

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



“Transferencia de embriones caprinos por mini laparotomía en condiciones de campo”

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:
M.V.Z. Juan Carlos Gaona Torres

Director de tesis
Dr. Víctor Manuel González Vizcarra

Co-Director de Tesis
Dr. Martin Francisco Montaña Gómez

Asesores
Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez

Dr. Rafael Villa Angulo

MEXICALI, B. C., MÉXICO

21 AGOSTO DE 2015

Transferencia de embriones caprinos por mini laparotomía en condiciones de campo, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra
Director de Tesis

Dr. Martin Francisco Montaña Gómez
Co-Director de Tesis

Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez
Asesora

Dr. Rafael Villa Angulo
Asesor

MEXICALI, B. C., MÉXICO

21 AGOSTO DE 2015

Contenido

Lista de Cuadros.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPOTESIS.....	3
OBJETIVO.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	
Historia de los Caprinos en Mexico.....	5
Evaluación reproductiva.....	6
Ciclo Estral.....	7
Fisiología Hormonal.....	9
Pubertad.....	11
Gestación.....	12
Historia de la Transferencia de embriones.....	13
Sincronización del Ciclo Estral.....	15
Congelación de Embriones.....	17
Descongelación de Embriones.....	18
Técnicas para la detección del estro.....	20
Diagnóstico de Gestación.....	21
MATERIALES Y METODOS	
Análisis Estadístico.....	25
Unidad experimentales.....	26
Instalaciones.....	27

Manejo	27
Embriones Caprinos Congelados.....	27
Protocolo de Sincronizacion.....	27
Procedimiento de Descongelacion de Embriones.....	28
Procedimiento de Mini laparotomía.....	30
Diagnóstico de Gestación.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
RECOMENDACIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34

Lista de Cuadros

Cuadro 1	Protocolo de Sincronización del Ciclo Estral.....	28
Cuadro 2	Protocolo de Descongelación de embriones.....	30

Agradecimientos

A mi director de Tesis, el Dr. Víctor Manuel González Vizcarra por la orientación dada durante los dos años de mi maestría, por sus valiosos conocimientos que complementaron mi formación y por su apoyo incondicional al aceptarme en el proyecto.

Le doy las gracias a la Universidad Autónoma de Baja California que por medio del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias egrese primero como Médico Veterinario y después realice mi posgrado de Maestría en Ciencias Veterinarias.

A la Dra. Olga Maritza por su gran apoyo en este tiempo que duro el posgrado, por su paciencia que nos brindo en todas las preguntas que teníamos sobre el programa de Investigación.

Al INIA de Uruguay y a la Universidad de la República Sede Paysandú por permitirme realizar la pasantía estudiantil en sus instalaciones, así como un agradecimiento a todos los amigos uruguayos que me brindaron su apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por aceptarme en su programa de investigación y apoyarme con sus estímulos económicos durante toda la maestría.

Al Departamento de Movilidad estudiantil UABC por su apoyo para poder realizar la estancia estudiantil fuera del país en mi último semestre.

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a mis padres, que en el transcurso de toda mi vida me han apoyado para poder realizar mis estudios y me animaron a seguir preparándome con este posgrado realizado.

A toda mi familia por sus consejos y sus ánimos de que terminara mi posgrado.

A mis compañeros de posgrado, ya que compartimos momentos de alegría al estarnos formando como investigadores.

A mi pareja por su apoyo y su paciencia en este tiempo de trabajo e investigación.

Y en especial a mi madre por su apoyo, confianza y cariño todos los años de mi vida.....

Resumen

Este ensayo fue conducido en el mes de octubre dentro de la estación reproductiva de caprinos en el estado de Baja California, en su valle agrícola de Mexicali. Los aspectos de descongelación de embriones en pasos en soluciones de sacarosa al .5 Molar así como los procedimientos quirúrgicos fueron realizados totalmente en condiciones de campo, demostrando con ello que el procedimiento de mini laparotomía y la descongelación de embriones y la transferencia de estos es posible, alcanzando hasta un 55% de tasa de gestación, realizando el diagnóstico con ultrasonografía a los 35 días posteriores a la transferencia.

Abstract

This trial was conducted in October within the breeding season of goats in the state of Baja California, in the agricultural valley of Mexicali. Aspects of embryo thawing steps sucrose solutions 0.5 Molar and surgical procedures were entirely made in field conditions, demonstrating that the mini laparotomy procedure and embryo thawing and transfer these may, reaching a 55% pregnancy rate, making the diagnosis with ultrasonography at 35 days post-transfer .

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han comprendido mejor los factores que controlan la reproducción en los animales de granja, particularmente los mecanismos de control hormonal que regulan el ciclo estral y el anestro, así como el reconocimiento materno y el mantenimiento de la preñez(Haresign. *et al.*, 1992).

La cría y el mejoramiento de animales siempre dependieron de la habilidad del hombre para controlar la reproducción. En un principio a través de prácticas tan simples como la extracción, castración o separación de sexos y más reciente a través de las técnicas de inseminación artificial y la superovulación seguida de transferencia de embriones (Mueller. *et al.*, 1993).

La producción in vivo de embriones tiene un conjunto de aplicaciones y ventajas que aconsejan su desarrollo y la búsqueda de nuevas posibilidades, las mayores limitaciones de la técnica se refieren a la necesidad de utilizar la vía quirúrgica para la recuperación y a la variabilidad de la respuesta de los tratamientos de superovulación (Forcada *et al.*, 2009).

La producción de embriones ha sido propuesta como una metodología tendiente a la preservación de especies en peligro de extinción que brinda la posibilidad de disponer de bancos genéticos para su conservación y un reaseguro sanitario para evitar la transmisión de enfermedades (Gibbons, A. y Cueto, M. *et al* 2004).

Con el fin de aumentar la fertilidad en ovejas y cabras, el estro puede ser manipulado por alteración del fotoperiodo, estimulación de las ovejas por el macho

y mediante la aplicación de métodos farmacológicos para sincronizar su presentación. No obstante lograr aceptables tasas de gestación requiere un cuidadoso manejo tanto de la hembra como del macho (Sharkey *et al.*, 2001).

La transferencia de embriones permite introducir nuevas razas mediante la implementación de núcleos genéticos elite para reconformar la ganadería, mejorar la rentabilidad y su competitividad (González L. *et al.*, 2012).

La variabilidad en la respuesta ovárica ha sido relacionada con factores extrínsecos (origen, pureza y protocolo de administración de gonadotrofinas) y factores intrínsecos como la raza, edad y estados nutricional y reproductivo (González *et al.*, 2007).

HIPOTESIS

El protocolo de sincronización, descongelación y transferencia de embriones caprinos demostrara en condiciones de campo, porcentajes de gestaciones aceptables.

Objetivos Generales

Evaluar un protocolo de transferencia de embriones caprinos congelados por mini laparotomía en condiciones de campo.

Evaluar un protocolo de sincronización de celo para transferencia de embriones caprinos congelados por mini laparotomía en condiciones de campo.

Evaluar un protocolo de descongelamiento de embriones para transferencia de embriones caprinos congelados y transferidos por laparotomía en condiciones de campo.

Historia de los caprinos en México

El aprovechamiento del ganado caprino en México tuvo su origen a partir de la colonia. Fue mediante inmigraciones colonizadoras españolas que llegaron las primeras cabras al país (Ducoing *et al.*, 2005). Sin embargo, se cree que no fue del todo intencional que esta especie llegara al continente americano, ya que su papel en las travesías era el de proporcionar alimento a los tripulantes de las naves. (Ducoing.,2005).

La caprinocultura a nivel mundial se ha desarrollado paralelamente a la historia de la humanidad y actualmente existen más de 450 millones de cabras en el planeta. La población caprina se distribuye prácticamente en todo el mundo y bajo una gran variedad de condiciones agroecológicas, sin embargo, la mayor proporción de caprinos se encuentra a lo largo de una franja comprendida entre los Trópicos de Cáncer y Capricornio, en donde confluyen por un lado, la mayor parte de las zonas áridas y semiáridas del planeta, y por otro, gran cantidad de países subdesarrollados, quienes coincidentemente poseen el mayor número de cabras a nivel mundial (China, India, Pakistán, Nigeria y Turquía). (Ducoing .,2005).

En estos países, los niveles de producción de los caprinos son muy bajos en comparación con los países desarrollados, como Francia, España y Estados

Unidos de Norteamérica, quienes a pesar de tener poblaciones caprinas comparativamente bajas, han logrado altos niveles de productividad en la especie. México se ubica en el décimo tercer lugar dentro de los países con mayor población caprina, compitiendo únicamente con Brasil en el continente Americano y con una población de alrededor de 9 millones de cabezas. A pesar de la poca representatividad a nivel global dentro de la ganadería, la cabra ocupa un lugar prominente en ella, como lo indica su alta tasa de extracción (porcentaje de animales sacrificados por año en relación a la población nacional), de cerca del 30%. En cuanto a producción de leche, los caprinos generan alrededor de 150 millones de litros al año, lo que implica un aporte por cabeza de aproximadamente 17 litros en el mismo período. Todo esto indica que en México existe una caprinocultura tendiente a la tecnificación y a la obtención de mejores rendimientos productivos, tanto con fines de autoconsumo como también con propósitos comerciales (Ducoing.,2005).

Evaluación reproductiva

Los procesos reproductivos dentro del contexto de producción animal tiene relevancia fisiología y económica; su medición resulta esencial para evaluar la habilidad productiva y reproductiva de los rebaños y para determinar cada uno de sus componentes.

Tasa de parición

Constituye una medida de fertilidad del rebano, considerando esta como la capacidad de un animal para concebir y producir crías y se expresa en porcentaje mediante la siguiente ecuación:

Tasa de parición: $(\text{hembras paridas} / \text{hembras expuestas}) \times 100$ (Trejo A. *et al.*, 1998).

Fecundidad

La fecundidad a diferencia de la fertilidad, es definida como la capacidad de una hembra para reproducirse regular y fácilmente. El parámetro se expresa como el número de partos que una hembra presenta en un periodo dado.

Fecundidad= $\text{No. de partos} / \text{hembras paridas} \times 100$ (Trejo A. *et al.*, 1998).

Prolificidad

La prolificidad es definida como el número de cabritos nacidos entre el número de cabras paridas.

Prolificidad= No. De cabritos nacidos/ numero de cabras paridas. (Trejo A. *et al.*, 1998).

Ciclo estral

El ciclo estral se refiere a todos los cambios hormonales, anatómicos y de comportamiento que suceden entre el inicio o el final de un celo y el inicio o el final de otro. En la cabra, este ciclo es en promedio de 21 días. El estro, periodo en el cual la hembra acepta ser montada por un macho, dura en promedio 24 horas (12-72 horas). La ovulación ocurre de 30 a 36 horas después de iniciado el estro. Después de la ovulación, las células de la granulosa se luteinizan formando el cuerpo lúteo, que secreta grandes cantidades de progesterona. Esta es la fase de diestro. Alrededor de los días 16-17 del ciclo estral (día 0= día del estro), las prostaglandinas uterinas provocan la destrucción del cuerpo lúteo, induciendo una reducción drástica de los niveles plasmáticos de progesterona. Inmediatamente después se incrementa la secreción de LH y FSH, provocando la maduración y el crecimiento de los folículos. Estos secretan grandes cantidades de estradiol, provocando el estro, y por retroacción positiva, el pico preovulatorio de LH y la ovulación. La mayor cantidad de LH plasmática se detecta de 10 a 15 horas después de iniciado el estro, y la ovulación ocurre alrededor de 20 horas después del pico preovulatorio de LH. De acuerdo con su duración, los ciclos estrales son

clasificados en normales (17-25 días), cortos (<17 días) y largos (>25 días). (Delgadillo J. *et al.*, 2008).

Fisiología hormonal

La GnRH o gonadoliberina es un decapeptido producido por neuronas secretoras del sistema nervioso central. La secreción de esta hormona es influenciada por condiciones externas como el fotoperiodo, feromonas, stress y nutrición, e internas como por el efecto de estrógeno y progesterona. Su acción se ejerce a nivel de las células gonadotróficas de la hipófisis, activando la síntesis y liberación de FSH y LH. Esta hormona ha sido utilizada para lograr la concentración de la ovulación. Las gonatropinas FSH y LH son glicoproteínas sintetizadas a nivel de la hipófisis anterior y participan en la regulación ovárica. (Gibbons, A. y Cueto, M. *et al.*, 2004).

La FSH favorece el crecimiento y la maduración folicular de los ovocitos, induce en los folículos maduros la presentación de receptores a la LH y sostiene la liberación de estrógenos. Su secreción es continua y presenta dos picos, uno conjunto a la descarga de preovulatoria de LH y otro de menor intensidad 2 a 3 días antes (Gibbons, A. y Cueto, M. *et al.*, 2004).

La LH incrementa su concentración durante un corto periodo en forma de pulsos que decrecen progresivamente hasta su nivel basal. La frecuencia de los pulsos de LH está supeditada a la estimulación de las células hipofisiarias por la GnRh. Cada pulso de LH se corresponde con un pulso de GnRH. Durante la fase preovulatoria, el incremento de la secreción de estrógenos liberados por los folículos ejerce un retrocontrol positivo sobre el eje hipotálamo hipofisiario, que induce el llamado pico preovulatorio de LH. Participa conjuntamente con la FSH en la maduración final del folículo, produce la liberación del ovocito y la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo que presenta ovulación (*Gibbons, A. y Cueto, M. et al.,2004*).

La progesterona es un esteroide secretado por el cuerpo luteo del ovario y en el caso de ocurrir fertilización por la placenta. Su función es mantener la gestación. Antes de la ovulación, participa con los estrógenos en la manifestación externa del celo. Ejerce un control negativo sobre el hipotálamo, inhibiendo la secreción de GnRH y la consiguiente pulsatilidad de LH de manera que bloquea la posibilidad de ovulación (*Gibbons, A. y Cueto, M. et al.,2004*).

La prostaglandina es un ácido graso secretado por el endometrio uterino, su incremento induce eliminación del cuerpo lúteo y por ende el descenso de los niveles de progesterona y la aparición de un nuevo periodo de estró (*Gibbons, A. y Cueto, M. et al.,2004*).

Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos que son secretado por la teca interna del folículo ovárico, promueve el comportamiento sexual, estimula el desarrollo de características sexuales secundarias (Hafez *et al.*, 2002).

Las inhibinas son proteínas que cuentan con dos subunidades con puentes de disulfuro son secretadas por las células de la granulosa. Desempeñan un papel importante en la regulación hormonal de la folículogénesis ovárica durante el ciclo estral, reducen la secreción de FSH a un nivel tal que mantiene el numero de ovulaciones específicas en la especie (Hafez *et al.*, 2002).

Pubertad

En las hembras caprinas, la edad a la pubertad que es definida como la detección del primer estro y ovulación es muy variable y depende de la raza, época de nacimiento y régimen alimentario.

En los caprinos la edad a la pubertad se ve afectada primordialmente por el peso vivo que es directo de la alimentación, llegando a la pubertad cuando alcanzan el 60 o 70% de su peso vivo adulto, también influyen la raza, el tipo de

parto y la estación del año. En general las cabras sin control reproductivo se aparean en su primer estro con pesos muy bajos lo que atrasa su crecimiento y vida productiva, teniendo además crías muy pequeñas que generalmente se mueren (Trejo A.*et al.*, 1998).

En las razas europeas, la pubertad inicia entre los 8 y 14 meses de edad. En las cabras de isla de Guadalupe, la edad promedio en que ocurre el primer estro es a los 5.7 meses pero varía de 4.3 meses para las hembras nacidas en agosto a 6.8 meses para las nacidas en diciembre. En el norte de México, la detección de la primera ovulación en las hembras es a los 6.6 meses, con un peso corporal de 24.8 kg cuando nacen en mayo, y a los 11.6 meses con un peso corporal de 31.7 kg cuando nacen en octubre. En algunos casos la pubertad aparece después debido a una mala alimentación (Delgadillo J.*et al.*, 2005).

Gestación

El tiempo normal es de unos 150 días, pero varía con las razas y el individuo. Dentro de una misma raza, los periodos de gestación individuales difieren hasta en 13 días. En la mayor parte de las cabras la variación es menor de 2 días respecto al valor promedio de la especie, con excepción de la raza *blac bengal*, la cual promedia 144 días (Hafez. *et al.*, 2002).

Historia de la transferencia de embriones

La transferencia de embriones se comenzó a trabajar experimentalmente en ovinos y caprinos desde 1936. Sin embargo, hasta 1970 se utiliza a nivel comercial, siendo países pioneros Inglaterra, Estados Unidos y posteriormente Francia, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Mejía *et al.*, 2008).

La transferencia de embriones inicio con la finalidad de utilizar a gran escala el potencial genético de las hembras de diferentes especies, ya que permite la formación de rebaños genética y productivamente uniformes, al aumentarse la presión en la selección y reducirse el intervalo entre generaciones, con esta técnica se ha podido obtener un mayor número de embriones y crías de una hembra genéticamente superior a lo que pudiera obtenerse de manera normal en toda su vida productiva, lo cual justifica los altos costos que implica dicha técnica (Mejía, 2008; Gibbons *et al.*, 2004).

El primer artículo descrito de caprinos nacido de embriones congelados fue publicado en 1976 por Bilton y Moore. Estos autores congelaron blastocitos de 7 días usando una técnica tradicional de enfriado lento. Ellos evaluaron diversas variables, incluyendo 2 crioprotectores (glicerol 1M) y DMSO (2M), así como dos tasas de enfriamiento entre temperaturas de 6 C y – 60 C (Critzler *et al.*, 2007).

Principios y generalidades sobre la transferencia de embriones

La elección de las hembras donantes se realizara teniendo en cuenta su valor genético, y en base a los criterios apropiados de mejoramiento genético, de las aptitudes productivas de cada raza. (Gibbons *et al.*, 2010).

Las condiciones generales de un buen estado reproductivo, sanitario y nutricional son imprescindibles, tanto para las hembras donantes como para las receptoras. (Gibbons *et al.*, 2010).

La selección y preparación de las receptoras son bastantes empíricas; no se ha hecho ningún estudio detallado sobre la preparación de las receptoras. Algunos criterios de selección son; al momento de la transferencia, el grado de sincronización(la concordancia del embrión, estadio de la receptora es crucial con una tolerancia de +/- 12 horas), así como la presencia y el aspecto del cuerpo lúteo. En todos los casos el embrión debe de ser depositado del lado donde existe al menos un cuerpo lúteo. (Chemineau P., Baril G., Delgadillo J.A *et al.*,1993).

En la cabras lecheras, se ha determinado una tasa superior de sobrevivencia embrionaria, cuando se realiza una siembra doble (Gibbons *et al.*, 2010). Los 2 métodos más utilizados en la siembra de embriones son el quirúrgico o no quirúrgico por laparoscopia. En ambos casos procede a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino y en su tercio superior mediante una

micropipeta se deposita el embrión en la luz uterina. Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo entre el descongelamiento y siembra se reduce a 20 o 30 minutos (Gibbons *et al.*, 2010).

Sincronización del ciclo estral

La sincronización de celo constituye un paso absolutamente primordial para el éxito en todas las tecnologías de reproducción asistida. Por un lado, la técnica permite calendarización de las distintas actividades asociadas al programa reproductivo (ej. inseminación a tiempo fijo). Por otro lado, es esencial para sincronizar el estadio de desarrollo embrionario con el día de ciclo en el útero receptor, en programas que involucran transferencia embrionaria. Por último, en especies de reproducción estacional como la caprina, es fundamental para permitir la realización de trabajos reproductivos año corrido (Baldassarre H. *et al.*, 2007).

El método más difundido de sincronización de celo (y probablemente el más efectivo) es el basado en el uso de dispositivos a base de progestágenos. Dependiendo de factores de disponibilidad en cada mercado, estos dispositivos pueden tener la forma de esponjas intravaginales impregnadas en progestágeno (acetato de medroxiprogesterona, acetato de fluorogestona); dispositivos intravaginales de liberación controlada (CIDR) impregnados con progesterona; o implantes subcutáneos de silicona impregnados en el progestágeno norgestomet.

Cualquiera de los 3 tipos, el protocolo básico consiste en implantar el dispositivo por espacio de 9-11 días en combinación con una inyección luteolítica de prostaglandina (o análogo) en algún punto entre 0 y 48 horas antes de retirar el dispositivo, lo que permite asegurar que el animal no presente un cuerpo lúteo activo luego de retirada la esponja. (Gibbons, 2004).

Monreal utilizo para la sincronización del estro CIDR y dosificación media de 350 UI de eCG intramuscular con jeringa desechable en el día de la retirada del dispositivo intra vaginal el día 14 (Monreal *et al.*, 2002).

El uso de “protocolos largos”, en los cuales los dispositivos son dejados espacio de 18-21 días, ha sido descrito en el pasado. Estos protocolos no requieren ser combinados con un luteolítico por lo que hay un pequeño ahorro en el costo de sincronización, pero su utilización ha sido asociada con fertilidad reducida como consecuencia de un impacto negativo en la capacidad de transporte seminal dentro del tracto reproductor femenino (Baldassarre H. *et al.*, 2007).

Por cuestiones de costo, marco regulatorio o preferencia del mercado, existen situaciones en las que la sincronización hormonal de estro no puede ser utilizada. En estos casos, estrategias alternativas han sido utilizadas con diversos niveles de éxito para permitir la expansión de la temporada reproductiva. Dichas estrategias incluyen el “efecto macho”, el uso de fotoperíodos artificiales y la administración de melatonina Si bien estas técnicas son efectivas para anticipar la

salida del anestro estacional o la producción de preñeces fuera de la temporada reproductiva, su valor es extremadamente limitado como soporte de programas que requieren calendarización precisa y sincronización de ovulación ajustada (Baldassarre H. *et al.*, 2007).

Congelación

Un crioprotector es un compuesto químico que permite la manutención de un tejido o de células por mucho tiempo cuando se les mantiene a baja temperatura. Los crioprotectores difieren en la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección al cristal de agua que confieren y por la toxicidad química que pueden tener sobre las células. (Belascoain *et al.*, 2010).

En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

Permeables o Intracelulares: de bajo peso molecular, Glicerol, Dimetilsulfoxido, 1-2 Propanodiol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol y otros alcoholes, todos estos compuestos deshidratan a la célula penetrando a esta para ayudar a proteger el citoplasma. (Belascoain *et al.*, 2010).

Impermeables o extracelulares: de alto peso molecular, polivinilpirrolidona, glucosa, fructuosa, ficol, dextrano, sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar la célula; son efectivos para preservar

la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua. (Belascoain *et al.*, 2010).

A su vez estos se dividen en impermeables de alto y de bajo peso molecular, los de bajo peso molecular deben combinarse con los permeables para proteger efectivamente a la células durante el congelado. Los de alto peso molecular protegen a las células durante el congelado y descongelado alterando la formación de cristales de hielo a un tamaño y forma inocua (Belascoain *et al* 2010).

Descongelación

Los embriones congelados han sido deshidratados solo parcialmente e inevitablemente al sumergirlos en NL se forman en el interior pequeños cristales de hielo. Para evitar que durante la descongelación se produzca un aumento destructivo del tamaño de dichos cristales, el proceso de descongelación debe de ser lo más rápido posible. Para ello las pajuelas extraídas del tanque de nitrógeno se mantienen 10 segundos en el aire y rápidamente se sumergen en un baño a una temperatura que oscilara entre los 20 y 37 °C durante un tiempo de entre 20 y 30 segundos. Inmediatamente después es necesario proceder a la retirada de crioprotector y la rehidratación del embrión (Abon *et al.*, 2012).

Larocca *et al.*, (1997), encontraron que durante el calentamiento, los crioprotectores deben ser retirados de los embriones antes de ser transferidos, ya

que una vez en contacto con los fluidos uterinos isotónicos, se produce una sobre hidratación que provoca daños celulares irreversibles, con la consiguiente muerte embrionaria debido al shock osmótico. (Abon *et al.*, 2012).

Baril *et al.*, (1995) sugirió que la eliminación del crioprotector se efectúa en forma inversa a la de su adición, y existen varias opciones según el crioprotector utilizado: dilución en varias etapas en soluciones con cantidades decrecientes del crioprotector, dilución en una única etapa, descongelación directa sin dilución del crioprotector. (Abon *et al.*, 2012).

En la mayoría de los casos, es recomendable proceder a la eliminación progresiva del crioprotector, de manera que los flujos de salida de los crioprotectores y entrada del agua sean compatibles con la permeabilidad de la membrana plasmática, ya que si las células son expuestas directamente en un medio isotónico, las diferencias de presión osmótica provocarían una entrada demasiado rápida de agua en la célula, con el riesgo de ruptura y consiguiente muerte celular (Abon *et al.*, 2012).

Los efectos tóxicos de la sacarosa y las condiciones de remoción de glicerol de embriones empajillados después de la congelación y descongelación fueron estudiados en embriones de ratón de 3 días. A 20°C y con exposiciones de 1.0 M de sacarosa por periodos de 30 minutos no mostraron efectos adversos en embriones colectados en fresco (Szell *et al.*, 1986).

La alternativa que actualmente se usa en todas las soluciones de remoción del crio protector es el agregado de concentraciones de sacarosa. Esta molécula no permeable produce un contra balance de la alta concentración de crio protector en el interior de la célula, lo cual reduce la diferencia de osmoralidad entre el medio externo e interno (Martínez G. *et al.*, 2006).

Técnicas para la detección del estro

La inmovilización de las hembras al ser montadas por el macho, es generalmente considerada como un signo de estro. Varios métodos de detección estral pueden ser utilizados, y estos dependen principalmente del sistema de explotación, del tamaño del hato y de las posibilidades económicas y materiales de los productores. (Delgadillo J. *et al.*, 2005).

Machos Intactos

Los machos cabríos con experiencia sexual permiten la detección de un alto porcentaje de hembras en estro. Con la finalidad de evitar gestaciones no programadas, los machos son provistos de un mandil abdominal para evitar copulaciones. (Delgadillo J. *et al.*, 2005).

Machos Vasectomizados

El uso de machos vasectomizados también permite evitar las gestaciones no programadas y el uso de los mandiles abdominales. Además, el comportamiento sexual de estos machos no disminuye. Antes de utilizar los machos recién vasectomizados, es necesario obtener al menos 10 eyaculados para verificar la ausencia de espermatozoides. (Delgadillo J. *et al.*, 2005).

Hembras androgenizadas o machos castrados

Las hembras pueden ser inducidas a mostrar un comportamiento de macho al inyectarles 50 mg de propionato de testosterona diariamente durante 18 días. Una vez que aparece este comportamiento, una inyección semanal mantiene dicho comportamiento. En machos castrados, una dosis de propionato de testosterona cada 3 días durante 20 días, seguidos de esta misma dosis cada 4 días permite restablecer y mantener el comportamiento sexual. (Delgadillo J. *et al.*, 2005).

Diagnóstico de Gestación

Las pruebas más exactas son aquellas que se aseguran y detectan algo que solo es producido por un feto viable y que está siempre presente cuando la cabra ha alcanzado un cierto estado de gestación. (Delgadillo J. *et al.*, 2005).

Retorno al estro

El método más sencillo es la detección del estro alrededor del día 21 de la reproducción. Esta técnica simple, barata y permite identificar a las hembras no gestantes por que las hembras que muestran estro, por lo general están vacías. (Delgadillo J. *et al.*, 2005).

Pruebas Hormonales

Progesterona

Porque es producida solo por los ovarios y no por la placenta, es usada mejor para señalar no gestante. Cabras con elevada progesterona en el día 21 después de la monta puede estar preñada o podría tener una duración del ciclo diferente o una pseudo gestación. (Critzler *et al.*, 2007).

Estrógenos

Son producidos por ambos ovarios y la placenta, pero la sulfato de estrona se cree que es una conjugación de producto esteroidal por parte del feto o la placenta. Puede ser usado para diagnostico de preñez tanto en leche entera o en suero. También es posible mediante análisis de orina con un kit comercial cerca del 55 día de gestación. (Critzler *et al.*, 2007).

Lactogena placentar

Es una hormona producida solo por la placenta, concentraciones en plasma y leche pueden ser medidas después día 60 para diagnosticar gestación. Se cree que la cantidad está relacionada con el peso total de cabritos producidos. (Critzter *et al.*, 2007).

Glicoproteína asociada a la gestación

Esta glicoproteína es secretada a la circulación general al unirse a las células corionicas y las uterinas para constituir la placenta. Esta hormona puede ser detectada en el plasma o suero sanguíneos alrededor del día 27 después de la monta. (Critzter *et al.*, 2007).

Ultrasonido a tiempo real

Una máquina de ultrasonido a tiempo real elimina las preocupaciones sobre falsos positivos si el diagnostico es siempre basado en visualizar el feto o las carúnculas. Los escáneres sectoriales generalmente tienen resolución superior que los escáneres lineales y hacen más fácil contar los fetos. (Critzter *et al.*, 2007).

Escaneo transabdominal

Generalmente la cabra es escaneada de pie, en el lado derecho y se elimina el pelo de la parte lateral y dorsal de la glándula mamaria para mejorar el contacto entre la piel y el transductor, se puede realizar entre el día 30 y 40 de gestación. (Critzler *et al.*, 2007).

Escaneo transrectal

Los transductores lineales de bovinos y equinos con una frecuencia de 5 Mhz pueden ser usados rectalmente para diagnostico temprano entre los 20 y 30 días. (Critzler *et al.*, 2007).

Materiales y Métodos

Descripción del Área de estudio

El experimento se realizó el 14 de octubre de 2013 a cabo en el rancho Casa blanca ubicado en la avenida eucalipto sin número colonia Zaragoza en la ciudad de Mexicali, Baja California. El clima es de tipo desértico donde el mes más frío es enero con una temperatura mínima promedio de -1.66°C y 13°C de temperatura media siendo julio el mes más cálido con una temperatura máxima, promedio y mínima de 45 , 20 y 33°C (INEGI, 2010), con una temperatura media anual de 22°C , con lluvias en invierno (SAGARPA, 2007).

Análisis Estadístico

Las variables de respuesta de este experimento serán la tasa de gestación ($\% \text{ TG} = \text{número de cabras detectadas gestantes a 35 d} / \text{número de cabras expuestas} \times 100$), la tasa de sincronización de celo ($\% \text{ TS} = \text{número de cabras detectadas en celo} / \text{número de cabras expuestas} \times 100$).

Unidades Experimentales

Para el experimento se utilizaron 24 cabras de raza anglonubia-criolla, todas eran adultas de 3 años de edad, al momento del experimento presentaron un peso promedio de 38 kg y una condición corporal de 3 en una escala de 1 al 5, siendo 1 el mínimo y 5 el máximo. Las cabras no habían sido sometidas antes a ningún tratamiento de superovulación y transferencia embrionaria. Ninguna de las cabras se encontraba en periodo de lactación.

Instalaciones

Las cabras fueron alojadas en un corral de malla ciclónica que tenía una altura de 4 pies de alto, el área del corrales de 256 m² (16 m de ancho y 16 m de largo), se les proporciono un bebedero automático y comederos metálicos para depositar el alimento. La sombra se encontraba a una altura de 3.8 metros y estaba compuesta de laminas de aluminio galvanizado.

Manejo

Un mes antes del inicio del experimento, las cabras se les realizo el recorte de pezuñas con tijeras especiales, se aplico por vía IM vitaminas y se administro

desparasitante en este caso ivermectina con unas dosis de 1 ml por cada 50 kg o haciendo una proporción por el peso de cada cabra.

Embriones Caprinos Congelados

Los embriones de caprinos congelados son de la raza Murciano Granadina, fueron importados de España proveniente de la región de Murcia, se encuentran en pajillas de .25 ml y su medio de congelación es el glicerol, se mantienen a una temperatura de -196 C en el tanque de nitrógeno líquido hasta su utilización.

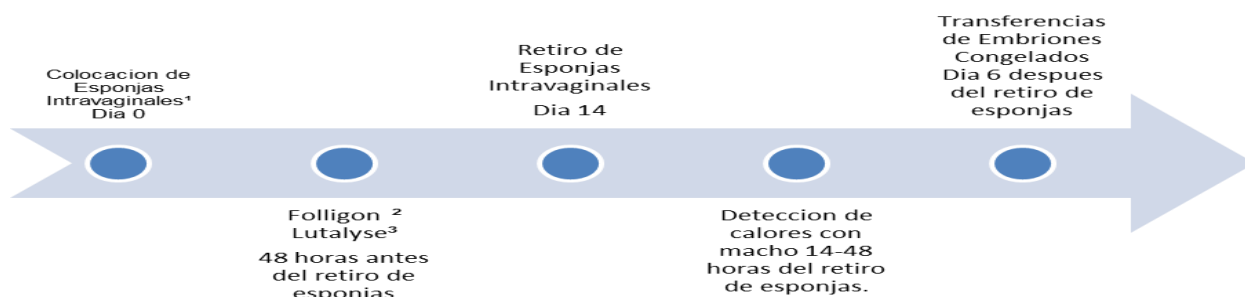
Protocolo de Sincronización

Las cabras se sincronizaran utilizando esponjas intravaginales con 20 mg de cronolona micronizada (Chronogest, MSD Animal Health) durante 14 días, 48 horas antes del retiro de las esponjas se inyecta 300 UI de PMSG (Folligon, Intervet) y 12.5 mg de prostaglandinas(Lutalyse, Pfizer), se verificara que la esponja este bien colocada para asegurar la sincronización de las cabras. En el día 14 se procederá a retirar las esponjas intravaginales (Chronogest, MSD Animal Health) de cada cabra. 14 a 48 horas después de quitar las esponjas intravaginales (Chronogest, MSD Animal Health) se realizara la detección de calores utilizando un macho con marcador y mandil para evitar la copula con las cabras. Al sexto día después de remover las esponjas intravaginales se realizara la transferencia de embriones congelados por mini laparotomía. Se recomienda que 24 horas antes de la transferencia de embriones las cabras receptoras

permanezcan sin alimento y agua, sin embargo en este experimento no se privó de agua y alimento.

Cuadro 1. Protocolo de Sincronización

1



¹ Chronogest,(MSD Animal Health)

² 300 UI de PMSG (Folligon, Intervet)

³ 12.5 mg de prostaglandinas (Lutalyse, Pfizer)

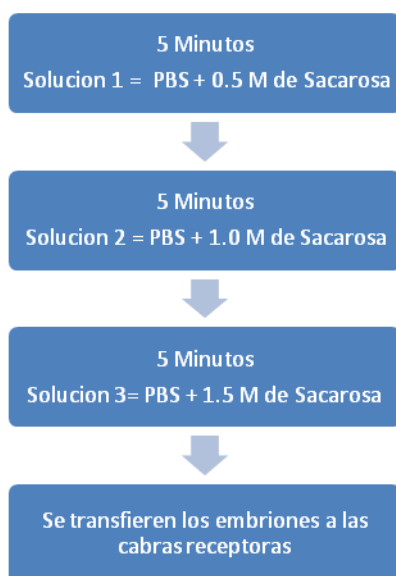
Procedimiento de Descongelación

Los embriones deben ser lavados para eliminar algunos crioprotectores, en este caso el glicerol, los embriones se diluyen en soluciones para evitar el shock osmótico, esto es que el agua entre más rápido al embrión de lo que sale el soluto de su interior, lo que provocaría una dilatación o hinchazón excesiva provocando un rompimiento de las estructuras del embrión.

Para tratar de evitar este evento se recomienda algunos procedimientos como el de elevar la temperatura en la que se encuentra el medio que contiene el

embrión esto quiere decir pasar de 37 °C a 39, así como también es posible utilizar un soluto no permeable como la sacarosa. La función de la sacarosa será la de actuar como una contrafuerza osmótica restringiendo el movimiento de agua a través de la membrana del embrión. Las pajillas que contienen a los embriones congelados son extraídos del tanque de nitrógeno, se agitan por 30 segundos en el aire y después son sumergidas en baño María a 37 °C por 1 minuto. Cada embrión descongelado será depositado 5 minutos en 3 soluciones diferentes conteniendo niveles en la primera solución de 0.5 M de Sacarosa mas PBS, en la segunda solución será de 1.0 M de sacarosa mas PBS y en la tercera solución será de 1.5 M de Sacarosa mas PBS, después en la tercera solución se tomara el embrión con un catéter Tom Cath para ser depositado por mini laparotomía. Todas las soluciones fueron colocadas en una platina con temperatura programable a 37 °C para mantener una temperatura constante en los lavados del embrión.

Cuadro 2. Procedimiento de descongelación de embriones



Procedimiento de Minilaparatomia

El protocolo de minilaparotomía y la descongelación de embriones se llevaron a cabo en condiciones de campo, se adaptó una estructura de sombra próxima a donde se encontraban las cabras, con una medida de 2.30 metros de alto y 4 metros por cada lado, esto proporcionó un medio que protegía del exterior para llevar a cabo los procedimientos.

Para realizar la transferencia de embriones las cabras son sedadas con xilacina (Procin, Pisa) inyectada intramuscularmente 0.4 mg por kg de PV, posteriormente son acomodadas en una cama quirúrgica para iniciar su

preparación la cual consiste en rasurar la zona de incisión localizada de 3 a 5 cm arriba de la ubre en la línea media, después se inyectara lidocaína 0.1-0.2mg/kg IM (Pisacaina, Pisa) al 2% sin epinefrina en la zona de incisión. Se procederá a buscar el cuerno uterino para exteriorizarlo y hacer la punción para depositar el embrión contenido en el lumen de un cateter, ya depositado el embrión se regresa el cuerno uterino a su lugar para después suturar la incisión e inyectar penicilina intramuscular (PISACILINA,Pisa) a una dosis de 11, 000 a 22, 000 UI por kg de peso corporal.

Diagnóstico de Gestación

Es importante realizar el diagnostico de gestación de las hembras receptoras transferidas, en este caso lo realizaremos por medio de ultrasonografía. La ultrasonografía es un método no invasivo que se realizara en el día 35 después de transferir los embriones congelados, por medio de ultrasonografía transabdominal, se utilizara un equipo de ultrasonido marca kaixxin 5000v para realizar el diagnostico, se aplicara el gel en el área del abdomen cercana a la ubre y se procederá a realizar ultrasonografía a cada cabra para comprobar o descartar gestación, hay una precisión del 90 % identificando la vesícula amniótica o el feto.

Resultados y Discusión

El protocolo de sincronización se realizó dentro de la estación reproductiva alcanzando una tasa de 100 % de inducción de estro, similares resultados a los obtenidos por (Reyes F, *et al.*, 2010).

La tasa de gestación de 55% obtenidas en este experimento son similares a las obtenidas por (Martínez A. *et al.*, 2006).

La técnica de transferencia de embriones utilizando mini laparotomía resulto ser eficiente en 100% ya que permite la visualización del sitio de transferencia ipsilateral al cuerpo lúteo, así como estimar la calidad de estos. Esta técnica demostró su utilidad en el año 2008, con la investigación de (Gutiérrez C. *et al.*, 2008).

Recomendaciones

Los protocolos y métodos de descongelación, así como de transferencia de embriones son aceptables en condiciones prácticas de campo, con entusiasmo investigativo proponemos su utilización con mayor frecuencia en nuestro estado, así como también dentro del país.

En lo personal propondré su utilización en investigaciones y difundiendo la técnica de transferencia de embriones en pequeños rumiantes como una metodología para alcanzar importante progreso genético en los hatos de pequeños rumiantes.

Literatura Citada

Abon Escalona Laura V., Calentamiento en paso único de embriones bovinos producidos invitro y vitrificados, Universidad de Oviedo., 2012.

Baldassarre H. Reproduccion Asistida en la especie caprina, de la inseminación artificial a la clonación. Rev Bras Repro Anim p274-283, 2007.

Berlascoain María G., Diaz Ericka., Huter Soledad., Técnicas para la crio preservación de embriones bovinos., Córdoba 2010.

Chemineau P., Baril G., Delgadillo J.A., Control Hormonal de la reproducción en el caprino. Revista Científica, FCV-Luz, Vol III, N3 1993.

Critzer John k, Muellen Steven F, The Comparative cryobiology of preimplantation embryos from domestic animals, Chapter 9, 2007.

Delgadillo Sánchez J.A. Inseminación artificial en caprinos. Primer edición México D.F. Editorial Trillas ,2005.

Ducoing Watty A.E. Zootecnia de Caprinos. Primera edición México D.F. 2005.

Forcada F., Casao A., Abecia J.A., Producción de embriones ovinos. PR 10, NUM.2:14-19 (2009).

- Mueller, J. 1993. Utilización de la inseminación artificial y la superovulación con transferencia de embriones en el mejoramiento genético de ovinos. INTA, EEA Bariloche.
- Hafez E.a S.E., Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^a ed. México, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, 2002.
- Haresign W. 1992. Manipulation of reproduction in sheep. Review. J Repr Fert 45: 127-139).
- Gibbons, A. and Cueto, M. 2004. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos, Bariloche INTA, Rio Negro.
- Gibbons, A. and Cueto, M. 2010. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos, Bariloche INTA.
- Gonzales-Bulnes A. 2007. Avances en transferencia de embriones en pequeños rumiantes. Acta Scien Veterinariae. 35(Supl.3): s773-780.
- Gonzales, M.L., Cárdenas, O., Sapana, R., Efecto de la hora de la siembra, edad y número de cuerpos lúteos en receptoras de embriones criopreservados de ovino de la raza Dohne Merino. Spernova 2012; 40-41.
- Martínez, G.A., Optimización de métodos de crio preservación de embriones bovinos y ovinos, Tesis Doctoral, 2006.

Mejía, V.O. 2008. Transferencia de embriones en ovejas y cabras. Memorias del curso “Recolección y transferencia de embriones en ovinos”. Centro de enseñanza, investigación y extensión en producción ovina. FMVZ, UNAM.

Monreal Duenhes, Toniollo H.G., Zorzatto J.R., Archivos de zootecnia, Vol.51, num.196, pág. 456, 2002.

Trejo Gonzalez Arturo A., Métodos de estudio en Sistemas, Reproducción Animal Capitulo V, 1998.

Szell, A., Shleton, J.N., Sucrose dilution of glicerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapors, Journal Reprod. And Fert., 76,401-408,1986.

SAGARPA. INIA-CIANO. 2007. Guía para la asistencia técnica agrícola: área de influencia del CAEMEXI.ED.CAEMEXI, 2^{da} Ed. Mexicali, B.C. México.

Sharkey S, Callan RJ, Mortiner R, Kimberling C. 2001. Reproductive techniques in sheep. Review. Food Anim Prac 17: 435-455.

