



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

EFFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (rbST)
APLICADA AL MOMENTO DEL SERVICIO EN OVEJAS
SUPEROVULADAS SOBRE CALIDAD, DESARROLLO
EMBRIONARIO Y EL PORCENTAJE DE CONCEPCIÓN
DE LOS EMBRIONES TRANSFERIDOS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUIS VICTORIO DÍAZ RODRÍGUEZ

TUTOR:

CARLOS G. GUTIERREZ AGUILAR

COMITÉ TUTORAL

LUIS A. ZARCO QUINTERO

M. TERESA SANCHEZ TORRES ESQUEDA

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

D E C L A R A C I Ö N

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Luis Victorio Díaz Rodríguez

DEDICADO:

A LA MEMORIA DE MI HERMANO **FIDEL** QUIEN PARTIÓ EL
9 DE FEBRERO DE 2006
“ALGUN DIA EN AQUEL LUGAR TE VOLVERE A VER”

A mis Padres:

Marcos Fidel Alberto Díaz Baños y Rosa Alba Rodríguez Viruel
Sin ustedes nada de esto seria posible gracias por apoyarme siempre en todos mis
proyectos y orar por mi cada día, Les Amo.

A mis Hermanos:

Lupita y Alberto por estar ahí siempre.

A mis sobrinos:

Isé, Mitzi, Karla, Ami, Fidelito
Por la Fuerza y Amor que me dan.

A Kenia:

Por el Amor que nunca dejara de brillar en nuestro corazón
Te Amo

**Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere
debajo del cielo tiene su hora.
Eclesiastés 3:1**

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor principal, el Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar. Gracias por la paciencia y el apoyo incondicional.

Al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero.

A la Dra. María Teresa Sánchez Torres Esqueda.

Al Dr. Joel Hernández Cerón.

Al Departamento de Reproducción de la UNAM.

Al CEIEPO

Al Rancho LA JOYA.

Al MVZ. José Ignacio Lozano Torres.

Al MVZ MC Víctor Manuel Martínez Torres.

Al CONACYT por la beca de estudios.

A la Dra. Aranza, Dra. Lucy, Dra. Mariana, Anita, Fernanda, Clarisa, Dr. Octavio, Bruno, Mario, Rosita, Adriana, Dr. Balcazar, Enrique, Silene, Toño, Yolanda.

Al PAPIIT, IN223907, DGAPA, UNAM por el financiamiento para realizar los estudios.

INDICE

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	3
2.1 Hipótesis	
2.2 Objetivo	
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Somatotropina.....	4
3.1.1 efecto de la BST en fertilidad y desarrollo embrionario.....	6
3.2 Desarrollo embrionario temprano.....	7
3.3 Supervivencia embrionaria.....	8
3.3.1 Factores genéticos que afectan la supervivencia embrionaria.....	9
3.3.2 Factores nutricionales que afectan la supervivencia embrionaria.....	9
3.3.3 Factores endocrinos que afectan la supervivencia embrionaria.....	10
3.3.4 Temperatura y su efecto en la supervivencia embrionaria.....	10
3.3.5 Agentes infecciosos y su efecto en la supervivencia embrionaria.....	10
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
4.1 Localización.....	12
4.2 Animales y alimentación.....	13
4.3 Sincronización y superovulación de ovejas donadoras.....	13
4.4 Sincronización de receptoras.....	16
4.5 Colección y clasificación de embriones.....	16
4.6 Transferencia de embriones.....	20
4.7 Análisis estadístico.....	20
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSIÓN.....	24
7. CONCLUSIÓN.....	29
8. LITERATURA CITADA.....	31

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Figura 1.- Esquema de superovulación y transferencia de embriones.	14
Figura 2.- Embriones en diferentes estadios de desarrollo.	19
Figura 3.- Figura 3: Porcentaje de concepción de los embriones transferidos.	23
Cuadro 1.- Clasificación de embriones, de acuerdo a su grado de desarrollo.	17
Cuadro 2.- Producción de embriones por oveja.	21
Cuadro 3.- Porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones transferibles, mórulas y blastocitos de ovejas tratadas o no con rbST al momento del servicio.	22
Cuadro 4.- Porcentajes de concepción en receptoras tratadas o no con rbST, que recibieron embriones provenientes de donadoras tratadas o no con rbST.	27

RESUMEN

Con el objetivo de probar si la aplicación de hormona de crecimiento (rbST) al momento del servicio aumenta la calidad y desarrollo así como el porcentaje de concepción de los embriones transferidos en ovejas, se realizaron dos experimentos: en el primero se utilizaron 15 borregas de las razas Suffolk y Rambouillet, las cuales fueron sincronizadas con esponjas de FGA y superovuladas con FSH y al momento del servicio las ovejas se asignaron a dos tratamientos 1) "Grupo tratado" (n=7) que al momento del servicio se le aplicó 125 mg de rbST, 2) "Grupo testigo" (n=8) al que se le aplicó 1 ml de solución salina fisiológica. El día 6.5 del ciclo se realizó la colección de embriones por laparotomía medio ventral. La cantidad de ovocitos fertilizados, embriones transferibles, y blastocitos entre grupos se analizaron mediante una prueba de regresión logística. La proporción de embriones transferibles fueron mayor para el grupo tratado 91.30% vs 59.38% del grupo testigo ($P < 0.05$). El porcentaje de embriones que llegaron a la etapa de blastocito fue mayor para el grupo tratado 50.72% que para el grupo no tratado 25.00%, sin embargo no se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$). En el segundo experimento las ovejas se sincronizaron y superovularon de la misma forma que en el experimento 1, y se asignaron a uno de dos grupos al momento del servicio 1) Grupo Tratado 2 (n=6) que recibió 125 mg de rbST, 2) grupo testigo 2 (n=6) que recibió 1ml de solución salina fisiológica. El día 6.5 se hizo la colección por laparoscopia media ventral, se clasificaron las estructuras encontradas y la cantidad de estructuras obtenidas se analizó por una prueba de regresión logística. Las proporciones de los embriones transferibles fueron del 100% para el grupo tratado vs 88.24% del grupo testigo ($P < 0.05$). Mientras que el porcentaje de embriones que llegaron a blastocitos fue de 35.14% en el grupo tratado vs 35.29% del grupo testigo, sin diferencias estadísticas ($P > 0.05$). Los embriones se transfirieron a ovejas receptoras sincronizadas con esponjas de FGA, que al inicio del estro se asignaron a dos grupos 1) Receptoras tratadas (n=28) que recibieron 125 mg de rbST, 2) Receptoras testigo (n= 31) que recibieron 1 ml de solución salina fisiológica. Los embriones provenientes de donadora tratada se transfirieron tanto a receptoras del grupo tratado como a receptoras del grupo testigo y embriones provenientes de donadoras testigo se transfirieron tanto a receptoras testigo como a receptoras tratadas en un modelo factorial 2 X 2. No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de gestaciones entre los grupos de receptoras. (63.6% receptoras testigo transferidos con embrión de donadora testigo, 53.8 % receptoras tratadas transferidos con embrión de donadora testigo, 76.4 % receptoras testigo transferidos con embrión de donadora tratada, 66.6 % receptoras tratadas transferidos con embrión de donadora tratada). En conclusión la aplicación de hormona de crecimiento (rbST) en el momento del servicio aumentó la calidad de los embriones y mejoró el desarrollo embrionario, pero no aumentó los porcentajes de concepción. El efecto positivo de la rbST sobre la fertilidad al aplicarse antes o al momento del servicio puede deberse a mejoras en la maduración, fertilización o desarrollo embrionario. Sin embargo no parece ser mediado a través de mejorar el desarrollo del CL o ambiente uterino.

Palabras Clave: Ovejas, hormona de crecimiento (rbST), embriones, blastocito.

ABSTRACT

Aiming to test whether the application of growth hormone (rBST) at the time of service increases quality and development and the rate of development of embryos transferred into sheep, two experiments were conducted: in the first 15 ewes were used to Suffolk and Rambouillet breeds, which were synchronized with FGA sponges and superovulated with FSH, at the time of service and the sheep were assigned to two treatments 1) "treated group" (n = 7) upon which service was applied 125 mg rBST, 2) "untreated group" (n = 8) which was applied 1 ml of saline solution. 6.5 the day cycle was the collection of embryos by ventral midline laparotomy. The number of fertilized oocytes, transferable embryos, and blastocysts between groups were analyzed using a logistic regression test. The proportion of transferable embryos were higher in the treated group 91.30% vs 59.38% in the control group (P <0.05). The percentage of embryos reached the blastocyst stage was higher for the treated group to 50.72% to 25.00% untreated group, but no statistical difference was found (P > 0.05). In the second experiment, ewes were synchronized and superovulated in the same manner as in experiment 1 and were assigned to one of two groups at the time of service 1) group 2 (n = 6) received 125 mg of rBST, 2) group 2 (n = 6) received 1ml of saline solution. The 6.5 days was the collection laparoscopic ventral half, the structures were classified and the number of structures obtained was analyzed by a test of logistic regression. The proportions of transferable embryos were 100% for the treated group vs 88.24% in the witness group (P <0.05). While the percentage of embryos that reached blastocysts was 35.14% in the treated group vs 35.29% in the untreated group, without statistical differences (P > 0.05). The embryos were transferred to recipient ewes synchronized with FGA sponges, at the beginning of estrus was assigned to two groups 1) Receiving treatment (n = 28) receiving 125 mg of rBST, 2) Receivinng witness (n = 31) who received 1 ml of saline solution. Embryos derived from treated donor were transferred to the receiving group as witness group receiving embryos derived from donor and a witness was transferred to a recipient receiving treated as a witness in a 2 X 2 factorial model. There were no significant differences (P > 0.05) in the percentage of pregnancies among the recipients. (63.6% receiving witness transferred embryo donor witness, 53.8% transferred recipients treated with donor embryo witness, 76.4% receiving witness transferred embryo donor treated, 66.6% transferred recipients treated with donor-treated embryo). In conclusion the application of growth hormone (rBST) in the time of service increased the quality of the embryos and improved embryonic development, but did not increase rates of conception. The positive effect of rBST on fertility applied to the authorities or when the service may be due to improvements in the maturation, fertilization or embryo development. However does not appear to be mediated through improving the development of CL or uterine environment.

Keywords: Sheep, growth hormone (rBST), embryos, blastocyst.

1.- INTRODUCCIÓN

Aunque la fertilidad reportada para vacas y ovejas (90%) es alta (Ayalon *et al.*, 1978; Thatcher *et al.*, 1994), se ha observado que hay una pérdida embrionaria del 20 a 30 % en los primeros 13 días post-fertilización (Dunne *et al.*, 2000), por lo cual la mortalidad embrionaria es el principal problema de fertilidad en los rumiantes (Albihn *et al.*, 1989). La etiología de la muerte embrionaria es de naturaleza diversa, pero puede resumirse en factores genéticos y ambientales (Ayalon *et al.*, 1978). Dentro de los factores genéticos están consideradas las anormalidades cromosómicas, que ocurren con una incidencia del 7.5 % aproximadamente y las cuales pueden producirse en la gametogénesis, la fertilización o la embriogénesis (Wilmot *et al.*, 1986). Los factores ambientales son los responsables de la mayor parte de las muertes embrionarias tempranas, e incluyen los factores de naturaleza hormonal, climática, infecciosa, y nutricional, (Ayalon *et al.*, 1978; Thatcher *et al.*, 1994; Zavy, 1994).

La BST es una hormona producida por los somatotropos en la glándula pituitaria (Bauman, 1993, Etherton y Bauman, 1998) muchos de los efectos de la BST se llevan a cabo de manera directa, pero otros se realizan de manera indirecta a través de los IGF's, los cuales son producidos principalmente por el hígado (Holly y Wass, 1989). En su mayoría los IGF's son generados por el embrión para sostener su propio desarrollo (Gandolfi *et al.*, 1996). El efecto de la BST bovina es mediado por el incremento en las concentraciones circulantes de IGF-I (Buratini *et al.*, 2000).

A nivel ovárico el IGF-I regula la foliculogénesis (Echternkamp *et al.*, 1990) estimulando el crecimiento folicular (Perks *et al.*, 1999). El Cuerpo lúteo (CL) posee receptores para IGF-I y se ha observado que incrementa los niveles de P4 *in vitro* (Einspanier *et al.*, 1990; Lucy *et al.*, 1994). Igualmente se han observado receptores para IGF-I en el epitelio glandular y luminal del útero, en donde regula la actividad glandular y el desarrollo caruncular (Heap *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 2000). Por otro lado, Matsui (1997) observó que el IGF-I estimula el desarrollo del embrión bovino en estado mórula, 5 días después de la fertilización *in vitro*.

La BST administrada al momento de la inseminación ha favorecido la sobre vivencia embrionaria y por lo tanto aumenta los porcentajes de concepción (Moreira *et al.*, 2000, Morales-Roura *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2004), Se ha comprobado que la aplicación de rbST aumenta la proporción de embriones en fases adelantadas de desarrollo al momento de la colección (Rosas *et al.*, 1995), y la administración de rbST cinco días antes del retiro de una esponja con FGA, incrementó la fertilidad y prolificidad en ovejas (Carrillo *et al.*, 2006). En los bovinos la rbST aumenta la proporción de ovocitos fertilizados y el porcentaje de embriones que llegan a la etapa de blastocito (Moreira *et al.*, 2002^b).

Diversos estudios se han realizado utilizando rbST para mejorar la eficiencia reproductiva, evaluando los efectos sobre la acción en la fase folicular y el funcionamiento del CL. Por lo que este trabajo tiene el propósito de evaluar el efecto que tiene la aplicación de 125 mg rbST en ovejas superovuladas donadoras de embriones sobre la calidad y desarrollo embrionario así como el porcentaje de concepción de los embriones transferidos a receptoras tratadas o no con 125 mg de rbST ó 1ml de solución salina fisiológica.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1 HIPÓTESIS

La administración de BST al momento del servicio en ovejas superovuladas mejora la calidad y el desarrollo embrionario; y aumenta el porcentaje de concepción de ovejas receptoras tratadas con (rbST) cuyos embriones provienen de donadoras tratadas o no con rbST.

2.2 OBJETIVO:

Determinar si la administración de somatotropina bovina recombinante (rbST) al momento servicio mejora la calidad y el desarrollo embrionario en ovejas superovuladas e incrementa el porcentaje de concepción en ovejas receptoras tratadas con rbST cuyos embriones provienen de donadoras tratadas o no con rbST.

3.- REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Somatotropina bovina (BST).

La BST es una proteína lineal simple compuesta de 191 aminoácidos y producida por la hipófisis anterior con un peso molecular de 22 kDa. (Grotsky 1979); que presenta una estructura cuaternaria formada por 4 hélices y dos dominios, el somatogénico y el lactogénico (Van der Walt, 1994).

La BST en forma general actúa sobre la síntesis de proteínas, incrementando la retención de nitrógeno y de fósforo en el organismo, aumentando el transporte de los aminoácidos hacia el interior de la célula y estimulando la síntesis de ácidos nucleicos, estimula también la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo, lo que se traduce en la movilización de reservas de grasa (McCutcheon y Bauman, 1986, Bauman, 1999).

Otro de sus efectos es que puede modificar las concentraciones circulantes de las lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), dependiendo tanto de la especie como del tipo de dieta suministrada, y que en los rumiantes son la principal fuente plasmática del colesterol, precursor para la síntesis de esteroides por parte de las células lúteas, por lo que un aumento en sus concentraciones circulantes podría favorecer la mayor producción de progesterona (Spicer y Echterkamp, 1995).

También actúa, directamente uniéndose a los receptores en las células precursoras de huesos, músculos y células grasas, lo que resulta en su diferenciación y proliferación; e indirectamente al estimular a los hepatocitos y otros tipos celulares para que secreten IGF-1, que actúa en los tejidos periféricos promoviendo el crecimiento (Hill 1989, 2000). En bovinos, la mayor parte de los receptores para BST se encuentran en el hígado, donde la unión de la rbST con sus receptores induce la síntesis y secreción de

factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF). Sin embargo los IGF's en respuesta a rbST también se producen en el útero y los ovarios (De la Sota *et al.*, 1993). El tratamiento de hormona de crecimiento recombinante (rbST) en vacas no lactantes y lactantes en balance energético positivo resulta en mayores concentraciones de glucosa, insulina, colesterol, BST e IGFs en plasma así como en un incremento en la producción láctea (Gong *et al.*, 1991). La aplicación de rbST aumenta las concentraciones periféricas de BST dentro de las primeras 24 horas de aplicación (Gong *et al.*, 1991), y permanecen significativamente altas durante 7 días. El incremento en las concentraciones de somatotropina es seguido a las pocas horas por un incremento en los niveles periféricos de IGF-1, que se mantienen elevados hasta por 8 días (Gong *et al.*, 1993).

La rbST ha mostrado incrementar las concentración de P4, en algunos trabajos sobre la aplicación de BST en bovinos tanto en la fase lútea temprana como en la fase lútea tardía, se ha encontrado un aumento en el peso de los cuerpos lúteos en las concentración de P4 en sangre y en el número de folículos (Lucy *et al.*, 1993^a). Los cambios en el tamaño del CL fueron por cambios en las concentraciones plasmáticas de progesterona lo que sugiera que la cantidad total de tejido lúteo fue incrementada por la rbST, y esto a su vez reflejo en el incremento de la progesterona plasmática. Las altas concentraciones de IGF-1 encontradas en la sangre de los animales tratados con rbST pueden haber influido también en el incremento de la producción de progesterona (Lucy *et al.*, 1994).

Por otro lado la P4 se incrementa en cultivos de células de la granulosa y de células lúteas tratadas con IGF-1, y se han encontrado correlaciones positivas entre IGF-1 y P4 en líquido folicular (Lucy *et al.*, 1994).

El tratamiento en ovejas con rbST también causa aumento en la producción de P4. Rosas *et al.*, (2001) encontraron que 100 mg de rbST al momento de detectado el estro aumento las concentraciones de progesterona, significativamente el día 3 y 4, y continuaron elevándose hasta el día 6, mientras que en el grupo testigo permanecieron básicamente estables.

3.1.1. Efecto de la BST en fertilidad y desarrollo embrionario

La mortalidad embrionaria es una de las principales causas de baja fertilidad en animales, y su etiología es diversa, pero se puede resumir en factores genéticos y ambientales. Dentro los factores genéticos están las anomalías cromosómicas, que pueden producirse en la gametogénesis y en la fertilización (Sreenan *et al.*, 2001). Entre los factores ambientales se puede mencionar la temperatura, nutrición y se considera que son los responsables de las muertes embrionarias tempranas (Thatcher *et al.*, 1994, Sreenan *et al.*, 2001).

Hay nuevas terapias hormonales para mejorar la fertilidad y entre ellas se encuentra la rbST (Hernández y Morales 2001). Morales Roura *et al.*, 2000, en vacas repetidoras Holstein con la finalidad de aumentar la fertilidad administraron 500 mg de rbST en el día del estro y una segunda dosis a los 10 días de la primera aplicación a con este tratamiento observaron que se mejoro significativamente el porcentaje de concepción y se observó un aumento en las concentraciones de P4. Resultados similares se encontraron al administrar una sola dosis de rbST al momento de la inseminación (Mendoza 2000), observándose también niveles más altos de IGF-1 en animales tratados.

Moreira *et al.*, (2002) superovularon vacas Holstein para determinar los efectos de la BST bovina en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, y encontraron que los embriones recuperados de las hembras tratadas con rbST tienen mayores probabilidades de supervivencia al ser transferidos a hembras receptoras.

La acción de la rbST sobre el desarrollo embrionario se ha demostrado en varios trabajos de investigación, como la adición de rbST al medio de cultivo que incrementó la proporción de embriones que llegaron a la etapa de blastocito y en vacas superovuladas incrementó la proporción de embriones transferibles (Moreira *et al.*,

2002^a), Morales, (2000) demostró que la rbST incrementa la proporción de embriones transferibles en vacas repetidoras.

Rosas, 2001 encontró que las ovejas del grupo tratados con rbST presentaron blastocitos en estadios más avanzados de desarrollo.

3.2 Desarrollo Embrionario Temprano.

Después de la fertilización y fusión de los gametos se forma el cigoto, que sufre una serie de divisiones mitóticas, proceso conocido por segmentación. La primera división genera un embrión de dos células, las cuales son llamadas blastómeros. Los blastómeros sufren divisiones subsiguientes dentro de la zona pelucida sin pasar a la fase de crecimiento en cada ciclo celular, lo que provoca que el embrión siga manteniendo su tamaño a pesar de tener cada vez un mayor número de células (Crosby *et al.*, 1988).

El material genético del embrión se expresa a partir de la etapa de 8 células lo que quiere decir que antes de ese estado la síntesis de proteínas se lleva a cabo con el RNA materno y los ribosomas que provienen del ovocito. (Crosby *et al.*, 1988)

Cuando los blastómeros ya no se pueden contar de manera precisa el embrión es llamado mórula (16 a 32 células). Las células de la mórula que ocupan la parte externa se compactan más que las del centro y se comienzan a separar en dos poblaciones diferentes: células externas y células internas. Las células internas desarrollan uniones de hendidura que permiten la comunicación intercelular, mientras que las células externas desarrollan unión tipo estrechas que alteran la permeabilidad celular (Crosby *et al.*, 1988).

Las células externas de la mórula tienen una bomba activa de sodio, la cual bombea iones de sodio a la porción central. Esto hace que se aumente la presión hacia adentro de la zona pelucida y el agua se difunde a través de la zona pelucida al interior del embrión y se comienza a formar una cavidad llena de fluido nombrado blastócele (Watson, 1999) y en el trofoectodermo se expresan genes para la formación del blastócele como transportadores de glucosa GLUT-1, GLUT 3, Canales de Na/K (Kaye 1997; Pantaleón y Kaye., 1998, Watson *et al.*, 2004).). En este momento el embrión es denominado blastocito, y pueden reconocerse dos tipos de células: la masa celular

interna y el trofoblasto. La masa celular interna dará origen al embrión, mientras que el trofoblasto al corion. Conforme el blastocito crece, la zona pelucida se comienza a debilitar. El crecimiento y la acumulación del fluido dentro del blastocito, la producción de enzimas proteolíticas por las células del trofoblasto y las contracciones intermitentes del blastocito, son factores que incrementan la presión y causan la ruptura de la zona pelucida, dándose la eclosión o liberación del blastocito (Senger, 2003).

3.3 Sobrevivencia embrionaria.

En ovejas, se ha estimado que solo 70 a 80 % de los óvulos fertilizados llegan al término de la concepción, ocurriendo la mayor parte de las pérdidas embrionarias durante el primer mes (Hanrahan, 2003). El desarrollo del embrión depende del potencial intrínseco de este y de un ambiente adecuado y la mortalidad embrionaria puede ocurrir debido a defectos genéticos producidos durante etapas muy tempranas del desarrollo; sin embargo, la mayor parte de las pérdidas embrionarias se deben a condiciones ambientales adversas (Edey, 1969).

En bovinos, la mortalidad embrionaria se ha identificado como una de las causas más importantes de la baja eficiencia reproductiva, ocurriendo su mayor parte dentro de los primeros 16 días, por lo cual no se detecta una alteración en el intervalo entre estros (Diskin y Sreenan, 1980).

El desarrollo y la sobrevivencia exitosa del embrión dependen de una secuencia integrada de eventos biológicos que involucran al ovario, el embrión, el oviducto y el útero. Esta cadena de eventos inicia con el crecimiento de un folículo preovulatorio, continúa con la maduración del ovocito precedido por el aumento de LH, la luteinización del tejido folicular después de la ovulación, y la fertilización del ovocito en el oviducto. El proceso continúa con el desarrollo del cigoto en el ambiente oviductual, hasta el estado de blastocito, seguido por su transporte al útero. Los ovarios inducen cambios en el aparato reproductor que contribuyen a la elongación de las membranas extraembrionarias y activación de mecanismos dentro del endometrio que resultan en el mantenimiento del cuerpo lúteo para sostener la concepción. Esta

secuencia de eventos permite la viabilidad embrionaria, que involucra una comunicación entre el embrión y el ambiente materno, bajo el control de varios factores endocrinos, parácrinos y autocrinos. Alguna falla entre la relación de éstos puede conducir a una reducida sobrevivencia embrionaria (Thatcher *et al.*, 1994).

3.3.1 Factores genéticos que afectan la sobrevivencia embrionaria.

Las anomalías cromosómicas han sido identificadas como causa de la mortalidad embrionaria temprana y en general se considera que la mortalidad embrionaria temprana es parte del sistema biológico (Zavy, 1994). En diversos estudios realizados en ovejas se ha estimado que las pérdidas embrionarias por anomalías genéticas pueden alcanzar un porcentaje mayor al 15% (Nancarrow, 1994). La mortalidad embrionaria en la inseminación tardía, se debe a la genética del ovocito, ya que éste envejece rápidamente y sufre procesos degenerativos, se considera la vida media del ovocito en pequeños rumiantes es de 8 a 10 horas (Zavy, 1994).

3.3.2 Factores nutricionales que afectan la sobrevivencia embrionaria.

Son muy diversos los factores nutricionales que se han relacionado con la baja en la sobrevivencia embrionaria y entre ellos se ha señalado que el exceso de proteína degradable ruminal de la dieta, produce una elevada concentración de nitrógeno ureico circulante, que puede repercutir en una reducida tasa de concepción (Butler, 1998). Los niveles elevados de amoníaco y urea en sangre pueden provocar niveles similares en tejidos y fluidos uterinos, los cuales podrían afectar tanto la fertilización como la implantación del embrión (Carroll, 1988). En bovinos la tasa de concepción es mayor en vacas que están ganando peso durante el periodo de cruzamiento que aquellas que lo pierden (Plym *et al.*, 1991). A parte las altas concentraciones de glucosa e insulina provocadas por la sobrealimentación, son tóxicas para el embrión (De Hertogh *et al.*, 1991; Chi *et al.*, 2000). Mientras que los estados de desnutrición comprometen el crecimiento e incrementan las pérdidas embrionarias (Borwick *et al.*, 1997).

Por otro lado, en estudios *in vitro* se ha encontrado que la adición de insulina al medio de cultivo incrementa la tasa de segmentación y la proporción de embriones que llegan a

la etapa de blastocito, y disminuye la cantidad de cuerpos apoptóticos en embriones de bovinos (Byrne *et al.*, 2002).

3.3.3 Factores endocrinos que afectan la sobrevivencia embrionaria.

Uno de los factores endocrinos que más afecta la sobrevivencia embrionaria es la insuficiencia lútea, que puede deberse a la presencia de un CL de vida corta (Hunter, 1991; Costine *et al.*, 2001), o bien a un CL de vida media normal, pero que tiene una producción disminuida de P4 (Inskeep, 2004). La regresión prematura del CL se presenta de manera natural después de la primera ovulación de la pubertad, del inicio de la época reproductiva y del inicio de la actividad reproductiva o postparto (Aréchiga-Flores *et al.*, 2004).

3.3.4 Temperatura y su efecto en la sobrevivencia embrionaria.

Las altas temperaturas al momento de la monta y en la segmentación del embrión afectan la sobrevivencia embrionaria. Se ha observado que los embriones en etapas de segmentación, son más sensibles a las altas temperaturas (Thwaites, 1967, Kleemann *et al.*, 2005). Adicionalmente en bovinos se ha observado una disminución en el peso del embrión (Biggers *et al.*, 1987) además de la baja producción de *interferon-tau* (INF-t) en el día 17 post servicio (Putney *et al.*, 1988). Finalmente en bovinos durante el periodo de servicio, el estrés calórico afecta el desarrollo del embrión al elevarse la temperatura uterina, o indirectamente al alterarse el medio ambiente uterino mediante modificaciones del estado endocrino materno (Badinga *et al.*, 1985).

3.3.5 Agentes Infecciosos y su efecto en la sobrevivencia embrionaria.

Existe una alta variedad de agentes infecciosos capaces de provocar muerte embrionaria, como son bacterias, virus, protozoarios y hongos (Zavy, 1994).

Entre las principales bacterias que causan mortalidad embrionaria se encuentran el *Actinomyces pyogenes* (Semambo *et al.*, 1991), el *Campylobacter fetus* y el *Ureaplasma diversum* (Ruhnke *et al.*, 1989); los cuales mas que afectar directamente al embrión, provocan una infección en el aparato reproductor y lo hacen menos propicio para el correcto desarrollo embrionario. Mientras que *Haemphilus somnus* tiene un efecto directo en el embrión (Kaneene *et al.*, 1986). El principal virus causante de mortalidad embrionaria es el *Herpesvirus bovino-1* (Bowen *et al.*, 1985). El principal protozoario implicado es *Trichomonas foetus*, el cual está asociado a una infección purulenta del aparato reproductivo (Skirrow y Durant, 1990), además *candida tropicallis* y *Acremonium kiliense* son dos hongos a los cuales se ha atribuido un efecto negativo sobre el embrión (Corbel, 1988).

4.- MATERIAL Y METODOS

El trabajo se dividió en dos experimentos. En el primer estudio, los embriones colectados se clasificaron pero no se transfirieron mientras que en el segundo estudio los embriones colectados se clasificaron y fueron transferidos.

4.1 Localización

Experimento 1

El experimento se realizó en el centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en producción Ovina (C.E.I.E.P.O.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

El C.E.I.E.P.O. se encuentra localizado en el Km. 53.100 de la carretera federal México-Cuernavaca en el poblado de 3 Marías, Municipio de Huitzilac, Estado de Morelos. A 2810 metros sobre el nivel del mar, a 19° 02' de latitud norte y 99° 16' longitud oeste. El clima es Cb (m) (w) ig, con una precipitación pluvial promedio de 1245 mm y temperatura media anual que oscila entre 12 y 18 °C (García, 1981).

Experimento 2

La segunda parte del estudio se realizó en el Rancho la Joya que se encuentra localizado en Tenextepc Municipio de Atlixco, Estado de Puebla. Ubicado a 1840 m sobre el nivel del mar, 18° 55' de latitud norte y 97° 26' latitud oeste. El clima es Cb (wl) (w) igw, con una precipitación pluvial de 876.6 mm y un promedio de temperatura de 17.9 °C (García, 1981).

4.2 Animales y Alimentación.

Experimento 1

Se utilizaron 15 ovejas ciclando de las razas Suffolk y Rambouillet de entre 2 y 4 años de edad, en plena época reproductiva (Septiembre y Octubre). Los animales se encontraban en pastoreo diurno en praderas con ray-grass, trébol blanco, grama nativa. Y encierro nocturno, donde se les alimentaba, en pesebres con 200 gr de concentrado elaborado en el C.E.I.E.P.O. a base de sorgo, melaza, sales minerales y heno de avena. El agua se les proporciono a libre acceso todo el día.

Experimento 2

Se utilizaron 12 ovejas ciclando de raza pelibuey como donadoras divididas en 2 grupos y 100 ovejas cruce Dorper – Pelibuey como receptoras, de edad entre 2 y 4 años en plena época reproductiva. Las ovejas se encontraban en encierro las 24 hrs del día y se alimentaban con alfalfa achicalada, 200 g de sorgo molido y agua a libre acceso.

4.3 Sincronización y superovulación de ovejas donadoras.

Para la sincronización del ciclo estral de las ovejas, se colocaron esponjas intravaginales durante 10 días con 40 mg de Acetato de Fluorogestona (Chronogest, Intevent, México). Un día antes del retiro de la esponja se inyectaron con 0.075 mg de D-cloprostenol (Prosolvint Intervet, México), un análogo de prostaglandina F_{2α}. Dos días antes del retiro de la esponja se comenzó la superovulación con FSH (Folltropin- V: Bioniche, Animal Health, Canadá, Inc) la cual se administró por vía intramuscular profunda cada 12 horas, en dosis decrecientes para sumar una dosis total de 190 mg. Figura 1.

Después de retiradas las esponjas, se realizó la detección de estros cada 2 horas, utilizando un macho provisto con mandil. Al momento de detectado el estro se le dio servicio cada 6 hrs, mientras que las ovejas estuvieran receptivas.

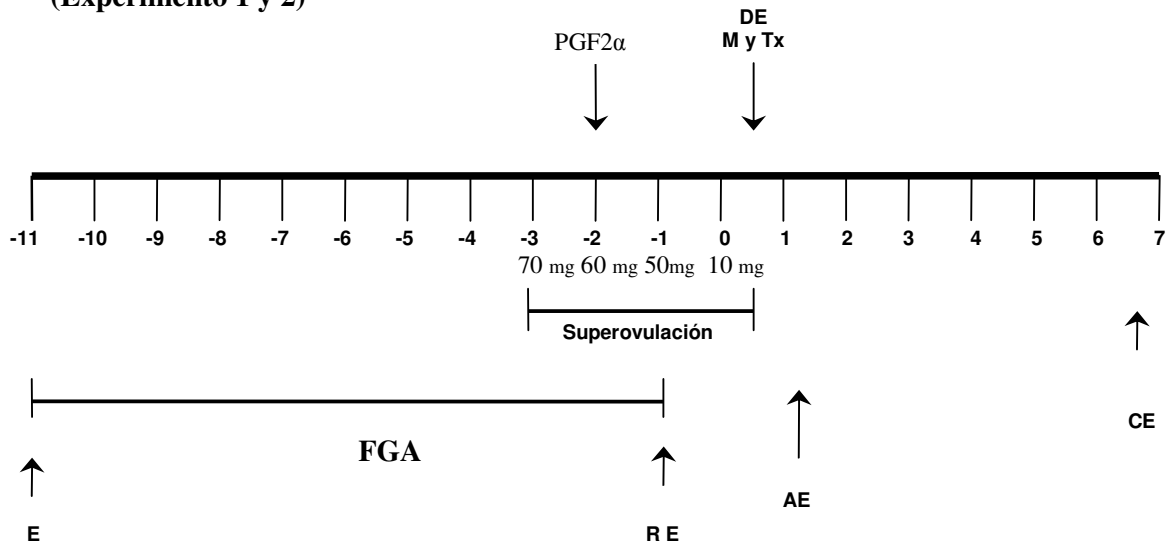
Al momento del primer servicio las ovejas se dividieron en dos grupos: grupo tratado denominado rbST-1 (n=7) en el cual se administraron 125 mg de rbST por vía subcutánea (Lactotropina, Monsanto, México); y grupo testigo denominado Testigo-1 (n=8) al que se le administró 1ml de solución salina fisiológica (Laboratorios PISA, México) vía subcutánea. A ambos grupos se les colocó una esponja intravaginal con 40 mg de FGA 12 horas después de la última monta, para evitar los efectos negativos de la regresión prematura del CL (Espinosa, 1998; Okada 2000). El día del primer servicio se considero como día cero y los embriones se colectaron el día 6.5 mediante laparotomía media ventral (Ishwar y Memon, 1996; Ramon-ugalde *et al.*, 2008).

Las ovejas donadoras del segundo estudio recibieron el mismo tratamiento que las del primer estudio y se les denominó al grupo tratado rbST-2 y al grupo testigo como testigo-2 (Figura 1).

4.4 Sincronización de receptoras.

Las ovejas receptoras de embriones fueron sincronizadas utilizando esponjas intravaginales con 40 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest, Intervet, México). Un día antes del retiro de la esponja recibieron una aplicación de 0.075 mg de D-cloprostenol, (Prosolvin Intervet, México). Las esponjas se retiraron de las receptoras un día antes que sus correspondientes donadoras, 24 horas después de haber retirado la esponja se realizó la detección de estros permanentemente con 3 machos provistos de mandil para evitar la copula. Al momento de detectar el estro, la mitad de las receptoras (n=50) recibieron una inyección de 125 mg de rbST (Lactotropina, Monsanto, México) por vía subcutánea, las 50 hembras restantes recibieron una aplicación de 1ml SSF (laboratorios, PISA, México).

GRUPO Donadoras
(Experimento 1 y 2)



GRUPO Receptoras
(Experimento 2)

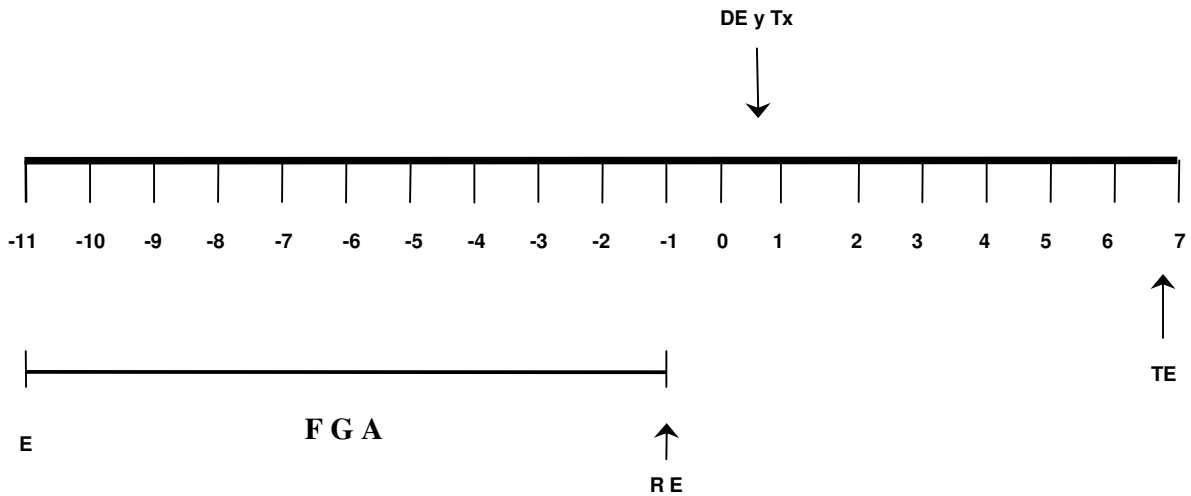


Figura 1. Esquema de sincronización, superovulación y colección de embriones en ovejas tratadas con 125 mg de rbST (grupo tratado) o con 1 ml solución salina fisiológica (grupo testigo); Donde: E= Esponja Intravaginal, PGF2 α = Prostaglandina, DE= Detección de Estro, M= Monta, Tx= tratamiento con rbST o solución salina fisiológica, RE= Retiro de esponja intravaginal, AE= Aplicación de esponja 12 h después de la última monta, CE= Colección de embriones, TE= Transferencia de embriones.

4.5 Colección y clasificación de embriones.

La recolección de los embriones se realizó por laparotomía media ventral el día 6.5 post servicio. Para ello se tranquilizaron con xilacina al 2 % (Rompun Bayer de México, S.A. de C.V.) a razón de 0.11 mg por kilogramo de peso vivo por vía intramuscular y se anestesiaron con 2 mg por kilogramo de peso vivo de ketamina por vía endovenosa (Imalgen 1000 Rhone Merieux, S.A de C.V).

Para la cirugía se rasuró, lavó y desinfectó la región abdominal. Se realizó una incisión de 5 cm de largo, aproximadamente 4 cm anterior a la glándula mamaria, sobre la línea media. Se procedió a exteriorizar el útero. Posteriormente, se lavó cada uno de los cuernos uterinos utilizando una sonda de Foley calibre 10 fr, que se introdujo en la base del cuerno, mediante una punción con un catéter de uso intravenoso de 14 G x 5 ½, por medio de otro catéter de uso intravenoso de 18 G x 1 ¼ insertado en la punta del cuerno que se introdujo el medio de lavado (60 ml de solución Hartman a la que se le agregó 4% de albúmina sérica ovina), que se colectó en un filtro encom. Una vez colectados los embriones, se puso un punto de sutura en el útero donde se introdujo la sonda Foley, el útero se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la incisión.

Los embriones colectados se evaluaron morfológicamente en un microscopio estereoscópico y se clasificaron de acuerdo a la calidad con base a los criterios de Lindner y Raymond. Se consideraron como embriones transferibles a las mórulas y blastocitos clasificados morfológicamente como de calidad 1 y 2. a) calidad 1 ó excelentes: embriones compactos y esféricos, simétricos y con células de tamaño, color y texturas uniformes, sin gránulos citoplasmáticos, con pocas vesículas pequeñas, y con el espacio perivitelino vacío. b) Calidad 2 ó buenos: ligera asimetría, pocos blastómeros extruidos y ligero retardo en su desarrollo, con imperfecciones menores en estas características. c) calidad 3 ó regulares: ligero grado de degeneración. Blastómeros esféricos dispares poco compactos y de tamaño variable, retardo de 1 a 2 días en su desarrollo, masa celular aparentemente viable, grandes vesículas entre sus células, color muy claro u oscuro, irregulares en la superficie de la masa celular, material de desecho

en el espacio perivitelino, d) calidad 4 ó degenerado: zona pelucida rota. Blastocite no visible, grandes zonas de degeneración, poca cantidad de células, blastómeros sueltos de diferentes tamaños. Los embriones calidad 3 y 4 se consideraron como no transferibles. Por otro lado, el desarrollo de los embriones se calificó en 6 categorías, a cada una de las cuales se les asignó una escala numérica, correspondiendo al 1 al menos desarrollo y el 6 al máximo desarrollo (Cuadro 1) (Lindner y Raymond, 1983).

Se le denominó estructuras a los ovocitos y embriones colectados en el lavado uterino de las ovejas superovuladas, para obtener el porcentaje de ovocitos fertilizados se dividió el total de embriones entre el número de estructuras colectadas, para obtener el porcentaje de embriones transferibles se dividió el número de embriones de calidad 1 y 2 entre el total de estructuras obtenidas en la colección.

Cuadro 1.- Clasificación de embriones, de acuerdo a su grado de desarrollo.

1= Morula
2= Morula Compacta
3= Blastocito Inicial
4= Blastocito
5= Blastocisto Expandido
6= Blastocito Eclosionado

Mórula: Es comúnmente llamada “bola de células.” Es difícil de diferenciar los blastómeros unos de otros. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

Mórula Compacta: los blastómeros están adheridos formando una masa compacta, la masa embrionaria ocupa del 60 a 70 % del espacio perivitelino.

Blastocito Inicial: Se ha formado una cavidad llena de líquido llamada blastocele y toma la apariencia de un anillo ocupa el 70 a 80 % del espacio perivitelino, en esta etapa de desarrollo es posible observar una diferencia entre el trofoectodermo y la masa celular interna.

Blastocito: Tiene una pronunciada diferenciación en la capa externa del trofoblasto y es más oscura la masa celular interna y más compacta, el blastocele es muy prominente y el embrión ocupa la mayoría del espacio perivitelino.

Blastocito Expandido: El diámetro del embrión aumenta drásticamente y sufre un adelgazamiento de la zona pelúcida, los embriones recuperados en la fase de blastocito expandido se encuentran con frecuencia colapsados y se caracteriza por una pérdida parcial del blastocele.

Blastocito Eclosionado: Los embriones recuperados en esta etapa de desarrollo pueden estar en proceso de eclosión y pueden haber perdido la zona pelúcida, los blastocitos eclosionados pueden ser esféricos y con el blastocele bien definido o colapsado.



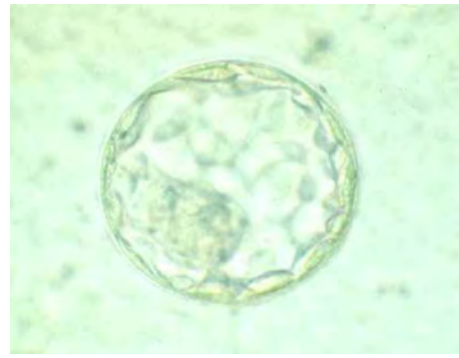
a



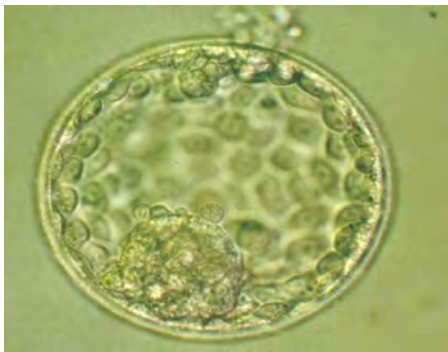
b



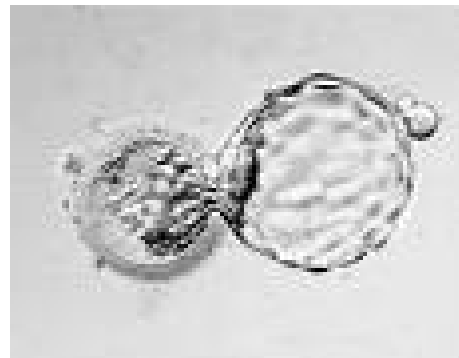
c



d



e



f

Figura 2: Embriones en diferentes estadios de desarrollo a) Morula, b) Morula compacta, c) Blastocito inicial, d) Blastocito, e) Blastocito expandido, f) Blastocito eclusionado.

4.6 Transferencia de Embriones

La transferencia de embriones se hizo con embriones frescos colectados ese mismo día (día 6.5 postservicio), (Schiewe, 1984). Las ovejas receptoras se tranquilizaron con xilacina por vía intramuscular al 2 % (10mg/50kg de peso vivo) y ketamina (2mg por kg de peso vivo) por vía endovenosa como anestésico. Se hicieron dos incisiones opuestas en la pared abdominal a 4 cm de la línea media y 3 cm anteriores a la glándula mamaria, por donde se insertó el trocar con cánula y el laparoscopio, se insufló aire en la cavidad por medio de una aguja de Verres, para permitir la localización del útero y los ovarios. Se localizó el ovario con el cuerpo lúteo más desarrollado, por la segunda cánula se introdujeron las pinzas de Babcock con las que se retrajo y exteriorizó el cuerno ipsilateral a dicho cuerpo lúteo.

En el cuerno uterino seleccionado se hizo una punción con un catéter intravenoso (18 G x 1 ¼) y se transfirió el embrión por medio de una jeringa insulínica conectada con una punta para pipeta. Cada receptora recibió un embrión. Finalmente el cuerno se regresó a la cavidad abdominal y se suturaron las incisiones.

Solamente se utilizaron como receptoras aquellas hembras que presentaron estro entre 12 h antes y 12 h después que su donadora. Se transfirió un solo embrión por receptora (Cuadro 3) asegurando que embriones provenientes de donadoras tratadas con rbST se transfirieran tanto a receptoras tratadas con rbST como a receptoras testigo y embriones provenientes de grupo testigo se transfirieran a receptoras testigo y receptoras tratadas con rbST. Adicionalmente se balanceó el estadio del desarrollo y la calidad embrionaria entre los grupos y se utilizó un diseño factorial 2 x 2 (Cuadro 2).

El diagnóstico de gestación se realizó el día 35 posttransferencia embrionaria por ultrasonografía en tiempo real vía transrectal utilizando un ultrasonido Aloka 500 con una sonda transrectal de 5Mhz, tomando en cuenta solo el parámetro de Vacía o Gestante.

4.7 Análisis Estadístico

El porcentaje de ovocitos fertilizados y embriones se comparó mediante una prueba de ji-cuadrada entre grupos. Las diferencias en el porcentaje de concepción de los embriones transferibles se determinaron mediante un análisis de varianza.

5.- RESULTADOS

En el primer estudio, el tratamiento con rbST incrementó significativamente ($P<0.05$) el porcentaje de ovocitos fertilizados y la proporción de embriones transferibles, en comparación con el grupo testigo. Así mismo, aumentó el número de estructuras totales ($P<0.05$). (Cuadro 2). Así el tratamiento con rbST también aumentó el porcentaje de mórulas en 9.31 % ($P< 0.05$) y el porcentaje de blastocitos en 27.48%. (Cuadro 3). El cuadro 2 muestra la producción de embriones por oveja. (Cuadro 2)

En el segundo estudio el 100 % de los ovocitos de las ovejas tratadas con rbST fueron fertilizados y se desarrollaron hasta embriones para ser trasferidos. Mientras que en el grupo testigo el porcentaje (76.49) fue menor ($P<0.05$.. Por otro lado no se encontró diferencia en el porcentaje de morulas y blastocitos entre grupos ($P>0.05$). (Cuadro 3). El cuadro 2 muestra la producción de embriones por oveja.

Cuadro 2: Producción de embriones por oveja.

GRUPO	OVEJAS	ESTRUCTURAS COLECTADAS	OVOCITOS FERTILIZADOS	EMBRIONES TRASFERIBLES
rbST 1	7	11.1 (78/7)	9.85 (69/7)	9.0 (63/7)
Testigo 1	8	5.6 (45/8)	4.0 (32/8)	2.5 (20/8)
rbST 2	6	6.16 (37/6)	6.16 (37/6)	6.16 (37/6)
Testigo 2	6	7.83 (47/6)	5.66 (34/6)	5.0 (30/6)

Cuadro 3. Porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones transferibles, mórulas y blastocitos de ovejas tratadas o no con rbST al momento del servicio.

Grupo	(n)	% OVOCITOS FERTILIZADOS	% EMBRIONES TRANSFERIBLES	% MORULAS	% BLASTOCITOS
rbST 1	78	88.46 ^a	80.76 ^a	39.74 ^a	44.87 ^a
Testigo 1	46	69.56 ^b	43.47 ^b	30.43 ^b	17.39 ^b
rbST 2	37	100.00 ^a	100.00 ^a	64.86 ^a	35.13 ^a
Testigo 2	47	76.49 ^b	63.82 ^b	38.29 ^a	25.53 ^a

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significancia (P<0.05)

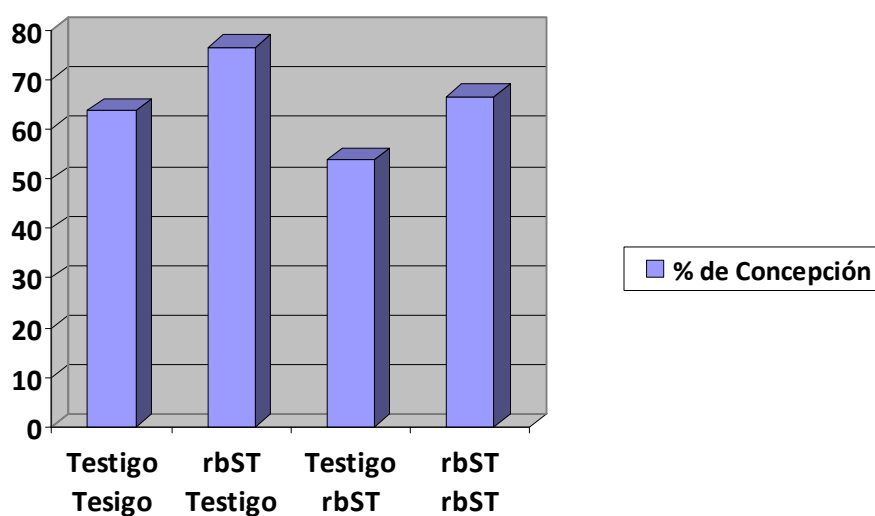
En el cuadro 4 y figura 3 se observa que el porcentaje de concepción fue del 66.10 % del total de las receptoras. Las receptoras tratadas con rbST tuvieron un 61.29 % de concepción mientras que las testigo un 71.42 % (P >0.05). Por otro lado, los embriones trasferidos provenientes de una donadora tratada alcanzaron un 71.4 % de concepción y los embriones provenientes de una donadora testigo un 58.3%. El tratamiento con rbST, en las receptoras no incrementó los porcentajes de concepción y los embriones provenientes de donadoras tratadas con rbST tampoco tuvieron mayores porcentajes de concepción (P>0.05). Y tampoco hubo interacción entre tratamiento o no en las receptoras y donadoras. (Cuadro 4; Figura 3)

Cuadro 4. Porcentajes de concepción en receptoras tratadas o no con rbST, que recibieron embriones provenientes de donadoras tratadas o no con rbST.

	RECEPTORA	RECEPTORA	TOTAL
	TESTIGO (%)	rbST (%)	(%)
D			
O			
N			
A			
D			
O			
R			
A			
rbST	76.4 (13/17)	66.6 (12/18)	71.42 (25/35)
Testigo	63.6 (7/11)	53.8 (7/13)	58.3 (14/24)
Total	71.42 (20/28)	61.29 (19/31)	66.10 (39/59)

No existieron diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$).

Figura 3: Porcentaje de concepción de los embriones transferidos.



6.- DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que la aplicación de rbST al momento del servicio en ovejas superovuladas incrementó el porcentaje de ovocitos fertilizados, el desarrollo embrionario y la calidad de embriones en ovejas superovuladas. Sin embargo, el tratamiento con rbST no mejoró el porcentaje de concepción de los embriones transferidos a ovejas tratadas o no con rbST al momento del servicio.

La administración de rbST estimula la maduración de los ovocitos y aumenta el número de ovocitos fertilizados que llegan a blastocitos (Tatjana *et al.*, 2007). La aplicación de rbST al momento del servicio puede mantener niveles altos de IGF's durante la maduración del ovocito y la fertilización, esto pudo tener un efecto favorable en la fertilización de los ovocitos y así aumentar los porcentajes de ovocitos fertilizados en el grupo tratado.

En bovinos se ha observado que la adición de rbST al medio de cultivo *in vitro*, favorece la maduración del ovocito e incrementa la proporción de embriones que llegan a dividirse. La BST puede actuar a través de las células del cumulus o directamente en el ovocito desnudo, ya que se ha identificado el receptor de rbST en ambas células (Izadyar *et al.*, 1998). Así también se encontraron diferencias en la proporción de embriones transferibles lo que concuerda con lo encontrado en otros estudios (Cognié *et al.*, 1992; Folch *et al.*, 2001; Moreira 2002b., Navarrete-Sierra *et al.*, 2008).

En estudios *in vivo* se ha observado que la administración de rbST al momento de la inseminación en vacas lecheras (Moreira *et al.*, 2002b) y en ovejas (Rosas *et al.*, 1995; Navarrete-Sierra *et al.*, 2008) incrementa la proporción de ovocitos fertilizados. En este estudio el tratamiento con rbST generó mayor proporción de ovocitos fertilizados.

Folch *et al.*, (2001) aplicaron hormona de crecimiento porcina a ovejas superovuladas con FSH y encontraron un mayor porcentaje de ovocitos fertilizados (78.0% vs 62.3%), lo que concuerda con los resultados obtenidos con una mayor cantidad de ovocitos fertilizados. La administración de rbST al momento del servicio aumenta el

porcentaje de ovocitos fertilizados en bovinos (Moreira *et al.*, 2002, Morales, 2000). En condiciones *in vitro*, la adición de rbST o IGF-1 al medio de cultivo, incrementa la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocito (Moreira *et al.*, 2002b). Diferentes estudios muestran que la aplicación de rbST mejora el desarrollo, diferenciación y metabolismo de embriones antes de ser implantados, y blastocitos cultivados con rbST incrementaron el número de células tanto en la masa celular interna como en el trofoectodermo (Izadyar *et al.*, 2000).

La rbST logró aumentar la tasa de desarrollo de los embriones como lo demuestra el hecho del mayor número de blastocitos en estado avanzado en el grupo tratado. Es ampliamente conocido que las células del oviducto por sí solas tienen un efecto benéfico sobre el desarrollo embrionario ya que los embriones cultivados en medios simples presentan un desarrollo retrasado en comparación con los cultivados en medios suplementados con cultivos de células oviductuales (Kincy *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1994). Por otro lado se ha encontrado en vacas ciclando, en el tiempo en que el embrión transita por el oviducto, éste secreta niveles elevados de factores de crecimiento, sobre todo de IGF-1 (Kerbler *et al.*, 1997; Kincy *et al.*, 1994). Los embriones presentan receptores y ligandos para factores de crecimiento IGF-1, IGF-II, TGF- α , bFGF, TGF-B e insulina (Heyner *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1994; Forcier *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1994), por lo que es probable que exista un circuito paracrino entre el epitelio del oviducto y el embrión ovino.

Se ha observado que la administración de rbST puede modificar el ambiente uterino aumentando las concentraciones de IGF-1 que regulan la proliferación celular, protegiendo al embrión de entrar en apoptosis, lo cual favorecería las condiciones del desarrollo embrionario (Byrne *et al.*, 2002).

El efecto de la rbST en el desarrollo embrionario puede ser ejercido en forma directa o a través del IGF-1, la administración subcutánea de rbST ocasiona un incremento en las concentraciones sanguíneas de IGF-1 que aumentan significativamente de 24 a 48 horas después de la inyección (Gong *et al.*, 1993; Rieger *et al.*, 1998; Winger *et al.*, 1997;

Whates *et al.*, 1998^a). Mendoza (2000) observó un incremento en los niveles séricos de IGF-1 desde el día 2 después del tratamiento.

Las altas concentraciones sanguíneas de IGF-1 podrían promover un incremento de su concentración en el oviducto y útero, ya que este factor está presente en dichos órganos (Makarevich y Sirotkin, 1997), es posible que el aumento de las concentraciones de IGF-I en las secreciones oviductales y uterinas estimule a los embriones que intenten desarrollarse en un ambiente desfavorable. Así también el endometrio presenta receptores para rbST e IGF-I, por lo cual en los animales tratados con rbST se podría estimular la actividad secretora de las glándulas endometriales mejorando el ambiente uterino para el desarrollo del embrión (Heap *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 2000).

Existen receptores para rbST e IGF-1 en el endometrio (Lucy *et al.*, 1998 Pershing *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 1999; Izadyar *et al.*, 2000; Augustin., *et al.*, 2003) y se ha localizado RNAm para receptores a IGF-1 en las glándulas endometriales (Stevenson *et al.*, 1994; Wathes *et al.*, 1998) y su expresión es mayor durante la fase lútea media.

Morales en el 1998 realizó un tratamiento de superovulación y aplicó rbST al inicio del estro en vacas repetidoras encontrando una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de embriones transferibles (84.3% y 54.5% en vacas tratadas con rbST y no tratadas, respectivamente) sin alterar el número total de embriones producidos, ni las concentraciones de progesterona. Estos resultados indican que existe un mecanismo por el cual la rbST favorece el desarrollo de los embriones el cual puede ser directo (Izadyar *et al.*, 1997) o mediante su principal mediador el IGF-1 (Rieger *et al.*, 1998). En este estudio se encontró que en el grupo tratado hubo un mayor número de ovocitos fertilizados y embriones de mayor calidad, lo cual indica que hay un efecto directo de la rbST en el desarrollo embrionario.

Además se conoce que la repetición de la inyección cada 14 días mantiene los niveles de IGF-1 permanentemente altos (Bauman, 1999; Jousan *et al.*, 2007). Sin embargo hay procesos fisiológicos en los cuales la rbST y el IGF-1 pueden ejercer su efecto y corresponden a las etapas en las que ocurre la mayor incidencia de las pérdidas

embrionarias (Roberts *et al.*, 1990; Zavy, 1994). El primer evento corresponde a la fertilización, el segundo al desarrollo embrionario durante los primeros 7 días, y la tercera, se ubica durante el reconocimiento materno de la concepción (Ayalon, 1978; Thatcher *et al.*, 1994).

Carrillo en el 2006 realizaron un trabajo en ovejas aplicando rbST 5 días antes del retiro de la esponja con FGA, las cuales mostraron un incremento de la proporción de partos múltiples obteniendo una tasa de corderos nacidos por parto de 1.64 para ovejas tratadas y 1.25 para no tratadas. Este incremento en la prolificidad pudo deberse a los efectos de la rbST sobre la fertilización y desarrollo embrionario mas no sobre la tasa de ovulación. Y en diversos estudios (Joyce *et al.*, 1998, 2000) la BST no ha aumentado la tasa de ovulación en la oveja. Montero (2007) aplicó rbST 5 días antes del retiro de la esponja en el cual encontró que el porcentaje de ovocitos fertilizados fue mayor en el grupo rbST (85.7%) que el grupo no tratado (62.0%) y una proporción mayor de los embriones alcanzó la etapa de blastocito en las ovejas tratados con rbST (77.6%) en comparación con el grupo no tratado (48.5%) lo que concuerda con el estudio realizado.

Se conoce que el IGF-I actúa como un factor de supervivencia evitando la apoptosis durante el desarrollo embrionario temprano. Los IGF's unen proteínas como los IGFbps y transportadores de glucosa, incluyendo las isoformas Glut 4 y Glut 8, con la adición de IGF-I al cultivo celular lograron aumentar el porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones que llegaron a etapa de blastocito, numero de células del trofoectodermo y de la masa celular interna del embrión (Byrne et al 2002., Augustin et al., 2003).

El efecto de la rbST en el estudio fue similar al que obtuvieron Byrne *et al.*, (2002) y Augustin *et al.* (2003), pero el efecto sobre el porcentaje de concepción de los embriones transferidos no se encontró diferencia entre grupos de borregas receptoras tratadas o no con rbST.

Los embriones producidos *in vitro* con adición de IGF-1 producen mayores porcentajes de concepción después de su transferencia (Block y Hansen, 2007). En este estudio no encontramos diferencia estadística al tratamiento de las receptoras.

Se ha observado que la rbST disminuye la sensibilidad del mecanismo de secreción de la $Pgf2\alpha$, a través de una disminución de la actividad de la enzima cicloxigenasa en las células del endometrio (Badinga *et al.*, 2002) e incrementa la síntesis de interferón γ , lo cual puede favorecer al rescate del cuerpo lúteo aumentando el porcentaje de concepción (Kerbler *et al.*, 1997; Mann y Lamming, 1999; Spencer *et al.*, 2004). Se conoce que las células grandes del cuerpo lúteo tienen receptores para rbST, en estudios *in vitro* que se le adiciona IGF-1 a cultivos de células del cuerpo lúteo incrementa la producción de progesterona (Gong *et al.*, 1994). Lucy (1994) encontró que en vacas tratadas con rbST tienen mayores concentraciones de progesterona. Sin embargo, Morales (2000) y Mendoza *et al.* (2000) no encontraron diferencia en la concentración de progesterona en vacas tratadas o no con rbST. Por lo que sugerimos que el mecanismo por el cual se mejora el desarrollo embrionario es a través de un efecto directo de la rbST y los IGF's.

Fernandes Marques (2009) transfirió embriones provenientes de vacas no tratadas con rbST a receptoras tratadas con rbST con un total de 144 embriones en la cual encontró un 32.5% de gestaciones para el grupo no tratado y un 65.7 % de gestaciones en receptoras tratadas con rbST encontrando diferencia estadística significativa, mas no hubo diferencia en las concentraciones de progesterona. Lo que indica que hay un efecto el cual probablemente no pudimos detectarlo debido al número de embriones en el estudio.

En este estudio se observó un aumento en la producción de embriones y su calidad en el grupo tratado y concuerda con los resultados encontrados anteriormente por nuestro grupo de trabajo. Sin embargo en los embriones transferidos no se encontró diferencia estadística.

7.- CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en estudio permiten concluir que la administración de 125 mg de rbST vía subcutánea, al momento del servicio en ovejas superovuladas incrementa el porcentaje de ovocitos fertilizados, la calidad de embriones colectados y la proporción de embriones que alcanzaron la etapa de blastocito, mas no así los porcentajes de gestaciones de los embriones transferidos. El efecto positivo de la rbST sobre la fertilidad al aplicarse entes o al momento del servicio es debido a mejoras en la maduración, fertilización o desarrollo embrionario. Sin embargo no parece ser mediado a través de mejorar el desarrollo del CL o ambiente uterino.

APENDICE I Grado de desarrollo y calidad de los embriones transferidos por receptora.

Identificación	Grado de desarrollo	Calidad	Identificación	Grado de desarrollo	Calidad
672	1	2	P102	5	2
1653	2	2	1232	2	2
548	5	1	P99	5	1
175	1	2	417	2	1
D08105	1	2	195	1	2
445	1	2	P101	1	2
969	6	2	D081011	1	2
400	1	1	564	1	2
P25	1	2	D081014	1	2
432	4	1	322	1	2
P95	1	2	1418	1	2
D08106	1	1	1615	1	2
P96	1	2	D081010	1	2
858	1	2	P98	1	2
290	5	1	1547	1	2
21	5	1	305	1	2
P73	5	1	873	1	2
Do8107	5	1	814	1	2
429	5	1	703	1	2
291	5	1	1295	4	1
1970	5	1	387	4	1
P92	3	1	D08104	4	1
P100	1	2	1279	4	1
P78	1	1	1948	4	1
D08108	1	2	805	4	1
D08109	1	1	828	4	1
251	1	2	1801	4	1
695	1	2	1314	1	1
479	1	2	D0787	1	1
424	4	1			

8.- LITERATURA CITADA

1. Albiñ A, Gustaffson H, Rodriguez-Martinez H, Larsson K. Development of day 7 bovine-demi-embryos transferred into virgin and repeat-breeder heifers. *Anim Reprod Sci* 1989; 21: 161-176.
2. Arechiga-Flores CF, Bañuelos-Valenzuela R, Rincon-Delgado M, Meza HCA. Attainment of puberty in winter-born hair-ewe lambs under natural photoperiod (22° NL): Preliminary results. *Wool Tech Sheep Breed* 2004; 52: 35-42.
3. Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and antiapoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 2003; 126: 91-99.
4. Ayalon N. Embryonic mortality in cattle. *Zuchthyng* 1978; 54: 483-493.
5. Badinga L, Collier RJ, Thatcher WW, Wilcox CJ. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J. Dairy Sci.* 1985; 68:78-85.
6. Badinga L, Guzeloglu A, Thatcher WW. Bovine Somatotropin Attenuates Phorbol Ester-Induced Prostaglandin F_{2α} Production in Bovine Endometrial Cells. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 537-543.
7. Bauman DE. Bovine Somatotropin: Review of an Emerging animal technology. *J. Dairy Sci* 1993; 75: 3432-3451.
8. Bauman DE, Bovine somatotropin and lactation: From basic science to commercial application. *Domestic Animal Endocrinology* 1999; 17:101-116.

9. Biggers BG, Geisert RD, Watterman RP, Buchanan DS. Effect of stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim Sci* 1987; 64:1512-1518.
10. Borwick S C., Rhind AC SM., McMillen SR, Racey P.A. Effect of under nutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *J Reprod ferti Dev* 1997; 9: 711–15.
11. Bowen RA, Eldsen RP, Seidel GE. Infection of early bovine embryos with bovine herpes virus-1. *J. Vet. Res* 1985, 46: 1095-1097.
12. Buratini J, Price CA, Visitin JA, Bo GA. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (Bos indicus) heifers. *Theriogenology* 2000; 54: 421-431.
13. Butler RW, Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci* 1998; 81: 2533-2539.
14. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ, Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod and Development* 2002; 62: 489-495.
15. Carrol DJ, Barton BA, Anderson GW, Smith RD, Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci* 1988; 71: 3470-3481.
16. Carrillo F, Hernández Cerón, Orozco V, Hernandez JÁ, Gutierrez C.G. A single dose of somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization increases prolificacy in sheep. *J. Anim Reprod Sci* 2006; 102: 31-37.

17. Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insuline-like growth factor I (IGF-I) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-I receptor. *Endocrinology* 2000; 141: 4784-4792.
18. Cognié Y, Poullin N, Guérin Y, Martinat N. Administration of exogenous growth hormone in early follicular phase enhances embryo production in sheep. *12 Inter. Cong on Anim Reprod* 1992; 785-787
19. Corbel MJ. Fungal infections agents. In: Laing JA, Brinley Morgan WJ, Wagner WC editors. *Fertility and infertility in veterinary practice*. London: Baelliere Tindall, 1988: 228-233.
20. Costine BA, Sayre BL, Inskeep EK. Embryo toxicity of regressing corpora luteum in ewes. *Reproduction* 2001; 122: 883-887.
21. Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod Fertil* 1988;82:769-775.
22. De Hertogh R, Vanderheyden I, Amfer S, Robin D, Dufrasne E, Delcourt J. Estimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocyst development *in vitro*. *Diabetes* 1991; 40: 641-547.
23. De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thathcer WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci* 1993; 76: 1002-1013.
24. Diskin MG, Sreenan JM, Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil* 1980; 59: 463-468.
25. Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 39-44.

26. Echternkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF, Hammond JM. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biology of Reproduction*. 1990; 43: 8-14.
27. Edey TN, Prenatal mortality in sheep: A review. *Anim Breed abstr* 1969; 37:173-190.
28. Einspanier R, Miyamoto A, Schams D, Müller M, Brem G. Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the estrous cycle and pregnancy of cows. *J. Reprod and Fertil*. 1990; 90: 439-445.
29. Espinosa AF. Administración posmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. (Tesis de Licenciatura). México D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.
30. Etherton TD, Bauman DE. Biology of Somatotropin in Growth and Lactation of domestic animals. *Physiol Rev*. 1998; 78: 745–761.
31. Folch J, Ramón JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 2001; 55: 1777-1785.
32. Forcier KA, Williams JE, and Butler JE. Growth factor expression in day 13-14 ovine embryos. *Biology of Reproduction* 1994, vol. 50/ suppl 1. 492.
33. Gandolfi F, Pocar P, Luciano AM, Rieger D. Effects of EGF and IGF- 1 during *in vitro* maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. *Theriogenology* 1996, 45: 277.

34. Gong JG, Bramley TA, Webb R.. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones Biol Reprod 1991; 97: 247-254.
35. Gong JG, Bramley TA, Webb R. Effect of recombinant somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. Biol Reprod 1993; 48:1141-1149.
36. Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1994; 143: 157-164
37. Grodsky MG. Chemistry and functions of the hormones: II Pituitary and hypothalamus. In Review of Physiological Chemistry. Edited by: Harper, HA, Rodwell, VW., Mayes, PA.,. Large Medical Publications. Los Altos, California 1979; 556-568
38. Hanrahan JP. Aspects of reproductive performance in small ruminants- opportunities and challenges. *Reproduction* 2003; 61 Suppl 1: 15-26.
39. Heap D, Collier RJ, Boyd CK, Lucy MC. Expression of alternate growth hormone receptor messenger RNA in ovary and uterus in cattle. *Dom Anim Endocrinol* 1996; 12:421-430.
40. Hernández- Cerón J, Morales-Roura JS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Méx* 2001; 32: 279-287.
41. Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ, and Schultz GA. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology*. 1993; 39: 151-161.

42. Hill DJ. Growth factors and their cellular actions. J. Reprod Fertil 1989; 85: 723-734.
43. Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. J Reprod Fertil 1991;43:91-99.
44. Inskeep EK, Preovulatory, postovulatory and posmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. J. Anim Sci 2004; 82 (E. Suppl) E24-E39
45. Ishwar AK, Memon MA. Embryo transfer in sheep and Goats. A review. Small Ruminant research. 1996;19:35-43
46. Izadyar F, Colembrander B, Bevers MM. Growth hormone enhances fertilizability of *in vitro* matured bovine oocytes. Theriogenology 1997; 47: 191.
47. Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes in due to improved cytoplasmic maturation. Mol Reprod and Dev 1998; 49: 4444-453.
48. Izadyar F, Van Tol HTA, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. Mol Reprod and Dev 2000; 57:247-255.
49. Joyce IM, Khalid M, Haresing W. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulatory rate, Theriogenology 1998; 50: 873-884.

50. Joyce IM, Khalid M, Haresing W. The effect of recombinant GH treatment on ovarian follicle growth and atresia in sheep. *Theriogenology* 2000; 54: 327-338.
51. Jousan F. D., de Castro e Paula L. A., Block J., Hansen P. J. Fertility of lactating dairy cows administrated recombinant bovine somatotropin during heat stress. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 341-351.
52. Kaneene JB, Coe PH, Gibson CD, Yamini B, Martinez RO, Morrow DA. The role of haemophilus somnus in bovine early death. II. Persistence of the organism in the uterus following intrauterine exposure. *Theriogenology.* 1986;26: 785-801.
53. Kaye PL. Preimplantation growth factor physiology. 1997; 2: 121-127.
54. Kerbler TL, Buhr MM., Jordan Lt, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 703-714.
55. Kincy VL, Williams JE, and Butler JE. Expression of the insulin-like growth factor II (IGF II) gene by ovine oviductal cells. *Biol Reprod* 1994; Vol suup 1 . abst 68
56. Kleemann DO; Walker K. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology* 2005; 63: 2416-2433.
57. Lindner GM, Raymond WW. Bovine Embryo Morphology and Evaluation. *Theriogenology* 1983; Vol. 20; 4:407-416.

58. Long J. A., Dickey J. F., and Bodine A. B. Bovine oviduct apithelial cell monolayers produce proteins which support embryonic development beyond the 8-cell in vitro block. *Biol Reprod* vol 1994, 50/ suppl 1 abst. 65.
59. Lucy MC, Curran TL, Collier RJ, Cole WJ. Extended function of the corpus luteum and increased follicle turnover on heifers treated with bovine somatotropin. *Biol Reprod* 1993; 61 Suppl 1
60. Lucy MC, Byatt JC, Curran TL, Collier RJ. Placental lactogen and sumatotropin: binding to the corpus luteum and effects on the growth and function of the ovary in heifers. *Biol Reprod* 1994; 50: 1136-1144.
61. Lucy MC, Boyd CK, Koenigsfeld AT, Okamura CS. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *J. Dairy Sci* 1998; 81: 1889-1895
62. Makarevich AV, Sirotkin AV. The involvement of the GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. *Mol Reprod* 1997; 48:197-207.
63. Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 1997; 48: 605-616.
64. McCutcheon SN, Bauman DE. Effect of pattern of administration of bovine growth hormone n lactational performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1986; 69: 38.
65. Mendoza MG, Efecto de una dosis de 500 mg de somatotropina bovina recombinante (rbST) en la fertilidad de vacas Holstein al primer servicio y repetidoras. (Tesis de Maestria). México D.F. México UNAM, 2000.

66. Montero A. Efecto de la administracion de bST cinco días antes del retiro de la esponja de FGA en el desarrollo embrionario temprano de ovejas superovuladas. (Tesis de Maestría). México D.F. UNAM, 2007.
67. Morales RS. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovarica y desarrollo embrionario en hembras Holstein. (Tesis Doctorado). D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2000.
68. Morales RS, Ávila Gj, Hernández CJ, Zarco L. Efecto de la administración de rbST el dia del estro sobre los niveles de progesterona sérica y el número de óvulos y embriones transferibles en vacas Holstein superovuladas. Memorias del XXII congreso nacional de Buiatria, 1998, julio 20-25 Acapulco (Gro). México (DF) Asociación mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. 1998; 356-358.
69. Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández J, Rodríguez G. Effect of shorth-term treatment with bovine somatotropin at estrous on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 2001; 55: 1831-1841.
70. Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of Bovine somatotropin in dairy cows receiving timed artificial insemination. *J. Dairy Sci* 2000; 83: 1237-1247.
71. Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen OJ, Bandinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 2002^a; 57: 895-907.
72. Moreira F, Bandinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulates cows and improves post-transfer rates when given to lactating recipient cows. *Therigenology* 2002^b; 57: 1371-1387.

73. Nancarrow CD. Embryonic mortality in the ewe and doe. In: Zavy MT, Geisert RD editors. Embryonic mortality in domestic species. Boca Raton (FL): CRC Press, 1994:7997.
74. Navarrete-Sierra LF, Cruz-Tamayo AA, Gonzalez Parra EI, Piña-Aguilar RE, Sangines-Garcia JR, Toledo-Lopez V, Ramon-Ugalde JP. Efecto de la aplicación de la hormona de crecimiento recombinante sobre la respuesta superovulatoria y la viabilidad embrionaria en ovejas de pelo. Revista Científica, FCV-LUZ/Vol XVIII N° 2, 175-179, 2008.
75. Okada A, Kamada S, Jeon CW, Miyamoto A, Fukuy Y. Incidence of Abnormal Corpus Luteum in Superovulated Ewes. J Reprod Dev 2000; 46: 397-402
76. Plym K, Pehrson B, Anderson L. The relationship between fertility of dairy cows and clinical and biochemical measurements with special reference to plasma glucose and milk acetone. J. Vet Med 1991; 38: 608-616.
77. Pantaleòn M, Kaye PL. Glucose transporter in preimplantation development. J. Reprod Fétil 1998; 3: 77-81.
78. Perks CM, Peters AR, Whates DC. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. J. Reprod and Fertil. 1999; 116: 157-165.
79. Pershig RA, Lucy MC, Thatcher WW, Badinga L. Effects of BST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF system in lactating dairy cows. J. Dairy Sci 2002; 85: 3260-3267.
80. Putney DJ, Malayer JR, Gross TS, Thatcher WW, Hansen PJ, Drost M. Heat estress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptus and uterine endometrium. Biol Reprod 1988;39:717-728.

81. Ramon-Ugalde JP, Folch J, Cocero MJ, Piña Aguilar RE, Alabart JL. Embryo recovery from the oviduct in superovulated ewes: A method to improve MOET systems. *J. Anim Sci.* 2008; 53: 145-151
82. Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J. Reprod Fertil* 1998; 112: 123-130.
83. Roberts RM, Schaule-Francis T, Francis H, Keisler D. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology* 1990; 33: 175-183
84. Robinson RS, Mann GE, Gadd TS, Lambling GE, Wathes JC. The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Endocrinology* 2000; 60:703-712.
85. Rosas PJ, Zarco L, Valencia MJ. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre la función lútea y El desarrollo embrionario temprano en la oveja superovulada. *Vet Méx.* 1995; 26 (Suppl 2): 339
86. Rosas PJ Efecto de un tratamiento corto de rbST (Lactotropina) sobre la función ovárica y el desarrollo embrionario temprano en ovejas superovuladas (Tesis de Maestría). D.F. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.
87. Ruhnke RL, Palmer NC, Doig PA, Miller RB. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma divresum*. *Theriogenology* 1989;21:295-301.

88. Santos JEP, Juchem SO, Cerri RLA, Galvao KN, Chebel RC, Thatcher WW, Dei CS, Bilby CR. Effect of bST and Reproductive Management on Reproductive Performance of Holstein Dairy Cows. *J. Dairy Sci* 2004; 87: 868-881.
89. Semambo DK, Ayliffe TR, Boyd JS, Tatlor DJ. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *actinomyces pyogenes*. *Vet Rec.* 1991; 129:12-16.
90. Schiewe MC, Bush M, Stuart LS, Wildt DE. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: A preliminary study. *Theriogenology* 1984. vol 22; 6: 675-682.
91. Simmen RCM, Ko Y, Simmen FA. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 1993; 39: 163-175.
92. Senger PL, Editor. Pathways to the pregnancy and parturition. 2a Ed. Washington: Current Conception, Inc., 2003.
93. Shi CZ, Dhir RN, Kesavan P, Zhang SL, Garside WT, Smith R, Matchinsky, Heyner S. Mouse embryonic stem cells express receptors of the insulin family growth factor. *Biol Reprod* 1994;vol 50 suppl 1 abs 71.
94. Skirrow SZ, Durant B H. Induced trichomonas foetus infection in beef heifers. *J Am Vet. Med. Assoc.* 1990;196: 885-889.
95. Spicer LJ, Echterkamp S E. The ovarian insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom. Anim. Endocrinology.* 1995; 12:223-245.
96. Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in dairy cattle: A major limitation to the achievement of high fertility. *Proceedings of the fertility in the high- producing dairy cows.* 2001; BSAS Occasional Publication: 93-104.

97. Stevenson KR, Gilmur RS, Wathes DC. Localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and – II messenger ribonucleic acid and type I IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 1994; 134: 1655-1644.
98. Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desmoyers G, Oldick B, Schmitt EP. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. 1994; 72 (suppl.3): 16-30.*
99. Thwaites CJ. Embryo mortality in the heat stressed ewe. I. The influence of breed. *J. Reprod Fertil* 1967; 14:5-14.
100. Van der Walt JG, Somatotropin Physiology: A review. *S. Afr J. Anim Sci*, 1994; 129: 299-309.
101. Holly JMP, Wass JAH. Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *J Endocrinology*. 1989; 122: 611-618
102. Watson A J, Watson PH, Acellaa-Panlilio MY, Warnes S, Walter K, Schultz GA, Armstrong DT, Seamark RF. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol. Reprod.* 1994; 50: 725-733.
103. Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA. Gene Expression regulatin blastocyst formation *J. Reprod Fertil* 1999; 54: 303-315.
104. Watson AJ, Natale DR, Barcroft. Molecular regulation of blastocyst formation. *J. Anim Reprod Sci.* 2004; 583-592.
105. Whates DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR. Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *Journal of Dairy Science* 1998a; 81: 1778-1789.

106. Wilmut, Sales DI, Ashworth C J. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J. Reprod and Fertil.* 1986; 76: 851-864.
107. Winger QA, de los Rios P, Han VKM, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: Possible regulators of “embryothopic” insuline-like growth factor circuits. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 1415-1423.
108. Zavy MT, Embryonic mortality in cattle. In: Zavy MT, Geisert RD, editors. *Embryonic mortality in domestic species.* Boca Raton: CRC Press, 1994: 99-140.

APENDICE I

Grado de desarrollo y calidad de los embriones transferidos por receptora.

Identificación	Grado de desarrollo	Calidad	Identificación	Grado de desarrollo	Calidad
672	1	2	P102	5	2
1653	2	2	1232	2	2
548	5	1	P99	5	1
175	1	2	417	2	1
D08105	1	2	195	1	2
445	1	2	P101	1	2
969	6	2	D081011	1	2
400	1	1	564	1	2
P25	1	2	D081014	1	2
432	4	1	322	1	2
P95	1	2	1418	1	2
D08106	1	1	1615	1	2
P96	1	2	D081010	1	2
858	1	2	P98	1	2
290	5	1	1547	1	2
21	5	1	305	1	2
P73	5	1	873	1	2
Do8107	5	1	814	1	2
429	5	1	703	1	2
291	5	1	1295	4	1
1970	5	1	387	4	1
P92	3	1	D08104	4	1
P100	1	2	1279	4	1
P78	1	1	1948	4	1
D08108	1	2	805	4	1
D08109	1	1	828	4	1
251	1	2	1801	4	1
695	1	2	1314	1	1
479	1	2	D0787	1	1
424	4	1			

ANEXOS

CIUDAD TRUJILLO,
Enero 9 de 1936.-

Generalísimo Dr.
Rafael Leonidas Trujillo M.
Honorable Presidente de la República
y Benefactor de la Patria.
CIUDAD.-

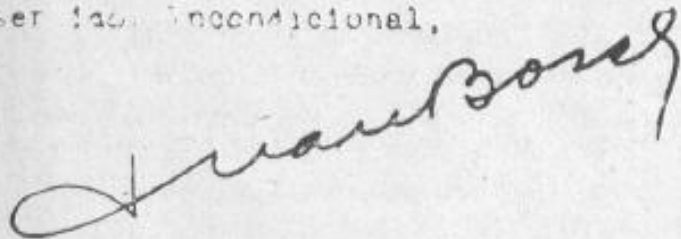
Honorable Jefe

Quiero testimoniarle a Ud. en estas líneas la profunda gratitud que le debo por la bondad con que me ha distinguido al designarme Jefe de la Sección del Censo en la Oficina de la Estadística Nacional.

Aprovecho esta circunstancia para enviarle mis calorosas felicitaciones con motivo de habersele dado su nombre procer a Santo Domingo de Guzmán, aunque sostengo el criterio de que más bien que Ud., ha sido la Ciudad la que ha recibido honra.-

Con la esperanza de seguir mereciendo su confianza, y con la de servir a cabalidad mis deberes para con Ud. y su gobierno, le saluda respetuosamente,

su ser ido incondicional,



Juan Bosch
Dr. Baez #13.

16776

Ciudad Trujillo,
Agosto 5, 1936.-

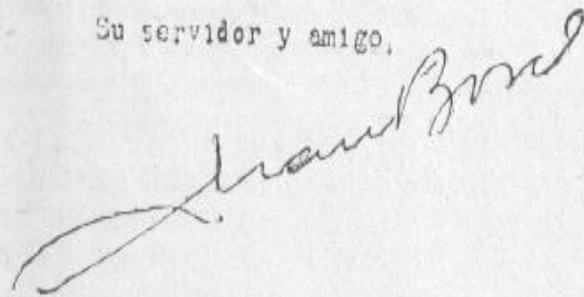
Hon. Generalísimo
Rafael L. Trujillo Molina,
Presidente de la República
y Benefactor de la Patria.

Honorable Sr. Presidente:-

Cumpliendo encargo suyo, el Sr. Secretario de Estado de la Presidencia me ha escrito en esta fecha para enviarme un cheque de Cien dollars (\$ 100.00), como generosa ayuda por la publicación de mi novela "La Malosa".

Sinceramente agradecido por su espléndido regalo y por la disposición benévola que mantiene para todo lo que sea esfuerzo nacional y obra encaminada hacia la afirmación de nuestra cultura, escribo a Ud. para darle la seguridad de mi gratitud y confirmarle mi devota admiración.

Su servidor y amigo,



Juan Bosch,
Dr. Eñez # 13,
Ciudad Trujillo...

7
Am
20 Jul 1937

Ciudad Trujillo,
17 de Julio, 1937.

Smo. Rafael I. Trujillo,
Hon. Presidente de la República
y Benefactor de la Patria,
CIUDAD.

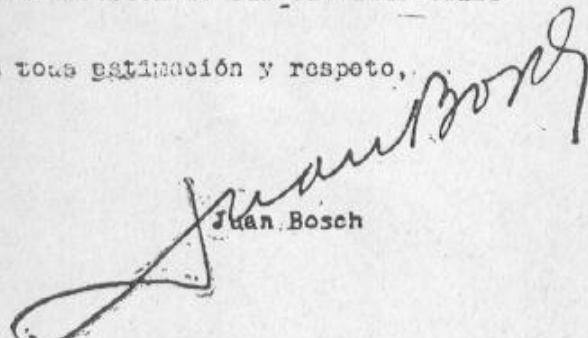
Honorable Jefe y amigo:-

Cuando Ud. anunció su reformas en el servicio exterior de la República, estuve tentado de escribirle con el propósito de que me tuviera presente si Ud. consideraba más útil para Ud. mi presencia en el exterior que mi permanencia en la Dirección General de Estadística. No lo hice por que sé que Ud. no necesita de recordatorios para situar a sus amigos allí donde su conocimiento de cada quien le indica.

Ahora, sin embargo, me tomo la libertad de pedirle considerar la conveniencia de enviarme al exterior a un sector en el que mis conocimientos y mi estimación personal hacia Ud. pudieran desplegarse en provecho de su gobierno y del país.

Yo desearía ardentemente, Honorable Presidente; que Ud. no tomara esta petición como señal de que me encuentro disgustado donde estoy, sino como expresión de mi deseo de servirle mejor. Tengo la seguridad de que el dinamismo que Ud. ha impreso al cuerpo Consular y Diplomático, como a todas las manifestaciones de la Administración Pública, sería como propicio al desarrollo de mi capacidad y a la provechosa difusión de sus elevadas cualidades de gobernante.

Le saluda con toda estimación y respeto,


Juan Bosch

San Juan, P. R., 16 976
Febrero 27, 1938.

señor Rafael L. Trujillo,
Presidente de la República,
Ciudad Trujillo,
REPUBLICA DOMINICANA.

Don señor Presidente:-

Sirve ya presente para formular ante Ud. mi renuncia como Jefe del Servicio de Información de la Dirección General de Estadística, cargo que Ud. pusiera a mi cuidado por nombramiento extendido el día 1.º de Noviembre de 1937. Esta renuncia es efectiva a partir del 28 del presente mes de Febrero, y espero que será gustosamente aceptada por Ud.

Créame, señor Presidente, que me es muy duro restar a mi país sus servicios, tanto más cuanto que yo sé bien cómo adolece la República Dominicana de gentes que trabajen con entusiasmo y conciencia; pero, a menos que yo aceptara pacientemente una desintegración de mis facultades, yo no podía seguir viviendo en mi tierra. Mi destino es ser escritor, y en ese campo nada podía ya darme el país; y no sería eso sólo causa bastante a hacerme dejar el lugar de mis afectos, si no que, además de no poder seguir siendo escritor, tenía forzosamente que ser político, y yo no estoy dispuesto a tolerar que la política desvíe mis propósitos e anegue mis convicciones y principios. A menos que desee una encarnación de una situación violenta para sí y los suyos, hay que ser político en la República Dominicana. Es inconcebible que uno quiera mantenerse alejado de esa especie de locura colectiva que embarga el alma de mi pueblo y le oscurece la razón: el negro, el blanco, el bruto, el inteligente, el feo, el buenmozo; todos se lanzan al logro de posiciones y de ventajas por el camino político. ¿Cómo es posible que no se comprenda que la política es un arte al alcance de todo el mundo? La marcha de la sociedad la rigen los políticos, ellos deben ser los, sí; así es en todas las partes y así ha sido siempre; nosotros involucramos los principios universales y exigimos que las mujeres, los niños y hasta las bestias actúen en política. Yo, que repulsió y repudio tal proceder, vivía permanentemente expuesto a ser carne de chivo, de ambiciones y de intrigas. Yo no concebía la política al servicio del estéril, si no al de un alto ideal de humanidad. Sapeado en mí crecerle a los años una situación amarga, y en interés de adaptarme a la realidad de mi país, yo hice esfuerzos con mi mayor buena fé y, nuevo Galileo, me cometí varias veces a las exigencias del momento. Pero esos comprometimientos no hacían ni me crear en mí un estado de ánimo peligroso para el porvenir de mi familia y, desde luego, para el mío. Destruía mi carrera y perdía a mis propios ojos el respeto que yo mismo me debía. Sabía, además, que mientras viviera en la República Dominicana no podía evitar eso, porque tratar de hacerlo era ser enlistado como enemigo, y yo sé por experiencia personal adónde conduce tal designación. De ahí que haya salido de mi país.

En un esfuerzo desesperado por evitar esta salida le escribí hace algunos meses pidiéndole que me enviara al exterior. Así podía aislarme del ambiente. Ud. prometió hacerlo, pero al parecer le olvidó. Quizá haya sido mejor.

Yo sé que he salido de mi tierra para no volver en muchos años, porque considero que la actual situación dominicana será de término largo y porque sé que fuera de un cargo público yo no tendría ahora medios de vida en el país, y no podría estar en un cargo público absteniéndome de hacer política.

Tal vez Ud. reaccione contra estas declaraciones considerándome traidor. Yo le contestaría en ese caso que la primera lealtad se la debe uno a su destino, a sus convicciones y a su tranquilidad, y mi destino, mis convicciones y mi tranquilidad no son planes que puedan florecer por el momento en el ambiente dominicano. Por otra parte, tengo Ud. la seguridad de que, a menos que se vea en el caso forzado de tener que defendernos, yo no utilizaré el plumo en comentar la política dominicana. Le repito que la causa de mi salida es el firme propósito de no actuar en política personalista.

Espero que Ud. tendrá la serenidad suficiente para comprender mi posición y que tomará esta carta como expresión fiel de alguien sincero, que siente repugnancia por el engaño y que se resiste con todas sus fuerzas a ser hipócrita. Esa es mi esperanza, señor Presidente, y mi más firme anhelo utilizar solamente el plumo en la realización de obras que prestigien a la República Dominicana.

Respetuosamente le saludo.


Juan Bosch.

Luna 50-3ro.
San Juan, Pto. Rico.

**LA GUERRA CIVIL
DOMINICANA**

**El Comunismo Dominicano,
Herencia de Trujillo**

La habilidad que mostraron los comunistas durante la insurrección— que denunció el presidente Johnson —no es nueva. Bajo la treintena de años de la dictadura de Rafael L. Trujillo, disfrutaron de una tolerancia que les permitió organizar sus cuadros clandestinos. Robert J. Alexander, en un estudio sobre el comunismo latinoamericano, advertía hace años que el movimiento rojo dominicano es "potencialmente el más poderoso y el de más peligro entre los partidos comunistas de la América Latina". El pasado y el presente del comunismo dominicano son en gran parte obra de esa dictadura absoluta. La simiente marxista, traída por un centenar de refugiados al terminar la Guerra Civil Española, se sembró con el consentimiento de Trujillo. Cuando con motivo del centenario de la independencia (1944) se invitó al ministro soviético Dimitri Zainik, la bandera roja ondeó en el Hotel Jaragua, y se brindó públicamente "por Trujillo y por Stalin". El ambiente favorable movió a las facciones marxistas de Barahona, Santiago y Santo Domingo a formar el Partido Revolucionario Democrático (1944).

La convocación de elecciones indujo a Trujillo a buscar oposición propicia. Los comunistas expatriados en Cuba prestaron oídos a las razones de un emisario del dictador y decidieron regresar. El Partido Revolucionario Democrático se legalizó como Partido Socialista Popular. El 27 de agosto de 1946 publicó un manifiesto. Pero el 14 de junio de 1947, poco antes de las elecciones, unos disturbios sirvieron de pretexto para proscribir a los comunistas.

Aun cuando los comunistas tradicionales se plegaban a la dictadura, los militantes más jóvenes, desconformes con la "línea del partido", se incorporaban a los esporádicos intentos de resistencia. Las facilidades brindadas por Fidel Castro, empero, determinaron a la jefatura del viejo Partido Socialista Popular a participar en la tentativa de invasión de Maimón, el 14 de junio de 1959.

Las molestias de Trujillo con los EE.UU. dieron pie a una maniobra política que únicamente benefició a los comunistas. Con la excusa de "liberalizar" su gobierno, permitió la aparición del Movimiento Popular Dominicano (1960), que desplegaba una bandera rojinegra, a la usanza fidelista, y repetía estribillos pregonados en La Habana. No tardó en concertarse un "pacto de no agresión" con Castro. La Voz Dominicana cesó sus diatribas contra Cuba, y el "Ché" Guevara dijo a principios de 1961: "Trujillo no es más nuestro enemigo."

La aprobación de Trujillo permitió a los comunistas fortalecer sus células. En la lucha clandestina contra la dictadura no se hicieron distinciones ideológicas, y a raíz del asesinato se comprobó que los rojos se habían infiltrado en las filas antitrujillistas. Los meses del gobierno provisional fueron aprovechados para constituir partidos de bolsillo y para organizar frentes cívicos, con el propósito de llenar el vacío político. La crisis de los cohetes en Cuba obligó al régimen provisional a una enérgica represión, que había ido demorando por temor a su propia inseguridad política. A pesar de las diferencias tácticas, las facciones comunistas o procomunistas visibles—el Partido Socialista Popular, la Agrupación 14 de Junio, y el Movimiento Popular Dominicano—coincidieron en abstenerse de participar en lo que llamaron "farsa electoral" de 1962. En los meses que duró la presidencia democrática de Juan Bosch, los grupos comunistas disfrutaron de mayor libertad de movimiento. Las diferencias parecieron disiparse con la creación del Frente Unido de Liberación Nacional en abril de 1963. El cuartelazo de junio, empero, provocó disensiones internas. En noviembre de 1963 la Agrupación 14 de Junio y el Movimiento Popular Dominicano reunieron un centenar de guerrilleros para abrir varios frentes, cosa que el Partido Socialista Popular condenó como "insurrección armada prematura".

Por lo visto, tras la reunión de partidos comunistas celebrada en La Habana en noviembre, se coordinó de nuevo la acción subversiva en la República Dominicana.

Con respecto a la actuación de los comunistas en la revuelta, en fuentes oficiales norteamericanas se dio una nómina de rebeldes entrenados en Cuba en la que figuran entre otros los siguientes:

LUIS FELIPE VALENTINO GIRO ALCANTARA: Miembro del Partido Socialista Popular, entrenado en guerra de guerrillas en Cuba, en 1963.

MANUEL GONZALEZ GONZALEZ: Comunista español con conocimiento de táctica militar. Actuaba como agente del Servicio de Inteligencia cubano.

MIGUEL ANGEL DESCHAMPS ERICKSON: Miembro del Movimiento Popular Dominicano. Llevó órdenes de Cuba a la República Dominicana en 1963.

HECTOR FLORENTINO OLIVARES: Reclutador de comunistas e izquierdistas para la insurrección. Visitó países del bloque soviético y China.

JUAN MIGUEL ROMAN DIAZ: Miem-

bro destacado de la Agrupación 14 de Junio; hombre clave de las actividades guerrilleras en la República Dominicana a fines de 1963.

JOSE RODRIGUEZ ACOSTA: De la jefatura del Partido Socialista Popular. Se reportó que recibió entrenamiento de guerrillas en Cuba en 1962. Estuvo en Checoslovaquia y en la Unión Soviética.

FIDELIO DESPRADEL ROQUE: Dirigente del 14 de Junio. En la insurrección actuó en una de las fortalezas rebeldes.

CAYETANO RODRIGUEZ DEL PRADO: Dirigente del Movimiento Popular. Entrenado en Cuba, en el bloque soviético y en la China comunista.

RAMON AGUSTIN PINEDO MEJIA: Dirigente del Movimiento Popular. Participó en las guerrillas de 1963.

JOSEFINA LORA IGLESIAS (PIQUE): Tiene preparación médica y ayudó a los guerrilleros en 1963. Recibió adiestramiento político en Cuba.

RAFAEL DE LA ALTAGRACIA MEJIA LLUBERES (BARY): Viejo comunista, dirigente del 14 de Junio. Participó en una tentativa para derrocar al presidente Romulo Betancourt, de Venezuela, en 1963.

HECTOR HOMERO HERNANDEZ VARGAS: Dirigente del 14 de Junio. Tomó parte en disturbios estudiantiles en 1961. Recibió entrenamiento en Cuba, en 1964, y visitó la China comunista.

ADRUBAL DOMINGUEZ GUERRERO: Dirigente del Partido Socialista Popular. Agitador estudiantil.

PEDRO JULIO EVANGELISTA: Sindicalista procomunista.

JUAN DUCOUDRAY MANSFIELD: Viejo líder comunista, en contacto con los movimientos comunistas internacionales. Participó en la dirección de la revuelta al comienzo.

FELIX SERVIO DUCOUDRAY MANSFIELD JR.: Probable dirigente del Partido Comunista Dominicano. Ha vivido en la Unión Soviética y en Cuba.

SILVANO LORA VICENTE: Miembro del Partido Socialista Popular. Intelectual partidario de Castro. Entrenado en Cuba en 1963-1964.

DATO PAGAN PERDOMO: Intelectual comunista que participó en la invasión de la República Dominicana montada desde Cuba en 1959.

PEDRO JULIO MIR VALENTIN: Importante miembro del Partido Socialista Popular, se le tiene como amigo de Fidel Castro. Se dirigía frecuentemente a los dominicanos por Radio Habana.

TOMAS PARMENIO ERICKSON ALVAREZ: Viejo comunista, con alto rango dentro del Movimiento Popular. Recibió entrenamiento en Cuba.

CONTINUA 17

ARGENTINA.....	15 PESOS	EL SALVADOR.....	60 CENTAVOS	PARAGUAY.....	55 GUARANÍES
BOLIVIA.....	5 PESOS BOLIVIANOS	ESPAÑA.....	20 PESETAS	PERU.....	4 SOLES
BRASIL.....	600 CRUZEROS	GUATEMALA.....	20 CENTAVOS	PUERTO RICO.....	25 CENTS
CHILE.....	120 ESCUDOS	HONDURAS.....	50 CENTAVOS	REPUBLICA DOMINICANA.....	25 CENTAVOS
COLOMBIA.....	220 PESOS	MEXICO, D. F.....	100 PESOS	URUGUAY.....	9 PESOS
COSTA RICA.....	1 COLON 75 CENTAVOS	NICARAGUA.....	1 COLON 75 CENTAVOS	VENEZUELA.....	1 BOLIVAR
ECUADOR.....	5 SUQUES	PANAMA.....	25 CENTESIMOS		

7 DE JUNIO DE 1965

MARCA REGISTRADA
REV. U.S. PAT. OFF.