. pag
19. Chemineau P, Baril G, Leboeuf B, Maurel MC, Roy F, Pellicer-Rubio M *et al.* Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J Reprod Fertil Supplement* 1999; 54: 129-142.
20. Cocero MJ, Moreno Díaz de la Espina S, Aguilar B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biol Reprod* 2002; 66: 1244-1258.
21. Cognié Y, Chupin D, Saumande J. The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. *Theriogenology* 1986; 25: 148. (abstract)
22. Cognié Y. State of the art in the sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 1999; 51: 105-116.
23. Cognié Y, Baril G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre. *INRA Prod Anim* 2002;15: 199-207.
24. De Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53: 761-771.
25. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 432-436.

26. Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002; 57: 285-302.
27. El-Gayar M, Holtz W. Technical note: Vitriification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J Anim Sci* 2001; 79: 2436-2438.
28. Gardner DK: Changes in the requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 1998; 49: 83-102.
29. Gardner DK. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *Journals of reproduction and fertility supplement* 1999; 54, 461-475.
30. Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognié T. Effect of Growth Factors, EGF and IGF-I, and Estradiol on *in vitro* Maturation of Sheep Oocytes. *Theriogenology* 2000; 54: 209-218. Abstract
31. Hafez ESE. Techniques of collection and transplantation of ova in farm animal. Reprint from the journal of the american veterinary medical association 1958; 133: 506-512.
32. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 1998; 49: 103-114.
33. Kumar H, Yadav MC. Characteristics of estrous cycle in goats: an update. *Inter J Anim Sci* 2000; 15: 13-16.
34. Lamara, F, Fieni L, Mselli-Lakhal G, Chatagnon JF, Bruyas D, Tainturier I, *et al.* Early embryonic cells from *in vivo*-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology* 2002; 58: 1153-1163.
35. Ledda S, Leoni G, Bogliolo L, Naitana S. Oocyte cryoconservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 2001; 55: 1359-1371.
36. Le Gal F, Baril G, Vallet JC, Leboeuf B. *In vivo* and *in vitro* survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology* 1993; 40: 771-777.
37. Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of reproduction and fertility supplement* 1999; 54: 449-460.

38. Morales P, Bredford K, Oliva C, Pizarro E, Kong M. Gonadotropin-releasing hormone antagonists inhibit sperm binding to the human zona pellucida. *Human Reproduction* 1999; 14: 2069-2074.
39. Morales P, Pasten C, Pizarro E. Inhibition of *in vitro* fertilization in rodents by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Biology of reproduction* 2002; 67: 1360-1365.
40. Nishikawa Y, Onuma H. Experiments on Excessive Development of follicles. Studies on the transplantation of ova (Artificial Pregnancy) in goats. Y.1963; 117: 519-676.
41. Oussaid B, Mariana JC, Poulin N, Fontaine J, Lonergan P, Beckers JF, Cognié Y: Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 71-77.
42. Oussaid B, Lonergan P, Khatir H, Guler A, Monniaux D, Trouze JL, *et al.* Effect of GnRH antagonist- induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence *in vitro* in superovulated heifers.(abstract). *J Reprod Fertil* 2000; 118:137-144.
43. Pereira R, Sohnrey B, Holtz W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with PGF2 α and oxytocin. *J.Anim Sci.* 1998; 76: 360-363
44. Rajnchapel-Messaï J. Reproduction animale: Les technologies de l'embryon. *Biofutur* 1991: 27-36.
45. Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. *Reviews of reproduction* 1996; 1: 19-27.
46. Rowson LEA. Egg transfer in domestic animals. Reprinted from *Nature* 1971; 233: 379-381.
47. Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Mejia O, Cerbón JL, Caballero V, *et al.* Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: Effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 1998; 50: 1039-1052.
48. Saumande J. La production d'embryons chez les bovins: Quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation?. *INRA Prod Anim* 1995; 8: 275-283.
49. Teotia A, Taru Sharma G, Majumdar A. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers. *Small Ruminant Research* 2001; 40: 165-177.