

Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras

Córdova-Izquierdo, A.1; Córdova-Jiménez, M.S.2;
Córdova-Jiménez, C.A.3; Guerra-Liera, J.E.4

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud (04960), México. E-mail: aci57@prodigy.net.mx. ²Laboratorios Brovel SACV. ³Becario de CONACYT, México, Doctorando Fac. Veterinaria, Univ. de León (España). ⁴Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

Resumen

Córdova-Izquierdo, A.; Córdova-Jiménez, M.S.; Córdova-Jiménez, C.A.; Guerra-Liera, J.E.: *Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras*. Rev. vet. 19: 1, 67–79, 2008. El objetivo de esta revisión es mostrar la importancia de algunos procedimientos que pueden ser utilizados para aumentar el potencial reproductivo en ovinos y caprinos. Se presentan métodos de sincronización del estro, estimulación de la ovulación, inseminación artificial, transferencia de embriones y manipulación genética.

Palabras clave: oveja, cabra, fertilidad, sincronización, estro, inseminación artificial.

Abstract

Córdova-Izquierdo, A.; Córdova-Jiménez, M.S.; Córdova-Jiménez, C.A.; Guerra-Liera, J.E.: *Procedures to increase the reproductive potential in sheep and goat*. Rev. vet. 19: 1, 67–79, 2008. The aim of this review is to emphasize the importance of some procedures that can be implemented to increase the reproductive potential in sheep and goat. Methods of oestrus synchronization, ovulation stimulation, artificial insemination, embryos transfer and genetic manipulation, are presented.

Key words: sheep, goat, fertility, oestrus synchronization, artificial insemination.

ABREVIATURAS UTILIZADAS (en orden alfabético)

BSA: albúmina sérica bovina
CIDR: dispositivo de aplicación intravaginal de progesterona
COC: complejo *cúmulus*-ovocito
FGA: acetato de fluorogestona
FSH: hormona foliculoestimulante
GH: hormona de crecimiento.
GnRH: hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas
hCG: gonadotropina coriónica
IA: inseminación artificial
IGFBP: factor de crecimiento insulínico unido a proteínas
IGF-I: factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I
IVC: cultivo *in vitro* de embriones
IVM: maduración *in vitro* de ovocitos
LH: hormona luteinizante
MAP: acetato de medroxiprogesterona
MGA: acetato de melengestrol
oGH: hormona de crecimiento ovina
pFSH: hormona foliculoestimulante porcina
PG600: combinación de PMSG y hCG
PGE₁: prostaglandina E₁
PGE₂: prostaglandina E₂
PGF₂α: prostaglandina F₂α
pGH: hormona de crecimiento porcina
PMSG: gonadotropina sérica de yegua preñada
SOF: medio de cultivo a base de fluidos sintéticos del oviducto
tris: buffer de hidroximetil-aminometano
TSH: hormona estimulante de la tiroides

INTRODUCCIÓN

Ovejas y cabras domésticas (*Ovis aries* y *Capra hircus*) son bóvidos poliéstricos estacionales¹³; ello representa una adaptación filogénica para asegurar que las crías nazcan en un período adecuado del año para su supervivencia¹⁴. La pubertad se presenta entre los 5 y 7 meses en la cabra y 6 y 9 meses en la oveja. En el morueco y macho cabrío, la monta con eyaculación de espermatozoides viables ocurre entre los 4 y 6 meses de edad, cuando el peso corporal alcanza entre 40 y 60% del peso del adulto¹³.

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 preñez¹⁴.

Con el fin de aumentar la fertilidad en ovejas y cabras, el estro puede ser manipulado por alteración del fotoperíodo, 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 macho²⁹.

La sincronización del estro habilita el uso de la inseminación artificial (IA) pero, especialmente en los ovinos, la aplicación de esta tecnología es más complicada que en otras especies, debido a que la anatomía del cérvix dificulta la manipulación y penetración para depositar el semen *in utero*. El depósito del semen en la parte anterior de la vagina produce bajas tasas de gestación. El mejor método es el depósito intrauterino guiado mediante laparoscopia. Otra alternativa que ha tenido éxito es la IA transcervical, que si bien ha mostrado ser capaz de penetrar el cérvix en el 87% de los casos, tal porcentaje no se condice con la tasa de gestación^{17,29}.

La transferencia de embriones en ovinos y caprinos es otro método que puede ser empleado para mejorar el potencial reproductivo; su utilización representa una propuesta de distribución económica de material genético y también reduce el riesgo de transmisión de enfermedades específicas. Por otro lado, permite el almacenamiento indefinido de germoplasma para futuras generaciones, lo cual es un recurso invaluable para la regeneración de líneas o razas de poblaciones animales y para evitar la extinción de alguna especie²⁹.

1. SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO

De forma natural, las ovejas y las cabras se reproducen en ciertas épocas del año; sin embargo, cuando el estro y la ovulación son inducidos, estas hembras pueden ser inseminadas en cualquier momento siempre que tengan buena salud, estén libres de parásitos y presenten buena condición corporal. Las crías deben ser retiradas entre 6 y 8 semanas antes de realizar la IA¹⁰.

Cuando el estro es sincronizado (inducido), uno de los factores más importantes que limitan los porcentajes de gestación es el apareamiento de las hembras fuera de la estación reproductiva; su repercusión se refleja en la libido de los machos, así como en la cantidad y calidad de la producción seminal, debido al daño que sufren los espermatozoides durante el transporte a través del cérvix, causado por el uso de esponjas intravaginales con progestágenos para sincronizar el estro¹⁴.

Recientemente se ha indicado que los estresores, a través de los componentes hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, son capaces de alterar la interacción entre GnRH y síntesis de estradiol, cuya elevación está directamente relacionada con la oleada preovulatoria de LH y la ovulación³⁰.

Se sabe que las ovejas responden efectivamente al manejo del fotoperíodo, el cual consiste en un lapso de 30 o más días bajo 16 horas de luz, seguido por 60 días con 16 horas de oscuridad; bajo estas condiciones, la respuesta en la presentación de estros se mejora con el uso animales celadores efectivos (machos castrados tratados con andrógenos) o administrando progesterona al final del programa de sincronización²⁹. Para asegurar la detección de todas las hembras en estro, es necesario utilizar 2% de machos celadores efectivos en hembras que presentan estro naturalmente y 4% en hembras que hayan sido sincronizadas en un ciclo sexual anterior¹⁰. Al respecto, para controlar el problema de reducción de fertilidad causado por tratamientos de sincronización, se debe de combinar el método de sincronización del estro (primer ciclo) y detección del estro en el siguiente ciclo (segundo ciclo), obteniéndose así mejores porcentajes de gestaciones¹⁰.

Se ha señalado que para aumentar los porcentajes de gestaciones obtenidos al utilizar cualquier programa de sincronización de estros para realizar IA, deben tomarse en cuenta los siguientes aspectos⁷:

Nutrición: En cabras y ovejas, una dieta de alimentación restringida retrasa el inicio del estro, reduce la tasa de ovulación y disminuye los porcentajes de gestaciones en comparación con regímenes nutricionales adecuados.

Estrés: Los factores ambientales como altas o bajas temperaturas y el manejo inadecuado pueden retrasar o suprimir los signos de estro y deprimir la tasa de ovulación. Además, pueden demorar el inicio del estro después de terminar los tratamientos de sincronización.

Efecto macho: La presencia de machos cerca de los lotes de hembras con programas de sincronización de estros, puede repercutir negativamente en los porcentajes de estros sincronizados.

Tipo de progestina usada: Las más empleadas son acetato de fluorogestona (FGA) y acetato de medroxi-progesterona (MAP), otro es el dispositivo de aplicación intravaginal de progesterona (CIDR), que produce estros altamente sincronizados, a las 36-44 horas después de remover el dispositivo^{6,29}.

Al evaluar métodos de sincronización de estros en ovejas se encontró que la sincronización se presentó a

las 36 horas posteriores, con los siguientes resultados: con CIDR (100%), con esponjas intravaginales (94,4%) y con prostaglandina $F_{2\alpha}$ (72,2%). El tratamiento con CIDR (300 mg de progesterona) dura 12 días, lapso similar al de la esponja intravaginal (500 mg de progesterona); la $PGF_{2\alpha}$ se aplica a razón de 15 mg vía intramuscular, con repetición a los 10 días ²⁹.

Métodos farmacológicos. Progestágenos. Para la sincronización efectiva de un grupo de hembras, la duración del tratamiento con progestágenos debe superar la vida efectiva del cuerpo lúteo: 12-14 días en ovejas y 16-18 días en cabras. Cuando el tratamiento se suprime, el estro aparece 2-3 días después. El tratamiento actúa como un cuerpo lúteo, inhibiendo la liberación de gonadotropinas. Al suprimir el tratamiento la hipófisis aumenta la liberación de gonadotropinas, lo que estimula el crecimiento folicular y ovulación ¹⁰.

El estro generalmente ocurre 24-56 horas después de remover la fuente de progesterona, aunque los programas que usan inseminación artificial o transferencia de embriones pueden requerir cerrar la sincronización del estro por adición de gonadotropinas (hCG) para programar la progesterona, usando alternativas como FSH y PG-600 (400 UI PMSG + 200 UI hCG) ²⁹.

La administración de PMSG 48 horas antes de finalizar el tratamiento, reduce el intervalo de retiro de la progestina al inicio del estro. La administración subcutánea de PMSG fue satisfactoria en cabras Boer con un intervalo reducido desde el inicio del estro hasta el pico de LH, comparada con la administración intramuscular (6,5 versus 10 horas, respectivamente) ⁷.

En Estados Unidos no están aprobados los productos a base de progestina o gonadotropinas para cabras. Solo puede aplicarse el acetato de melengestrol como producto progesterona/progestina. Como fuente de PMSG está aprobada la PG600 (400 UI PMSG y 200 UI hCG). Cuando se comparó la PG600 con la PMSG en cabras lecheras, usado con implantes norgestomet subcutáneo y cloprostenol, resultó significativamente superior sobre las tasas de preñez con servicio natural (76 y 90%, respectivamente) ⁷.

El uso de progestágenos durante el período de anestro induce una forma de diestro que produce el desarrollo de folículos ováricos normales. Al remover el progestágeno, los folículos pueden ovular durante la estación en que la reproducción fracasa a causa de la retroalimentación negativa hormonal estacional, por ello es necesario que una gonadotropina estimule la madurez folicular total y la ovulación.

La administración intramuscular de PMSG (400-500 UI) debe realizarse 48 o 24 horas antes de remover el progestágeno, produciendo el estro 24 a 48 horas después. El macho puede introducirse 24 horas después de la administración de PMSG, durante los primeros signos del estro. La administración de gonadotropina antes de remover la progesterona es recomendada para la superovulación y sincronización de la receptora en la transferencia de embriones ²⁹.

Progestágenos orales, como el acetato de melengestrol (MGA) o vaginales son usados para mejorar la respuesta de estimulación del macho celador. La administración de 20 mg de progesterona en medio oleoso un día antes de la introducción del macho celador ayuda a iniciar la actividad normal del ciclo estral durante el período de transición. Además, es necesario el uso de ovejas no lactando y en buena condición corporal para maximizar el efecto del macho ²⁹.

Las ovulaciones que ocurren en respuesta a la introducción del macho rara vez están acompañadas de conducta estral. El tratamiento con progestinas aumenta la proporción de ovejas en estro en respuesta a la introducción del macho. Los tratamientos que utilizan MGA dependen de la tasa de eliminación de la digesta del intestino del animal y parte puede ser secuestrado en el tejido adiposo de la oveja. Para la reproducción de las ovejas fuera de temporada, el tratamiento con CIDR puede ser más efectivo que la administración de 0,125 mg de MGA dos veces al día durante 8 días ⁹.

Esponjas intravaginales con progestágenos. Las esponjas Chronogest® (Intervet) contienen 30, 40 o 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA). Las esponjas que contienen 30 mg se recomiendan en ovejas con anestro, las de 40 mg para ovejas en estación reproductora y las de 45 mg para cabras en cualquier época. Las esponjas Repromap® (Upjohn) contienen 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) y se utiliza para todos los fines ¹⁰. Cada esponja intravaginal tiene una cuerda para facilitar su retiro. Las esponjas se insertan dentro de la vagina con la ayuda de un aplicador, constituido por un tubo de plástico y una varilla ¹⁰.

La esponja debe ser tratada con antibióticos antes de su colocación. El aplicador debe sumergirse en una solución antiséptica para desinfectarlo y lubricarlo. La esponja se introduce dentro del aplicador y es empujada al otro extremo con la varilla, quedando la cuerda fuera. Luego el aplicador junto con la varilla son insertados en la vagina de la hembra a una profundidad de 10-15 cm. Cuando se encuentra en posición, la esponja es empujada por la varilla, siendo depositada en la vagina anterior. Al retirar el aplicador la cuerda debe quedar 15 a 20 cm de la vagina. Luego el aplicador debe ser desinfectado para evitar la propagación de infecciones ¹⁰.

Las esponjas se retiran después de 12-14 días en ovejas y de 16-18 días en cabras, jalando la cuerda hacia fuera e inclinándola ligeramente hacia abajo. Una vez retiradas las esponjas, la mayoría de las hembras presentan estro a los 2 o 3 días, durante la estación reproductiva ¹⁰.

El método más común es la administración de progestina por un período de 9 a 20 días, combinada con una inyección de gonadotropina. Durante la estación reproductiva un tratamiento con progestina menor de 16 días, puede combinarse con una inyección de prostaglandina para lisar al cuerpo lúteo; la PMSG también puede administrarse al final del tratamiento con progestina ⁷.

En la práctica se requiere experiencia adecuada para la inserción del dispositivo intravaginal CIDR. Los procedimientos de higiene y sanidad son esenciales para evitar infecciones vaginales e inflamación, ya que disminuyen las tasas de concepción. Los fluidos se acumulan en la vagina con los dispositivos de esponja. Menos problemas de inserción e irritaciones vaginales han sido reportados con los dispositivos CIDR²⁹.

Se ha demostrado que la fertilidad está relacionada a la concentración de progesterona; el tratamiento de ovejas en anestro durante 5 días con progesterona (CIDR) antes de la introducción del macho, indujo estros fértiles²⁰. La administración de FSH, 24 h antes de retirar la progesterona, aumentó el número de nacimientos por oveja en más de un cordero por parto y por lo tanto, la prolificidad¹⁹. Las tasas de concepción (68%) y de preñez (52%) fueron altas en ovejas tratadas con progesterona. Además, las tasas de concepción resultan similares a las que presentan las ovejas durante la estación reproductiva.

Implante subcutáneo. Los implantes impregnados de progestágenos se colocan debajo de la piel de la oreja con ayuda de un aplicador. El retiro se realiza por incisión de la piel con un escalpelo, con ayuda de pinzas estériles. El método es efectivo, pero causa estrés al animal al momento del retiro debido a la incisión¹⁰, por lo cual en ovinos y caprinos no es aconsejable su uso.

Prostaglandinas. Cuando las ovejas y cabras se encuentran a la mitad o final de la fase lútea del ciclo estral, el cuerpo lúteo se puede destruir administrando PGF₂ α . La hipófisis inicia la liberación de gonadotropinas que estimulan el crecimiento folicular y el estro se presenta a los 2 o 3 días¹⁰.

Las prostaglandinas sintéticas en forma inyectable, como el cloprostenol, son más potentes que la forma natural, como el Prosolvin® (Intervet). Una dosis de 125 mg de cloprostenol es efectiva para producir la regresión del cuerpo lúteo en ovejas y cabras. Lutalyse® (Upjohn) es una forma natural de prostaglandina y es recomendado a dosis de 15 mg para ovejas y 7,5 mg para cabras. Las prostaglandinas se administran por vía intramuscular. El cuerpo lúteo sólo responde a las prostaglandinas entre los 5-14 días del ciclo estral en la oveja y 6-17 días en la cabra. Para sincronizar es necesario aplicar 2 inyecciones con un intervalo de 10-14 días en ovejas y cabras. El estro aparece en la mayoría de las hembras a los 2 o 3 días después de la segunda inyección. Las prostaglandinas no pueden ser utilizadas en hembras que no estén ciclando de forma natural, como en la estación no reproductiva¹⁰.

Como herramienta de sincronización, el uso de prostaglandina F₂ α o análogos queda limitado para hembras ciclando durante la estación reproductiva normal. Las prostaglandinas inducen lisis del cuerpo lúteo maduro, el cual es susceptible 4-5 días después del estro. El estro usualmente se presenta 36-48 horas después de la administración de prostaglandina. Cerca

del 100% de las ovejas ciclando responde a 2 inyecciones de prostaglandina administradas con 11 días de diferencia. Las bajas tasas de fertilidad presentan mayor relación con el uso de prostaglandinas que con el de progestágenos, debido a falla lútea prematura²⁹.

Melatonina. Varios estudios indican que la lenta liberación de los implantes de melatonina pueden adelantar el inicio de la estación reproductiva en rebaños comerciales, pero solo por 4 semanas. El tratamiento no afecta el parto y peso al nacimiento como las esponjas de progestágeno + PMSG; además aumenta el tamaño de camada por oveja preñada (15 corderos extra por 100 ovejas)¹⁴. La hormona melatonina, segregada por la glándula pineal, actúa suprimiendo el efecto de los días largos para inducir el efecto de los días cortos en el fotoperíodo de los mamíferos. La melatonina exógena administrada a cabras expuestas a un tratamiento de días largos (16 h luz / 8 h oscuridad) mantiene la actividad sexual máxima en cabras en anestro¹.

Los implantes contienen 18 mg de melatonina, se colocan subcutáneamente en la base de la oreja y son diseñados para liberar lentamente la hormona durante 70 días¹⁴. El efecto macho es una parte integral de este tratamiento, por lo que es importante que las ovejas sean totalmente aisladas de los moruecos antes del tratamiento, para maximizar la efectividad. El tratamiento adelanta el período de sensibilidad al efecto macho y la introducción del macho promueve una mayor sincronía para el apareamiento, por lo que es recomendable un intervalo de 5-6 semanas entre el tratamiento y la introducción del macho¹⁴.

Como la supervivencia embrionaria disminuye hacia el fin de la estación reproductiva, el efecto de la melatonina puede inducir la ciclicidad del estro durante el anestro, además de mantener la viabilidad embrionaria. Al examinar los efectos del tratamiento con melatonina en ovejas donadoras y receptoras durante el anestro estacional, los resultados indicaron que el 57% de los embriones se desarrollaron a corderos cuando la donadora y receptora recibieron melatonina, el 86 % cuando solo las donadoras recibieron melatonina, 91% cuando solo las receptoras recibieron melatonina y 67% cuando no recibieron melatonina. El tratamiento no alteró la duración de la gestación y no fue afectado el peso al nacimiento de los corderos²³. El tratamiento no está asociado al problema de subfertilidad, generalmente encontrado después del tratamiento con esponjas de progestágeno + PMSG¹⁴.

Métodos naturales. Efecto macho. Carneros celadores u ovejas, pueden estimular la actividad del estro durante el anestro o período transicional a principio del verano. La exposición a un animal celador efectivo por 48 horas o más, incrementa la producción de LH en ovejas sensibles e inicia la ovulación sin estro (estro silencioso) en pocos días²⁹. El método consiste en introducir machos a grupos de hembras aisladas previamente durante algunas semanas. Cuando las hembras

son inseminadas, los machos deben ser estériles (celadores). Este método de sincronización es efectivo al comienzo de la estación reproductiva, cuando la mayoría de las hembras no son cíclicas¹⁰.

Las hembras deben aislarse de los machos y no deben escucharlos, verlos, ni olerlos, por lo menos durante 4 semanas, para posteriormente introducir machos celadores. La mayoría de las ovejas mostraran estros fértiles a los 24 días y las cabras a los 30 días. Gran parte de las ovejas ovula a los 6 días de la introducción del macho, pero la primera ovulación es silenciosa y no está acompañada de estro. La primera ovulación también está acompañada de uno o dos ciclos cortos de 6-7 días de duración, por lo que varía la actividad estral. En la cabra, el primer estro no es silencioso, por lo que el efecto del macho cabrío produce un alto grado de sincronización del estro. Pero también en las cabras pueden aparecer los ciclos cortos de 5-6 o 10-12 días, después de introducir los machos; en estos casos la fertilidad es más baja que en los ciclos normales¹⁰.

El estro silencioso es resultado del desarrollo de un cuerpo lúteo de vida corta que falla prematuramente (4-6 días) o de un cuerpo lúteo normal con duración de ciclo normal seguido por un estro ovulatorio normal. En el primer caso la regresión del cuerpo lúteo de vida corta o prematuro es seguida por el desarrollo de un cuerpo lúteo normal y estro después de 17 días, presentando dos picos de actividad estral a 18 y 24 días posteriores a la estimulación por el macho celador. Pero en la estación normal de cría existe un alto porcentaje de hembras que presentan un cuerpo lúteo normal y ciclo normal al introducir al macho celador. La administración de progesterona antes de la introducción del macho mejora la sincronía del estro, produciendo sólo un pico de actividad estral²⁹.

Las ovejas tratadas con progesterona, antes o al momento de la introducción de los carneros, mejora la efectividad del método al estimular el comportamiento estral en la primera ovulación e induce la formación de un cuerpo lúteo totalmente funcional y de duración normal, eliminando los ciclos cortos. La progesterona puede administrarse mediante pesarios intravaginales, por implante subcutáneo, o aplicando una inyección intramuscular de 20 mg de progesterona en el momento de introducir los carneros. Esto permite inseminar a la mayoría de las ovejas a los 6 días de introducir los machos o al segundo estro, 16-17 días después¹⁰.

2. ESTIMULACIÓN DE LA OVULACIÓN

Aunque se desconocen los mecanismos precisos que regulan el reclutamiento y selección de folículos ovulatorios en la oveja, es posible incrementar la tasa de ovulación y tamaño de camada, incrementando la concentración de gonadotropinas circulantes¹⁴. La mayoría de razas de ovejas y cabras son capaces de mantener una camada de por lo menos dos crías, pero el tamaño de camada de muchas razas de ovejas es menor de dos. Esto representa una pérdida del potencial reproductivo, pero

se puede solucionar estimulando el índice de ovulación de las hembras en estro. También es necesario estimular la ovulación cuando ovejas y cabras son inseminadas en una época diferente a la reproductiva¹⁰.

Para obtener un promedio de dos crías es necesario estimular el índice de ovulación a tres ovocitos, ya que posteriormente hay pérdidas en la fertilización y mortalidad embrionaria¹⁰. La tasa de ovulación determina el tamaño de camada de la oveja y la eficiencia económica de los rebaños. Los primeros intentos involucraron la administración de PMSG para estimular directamente al ovario; aunque esta técnica fue efectiva, está asociada a dos desventajas: (1) la administración debe hacerse en el momento preciso del ciclo estral con ayuda de la sincronización y (2) el incremento de la tasa de ovulación fue asociado a una mayor incidencia de ovejas con tres o más corderos¹⁴.

Como métodos para superar el anestro estacional y permitir adelantar la reproducción de la oveja fueron propuestos: (1) administración de gonadotropinas exógenas para compensar la deficiencia en la secreción endógena de la hipófisis, (2) administración de GnRH o análogos para inducir un aumento en la secreción de gonadotropinas de la hipófisis y (3) administración de melatonina exógena para estimular el patrón de día corto y adelantar la estación reproductiva normal cuando los días son largos¹⁴. Las cabras sincronizadas con múltiples cuerpos lúteos incrementan el intervalo entre el inicio del estro a la luteinización, comparado con cabras con uno o ningún cuerpo lúteo⁷.

Métodos farmacológicos. Suplementación de gonadotropinas. El uso de extractos hipofisarios de corta duración requiere inyecciones frecuentes para mantener el estímulo. La gonadotropina sérica de la yegua preñada (PMSG) es más utilizada porque es de larga duración y sólo se requiere una inyección¹⁰. Se ha postulado que la administración de PMSG presenta las siguientes desventajas: (1) la administración debe realizarse en un estado preciso del ciclo estral, lo cual es imposible a menos que se combine con la sincronización del estro y (2) el incremento de la tasa de ovulación está asociado a una inaceptable incidencia de ovejas con tres o más corderos¹⁴.

La PMSG liofilizada puede administrarse por vía subcutánea o intramuscular en 1 o 2 ml de solución salina o agua estéril. La dosis depende de la raza y la época del año en que se aplique; debe ser de 400-500 UI para hembras en estación reproductiva y 600-750 UI fuera de estación¹⁰. Es necesario sincronizar el estro para inyectar la PMSG dos días antes de retirar el tratamiento con progestágenos o la inyección de prostaglandina, generalmente en época no reproductiva¹⁰.

Dosis de 250-600 UI de PMSG son usadas en la estación no reproductiva, en los primeros 4 meses de lactación en cabras lecheras de alta producción. En cabras tipo carne las dosis comúnmente son más bajas. El uso repetido de PMSG incrementa su inactivación en plasma, lo cual se asocia con un retraso del inicio

del estro y disminución de la fertilidad. El uso a dosis supraóptimas y superovulatorias durante la estación reproductiva está asociado con un incremento en la frecuencia de ciclos estrales cortos (retorno al estro en 5-7 días)⁷.

El uso de esponjas de progestágeno + PMSG para inducir la reproducción fuera de estación está asociado con fallas reproductivas. Una posible causa de la variación de las tasas de concepción es la alta incidencia de pérdida embrionaria completa o falla en la fertilización en ovejas que son inducidas a ovular después del tratamiento con PMSG para promover una alta respuesta del estro¹⁴. La dosis de PMSG requerida para asegurar una alta respuesta del estro causa una alta proporción de ovejas con tasas de ovulación de 4 o más óvulos. Este tratamiento es aplicado antes de la estación reproductiva natural y las ovejas que sufren pérdida embrionaria completa pueden no presentar estro y retornar al anestro al inicio de la estación reproductiva natural¹⁴.

Estudios realizados en otras especies, indican que la FSH es superior a la PMSG en términos de tasas de ovulación y fertilización y en la producción de embriones de buena calidad. La FSH ovina o porcina tiene vida media corta (5 horas), requiriendo de 6 a 8 inyecciones a intervalos de 12 horas, iniciadas 2 o 3 días antes de remover el progestágeno. No obstante, una sola inyección combinando FSH con una dosis moderada de PMSG (400-800 UI) supera las desventajas de cada gonadotropina⁸. La hormona de crecimiento ovina (oGH) no tiene efecto sobre la secreción de estradiol y androstenodiona o sobre el desarrollo de folículos ovulatorios. La hormona de crecimiento (GH) puede estimular la producción de IGF-I por el hígado. La IGF-I aumenta la secreción de estradiol durante la fase folicular y es un potente estimulador de la esteroidogénesis folicular²⁸.

El tratamiento con hormona de crecimiento porcina (pGH) altera la tasa de ovulación en ovejas cuando se administra con FSH. La GH influye favorablemente sobre las tasas de viabilidad embrionaria y puede deberse a su acción positiva sobre la maduración final del ovocito o a un efecto positivo indirecto de la GH/IGF-I sobre el ambiente del oviducto. El tratamiento de GH estimula la función de las células de la granulosa, aumenta la sensibilidad ovárica a las gonadotropinas y puede inducir la diferenciación de las células de la granulosa a través de la producción del factor de crecimiento insulínico (IGF-I). Durante los tratamientos superovulatorios, los folículos preovulatorios producen altos niveles de estradiol, lo que modifica el ambiente del oviducto, aumentando la tasa de ovocitos no fertilizados o embriones degenerados. Pero cuando IGF se encuentra unido a proteínas (IGFBP), puede haber un efecto inhibitorio sobre la actividad de la aromataasa en los folículos preovulatorios¹¹.

Al repetir la superovulación en la cabra con FSH porcina pueden aparecer anticuerpos anti-FSH, disminuyendo la tasa de ovulación después del tercer tratamiento, pero con FSH ovina la respuesta superovulatoria se mantiene⁸. Las cabras superovuladas con PMSG

son propensas a regresión prematura del cuerpo lúteo, presentan ciclos cortos y riesgo potencial de expulsión embrionaria. La hormona estimulante de folículos porcina (pFSH) es una gonadotropina de vida corta que no deprime la fertilidad, además proporciona una mejor respuesta ovulatoria y alta tasa de recuperación embrionaria¹.

Las cabras pueden presentar signos de estro 20-72 horas después del tratamiento con hormonas exógenas. En cabras la tasa habitual de ovulación es de 1,4 pero se eleva de 1,8 a 2,4 en las superovuladas. Los rangos de duración del estro y tasa de ovulación pueden estar influenciados por factores como el tipo de raza, estación en la que se tratan las cabras, método de reproducción (natural o IA), condición del animal o plano de nutrición durante la estación reproductiva¹.

Técnicas de inmunización. Estos métodos aumentan el ritmo de ovulación en la oveja, pero no han sido experimentados en cabras. Las hembras inmunizadas suprimen el efecto inhibitorio de los esteroides ováricos y la inhibina, sobre el hipotálamo e hipófisis. Esto aumenta la secreción de gonadotropinas, principalmente FSH que estimula el desarrollo folicular¹⁰.

Es posible la inmunización contra esteroides con el producto comercial Fecundin® (Glaxo), aplicando una inyección (2 ml) por vía subcutánea (5 semanas antes de la monta o la inseminación), repitiendo la dosis 3 semanas después. Este método evita la estimulación excesiva de la tasa de ovulación y la necesidad de sincronizar el estro¹⁰.

Métodos naturales. Efecto macho. La introducción de machos en grupos de hembras, en el momento de retirar los pesarios o administrar prostaglandina, puede inducir el estro y la ovulación; además puede aumentar el grado de sincronía estral. Es necesario utilizar machos celadores (5-10%) cuando se ha sincronizado el estro¹⁰.

En la oveja, el efecto macho ha sido usado para adelantar el inicio de la estación reproductiva. El efecto estimulante del macho ocurre sobre el desarrollo folicular, con aumento en la producción de estradiol y ovulación. Cuando el efecto macho es aplicado durante el anestro estacional, puede restaurar la actividad ovárica. Las feromonas sexuales actúan directamente coordinando la oleada de gonadotropinas, sincronizando la interacción macho-hembra y la ovulación. Las feromonas producidas por el macho pueden influir sobre el eje hipotálamo-hipofisario, contribuyendo al efecto macho. La posibilidad de adelantar la oleada de LH por el uso del macho requiere el control preciso del tiempo de ovulación, el cual ocurre unas 50 h después de retirar la esponja²⁰.

En cabras de carne el efecto macho es usado comúnmente alrededor del año de edad. La introducción repentina de un macho cabrío previamente aislado (2-3 semanas) produce luteinización y ovulación en muchas de las hembras. La selección genética de hembras fuera

de la estación reproductiva genera algunas poblaciones de cabras transicionales durante la mayor parte de los meses, por lo que no presentan ciclos estrales espontáneos⁷.

El efecto macho puede aumentar la eficiencia reproductiva en cabras. Los signos conductuales del estro aumentan en cabras expuestas al macho cabrío. Luego de inseminar artificialmente las cabras, el servicio por machos cabríos vasectomizados puede reducir la duración del estro, aumentando las tasas de concepción⁷. La presencia del macho cabrío después de remover la progesterona o después de la segunda inyección de prostaglandinas en cabras sincronizadas disminuye el tiempo de retiro de pesarios o de inyección de prostaglandinas para iniciar el estro⁷.

Efecto hembra. Un porcentaje significativo de hembras anovulatorias ante la presencia de cabras en estro son inducidas a ovular, lo cual es común en grupos de cabras sincronizadas cuando son confinadas con cabras sin tratar durante la estación no reproductiva⁷.

3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Ovejas. La necesidad de fertilizar un gran número de ovejas con semen de moruecos sobresalientes requiere el transporte de semen desde los centros de recolección hasta los sitios de inseminación en granjas distantes²⁷. El estado de madurez o envejecimiento del ovocito puede tener efecto sobre la proporción de sexos en ovinos. Un estudio realizado con 380 ovejas inseminadas a diferentes tiempos, demostró que la inseminación 5 h antes de la ovulación produjo 60% de corderos hembras y la inseminación 5 h después de la ovulación produjo 75% de corderos machos. Esto indica que más hembras se producen por inseminación temprana y más machos por inseminación tardía²⁶.

Almacenamiento líquido de semen. Los principales métodos de almacenamiento de semen en estado líquido requieren una temperatura reducida (0-5°C) o ambiente (10-15°C). El diluyente aceptado para la conservación de semen de morueco es glucosa-citrato-yema de huevo. La yema de huevo presenta alto peso molecular y una baja densidad de la fracción lipoproteica, lo que brinda protección al espermatozoide contra el choque por frío, además reduce la pérdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos en el acrosoma durante el almacenamiento líquido²⁷. La composición del *diluyente citrato* usado actualmente es:

2,37 g de citrato de sodio (2H₂O)
0,50 g de glucosa
15 ml de yema de huevo
100.000 UI de penicilina
100 mg de estreptomycinina
Agua destilada csp 100 ml

También los diluyentes que contienen altas concentraciones de *tris* resultan ventajosos para el alma-

namiento frío. El ión hidrógeno es eficiente como amortiguador en la tolerancia espermática al pH de 6,5 a 7,5. Actualmente el medio *tris* es recomendado para expandir el semen de morueco; la composición de esta solución es:

3,63 g de *tris*
0,50 g de fructosa
1,99 g de ácido cítrico
14 ml de yema de huevo
100.000 UI de penicilina
100 mg de estreptomycinina
Agua destilada csp 100 ml

La leche de vaca entera, desnatada o reconstituida, también ha sido usada como diluyente del semen de morueco. El éxito se debe a la fracción proteica, la cual puede actuar como amortiguador contra los cambios del pH y como agente quelante contra algunos metales pesados. También protege parcialmente al espermatozoide durante la reducción de la temperatura en el almacenamiento²⁷.

Antes de la dilución, la leche entera, desnatada o reconstituida debe calentarse a 92-95°C por 8-10 minutos para inactivar la lactenina de la fracción proteica, la cual es tóxica para el espermatozoide. El diluyente de leche reconstituida se prepara disolviendo 9 g de leche desnatada en polvo en 100 ml de agua destilada. Para el control del crecimiento microbiano, antibióticos (1.000 UI de penicilina sódica y 1 mg de sulfato de estreptomycinina) pueden ser añadidos a cada mililitro de los diluyentes de leche entera, desnatada y reconstituida²⁷.

Algunos investigadores indican que la leche desnatada es mejor que la leche entera para el almacenamiento de semen a 2-5°C. Cuando es combinada con antibióticos es tan efectiva como el diluyente yema de huevo-glucosa-citrato para el almacenamiento frío del semen de morueco. La adición de 5% de yema de huevo y 1% de glucosa a la leche desnatada mejora la viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento frío. Pero en la leche desnatada reconstituida se ha encontrado que la viabilidad y fertilidad espermáticas mejoran después del almacenamiento por 8-16 h a 15°C, antes que a 5°C²⁷.

El almacenamiento a temperatura ambiente por inactivación reversible del espermatozoide requiere de dióxido de carbono, el cual ejerce un efecto inhibitorio sobre la motilidad espermática en diferentes especies. Los diluyentes IVT (Illini Variable Temperature) y CUE (Cornell University Extender), utilizados para expandir semen de toro, al ser modificados pueden utilizarse en semen de morueco y requieren CO₂ en estado gaseoso a pH de 6,3 durante 10 minutos antes de ser usados²⁷.

Fertilidad del semen después del almacenamiento líquido, factores que influyen. La fertilidad disminuye cuando el semen es almacenado por más de 24 h al utilizarse en la inseminación cervical. La fertilidad disminuye a una tasa de 10-35% por día de almacenamiento, por lo que el incremento en la duración del

almacenamiento causa deterioro espermático, independientemente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de almacenamiento. Los principales cambios que ocurren durante el almacenamiento incluyen reducción de la motilidad e integridad morfológica del espermatozoide. Estos cambios contribuyen a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, principalmente especies de oxígeno reactivo formados por la peroxidación de las membranas del espermatozoide. Esto va acompañado por disminución de la motilidad y supervivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra y reducción de la fertilidad²⁷.

Es posible que el proceso de almacenamiento líquido adelante la maduración de las membranas del espermatozoide, lo cual incrementa la proporción de células capacitadas que presentan reacción acrosomal. Esto reduce la viabilidad y limita la vida fértil de los espermatozoides capacitados²⁷.

La mortalidad embrionaria temprana es considerada una de las principales causas de baja fertilidad. El aumento de las anomalías en el desarrollo embrionario está relacionado con el envejecimiento del espermatozoide. La pérdida embrionaria puede aumentar cuando existe asincronía entre la edad del espermatozoide y el ovocito²⁷. Varios antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, citocromo-C y glutatión peroxidasa tienen efectos benéficos para mantener la motilidad e integridad del acrosoma cuando se añaden al diluyente para el almacenamiento frío²⁷.

Métodos y pruebas para mejorar la fertilidad después de la inseminación cervical. La baja fertilidad obtenida después de la inseminación cervical con semen congelado-descongelado causa fallas en el establecimiento de una adecuada población espermática cervical intacta funcionalmente, lo cual está asociado con el transporte de espermatozoides dañados en el tracto genital de la oveja, por lo que varios métodos y sustancias son usados para mejorar esta situación²⁷.

La técnica de IA transcervical utilizando semen congelado-descongelado produce relativamente altas tasas de preñez (70%) fuera de la estación reproductiva. Esto ocurre cuando las ovejas son inseminadas con 200 millones de espermatozoides móviles, 48 a 52 h después de iniciar el estro¹⁸.

Aumento en la concentración de espermatozoides. Un método consiste en concentrar semen descongelado por centrifugación, para depositar mayor número de espermatozoides en la inseminación. El incremento en el número de células espermáticas en el tracto superior del oviducto mejora la fertilización del ovocito y los nacimientos. La reconcentración de semen descongelado por filtración a través de una membrana porosa e inseminación con un mayor número de espermatozoides incrementa el volumen y la fertilidad. Con otros métodos, de menor eficiencia, sólo unas pocas ovejas pueden ser inseminadas con un eyaculado congelado-descongelado. Con este tipo de semen, se deben usar

altas concentraciones de espermatozoides por inseminación y aún así se producen escasos nacimientos²⁷.

Uso de oxitocina, prostaglandinas, otras sustancias y métodos. La inyección de oxitocina y prostaglandinas en ovejas tiene dos objetivos: relajar el cérvix para permitir la deposición profunda cervical o uterina de semen congelado-descongelado y para incrementar la contractilidad del tracto genital mejorando el transporte de espermatozoides²⁷. La oxitocina estimula la actividad contráctil de cérvix y útero *in vivo* e *in vitro*, dilata el cérvix y mejora el transporte de espermatozoides después de la monta, pero no después de la inseminación con semen congelado-descongelado, deprimiendo los nacimientos. La inyección de Partusisten (sustancia tocolítica) veinte minutos antes de la inseminación mejora la penetrabilidad del cérvix pero no los nacimientos²⁷.

PGE₁, PGE₂ y PGF₂α estimulan la actividad contráctil del cérvix y útero *in vitro* e *in vivo*; además, la suplementación del semen con PGE₁ y PGF₂α antes de la congelación también mejora el transporte de espermatozoides en el tracto genital. La prostaglandina mejora la motilidad espermática y los nacimientos cuando es añadida al semen descongelado, pero no cuando es usada antes del congelamiento. La inyección de ovejas con PGF₂α antes de la inseminación con semen descongelado también mejora los nacimientos, al igual que la inyección intramuscular de hilsa y buscolisina incrementan la penetrabilidad del cérvix²⁷. El tratamiento del semen congelado-descongelado con estimulantes metabólicos (pentoxifilina), estimula la motilidad de los espermatozoides del carnero, mejorando la fertilidad en el caso de la inseminación cervical²⁷.

Doble inseminación. La doble inseminación es un método generalmente aceptado para incrementar la fertilidad. La magnitud de la respuesta depende de la concentración espermática en el inseminado y el tiempo de inseminación en relación al estado del estro. El número de espermatozoides móviles congelados-descongelados depositados por dos inseminaciones es el doble que el depositado por una inseminación. Considerando el intervalo de tiempo entre inseminaciones, el mejor resultado de nacimientos puede ser esperado cuando el primero, realizado en la mañana de detección del estro, es seguida por el segundo 8-10 horas en vez de 24 horas después²⁷.

Profundidad de inseminación. Diferentes técnicas y dispositivos han sido adoptados para la deposición profunda de semen descongelado, debido a la dificultad de penetrar el cérvix ovino. El método de tracción cervical (estiramiento de la entrada del cérvix en la vagina por fórceps) y la tracción cervical combinada con manipulación digital del cérvix a través del recto, permiten la deposición de semen a una profundidad de 2-5 cm, pero la deposición de semen para el último método es a nivel uterino. Ambos métodos mejoran la fertilidad pero son muy estresantes para el animal²⁷.

La inseminación cervical profunda permite una disminución en el número de espermatozoides móviles con una dosis de 20 o 40 millones, la cual después de una sola inseminación causa 50 y 53% de nacimientos respectivamente, comparada con 51% para la inseminación control con 80-100 millones de espermatozoides móviles²⁷.

Inseminación intrauterina. El problema de la barrera cervical puede ser superado por la deposición de semen congelado-descongelado en el útero vía cérvix (inseminación transcervical) o directamente en el útero por laparotomía o laparoscopia²⁷. El procedimiento de inseminación intrauterina por laparoscopia, conducido bajo anestesia local, deposita el semen directamente en el lumen uterino, ya que los espermatozoides presentan problemas de transporte en el cérvix¹⁵.

El éxito de penetración cervical en el útero varía de 39 a 62%. Mediante el uso del sistema "Guelph" (tracción del cérvix), existe un 87% de éxito en la penetración. Los métodos de inseminación transcervical, aunque ofrecen éxito para la inseminación intrauterina, varían con respecto a la repetibilidad de penetración, consumen tiempo y son estresantes para el animal. En un experimento realizado en Australia, la tasa de preñez a 70 días para ovejas inseminadas por laparoscopia fue más alta (48%) que para ovejas inseminadas por los métodos transcervical intrauterino (32%) o cervical (9%)²⁷. Además, las tasas de concepción después de la inseminación intrauterina con semen congelado (55%) son considerablemente menores en comparación con las obtenidas a partir de semen fresco cuando se utiliza el mismo número de espermatozoides móviles (80-90%). Esto indica que el procedimiento de congelación reduce la capacidad fertilizante de las células espermáticas que sobreviven¹⁴.

La superovulación de ovejas Chios inducida por FSH ovina (8,8 mg vía IM, 8 dosis a intervalos de 12 h) y combinada con IA laparoscópica 24-28 h después de iniciar el estro, produce una buena respuesta ovárica con resultados satisfactorios sobre la tasa de ovulación, así como sobre la tasa de fertilización (81,9%) y la tasa de recuperación de embriones al día 6 (66,4%). La mayor ventaja de la inseminación intrauterina es el uso de pequeñas cantidades de semen diluido (0,3 ml en cada cuerno uterino a una concentración de 1×10^9 espermatozoides/ml) y las altas tasas de fertilización obtenidas, en comparación a las logradas con el servicio natural o inseminación cervical²¹.

Se ha señalado que la IA intrauterina laparoscópica mejora la tasa de fertilización y la calidad embrionaria, además aumenta la tasa de supervivencia embrionaria después de la transferencia a las receptoras. No obstante, produce menor recuperación de embriones (65 a 70%) debido a la manipulación física del tracto durante la inseminación o después de retirar la esponja. Las bajas tasas de fertilización están asociadas con el uso de esponjas con baja concentración de progestágeno (30 mg comparado con 45 mg), afectando también el desa-

rollo y fertilización del ovocito, alterando el ambiente del oviducto y del útero y causando la degeneración del ovocito y del embrión⁴. En algunas investigaciones se determinó que la IA laparoscópica genera altas tasas de preñez (71,1%) cuando la inseminación se realiza 50 a 58 h después de retirar la esponja o 46 a 54 h después de retirar el CIDR¹⁵.

Tipo de dispositivo de sincronización. La inseminación laparoscópica produce la mayor parte de nacimientos en ovejas sincronizadas con acetato de fluorogestona (FGA: 30 mg, Chronogest) que con esponjas de acetato de medroxiprogesterona (MAP: 60 mg, Repromap) y el tiempo de inseminación después de remover la esponja (48, 60 y 72 horas) fue más crítico en ovejas tratadas con MAP que con FGA. También los nacimientos dependen del dispositivo intravaginal usado para la sincronización del estro en el otoño [CIDR (54,7%) vs. esponja Chronogest (67,4%)], pero no en la primavera (59,2% vs 56,2% respectivamente)²⁷.

Tiempo de inseminación. El tiempo adecuado para inseminar, después de retirar la esponja puede ser de 36 horas o de 72-78 horas, el cual reduce la fertilidad. El uso de GnRH en ovejas superovuladas mejora la sincronía de la ovulación, incrementando la fertilidad después de la inseminación intrauterina²⁷. La superovulación afecta el transporte y la viabilidad del espermatozoide después de la inseminación vaginal o cervical, también después de la inseminación intrauterina temprana o tardía. La inseminación tardía ha sido relacionada con la fertilización anormal del ovocito o falla de los ovocitos fertilizados para dividirse. También la unión uterotubárica puede actuar como una barrera para el transporte de espermatozoides congelados-descongelados después de la ovulación en ovejas superovuladas; además, la laparoscopia puede interferir con la captura y el transporte normal del ovocito por el oviducto²⁷.

Dosis de espermatozoides por inseminación. La inseminación intrauterina permite una disminución en el número de espermatozoides depositados, en comparación con la inseminación cervical. La proporción de ovejas superovuladas con ovocitos fertilizados después de la inseminación con bajos números de espermatozoides (0,1; 0,5 y 1,0 millón de espermatozoides) fue mejor para la inseminación tubárica (56, 70 y 100% respectivamente) que para la uterina (0, 11 y 40% respectivamente). Parece ser que un número mínimo de espermatozoides móviles congelados-descongelados (1 millón) aún genera fertilidad satisfactoria después de la inseminación intrauterina de ovejas con estro sincronizado²⁷.

Sitio de inseminación intrauterina por laparoscopia. El sitio de inseminación intrauterina puede ser un factor influyente en la fertilidad. La deposición de semen congelado-descongelado en la base y parte

media de los cuernos uterinos es mejor que en la parte final (53% versus 44% de nacimientos, respectivamente); también es más ventajosa la inseminación de ambos cuernos²⁷. En la actualidad, la inseminación intrauterina por laparoscopia no solo ofrece resultados satisfactorios y nacimientos dobles con semen de carnero, también permite una reducción sustancial en el número de espermatozoides móviles depositados. Los espermatozoides congelados-descongelados suplementados con plasma seminal de carnero pueden rendir fertilidad aceptable después de la inseminación cervical²⁷.

Cabras. Los amortiguadores de yema de huevo anteriormente presentaban desventajas para conservar el semen del macho cabrío, debido a una secreción de las glándulas de Cowper, cuya enzima coagula la yema de huevo. En presencia de calcio la enzima hidroliza la lecitina de la yema de huevo a lisolecitina, la cual es altamente tóxica para el espermatozoide. También libera ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) e insaturados (oleico y linoleico) que causan la caída súbita del pH a 6,0. Se recomienda el uso de citrato, oxalato y fosfato para inhibir la actividad de la enzima. Para la preservación es necesario un nivel de 10-20% de yema de huevo².

Es recomendable el lavado doble de los espermatozoides eyaculados por el macho cabrío antes de la preservación para remover sustratos exógenos perjudiciales para la motilidad y respiración espermática. Las técnicas desarrolladas para remover el plasma seminal de las células espermáticas eyaculadas, mejoran la supervivencia *in vitro* del espermatozoide antes y después de la congelación y descongelación².

La leche desnatada calentada a 92°C por 10 minutos inactiva los factores detrimentales como la lactenina, siendo mejor diluyente espermático que la yema de huevo. La inseminación cervical involucra la deposición de los espermatozoides sobre el lado uterino del cérvix. La tasa de concepción es de 50 a 70% dependiendo de la época de inseminación, por lo que es baja en primavera y verano debido a una baja motilidad espermática, en comparación con la de otoño e invierno².

La inseminación por laparoscopia deposita los espermatozoides frescos o congelados-descongelados directamente en los cuernos uterinos, con una tasa de concepción del 80%. Los reportes indican que la dosis efectiva de semen fresco es de 2×10^7 para la inseminación por laparoscopia. Para semen fresco la dosis recomendada es de 1×10^8 espermatozoides para inseminación cervical. La fertilidad es alta para los espermatozoides colectados durante la estación reproductiva y almacenados a -196°C que cuando son almacenados a +4°C por pocas horas (56,7 versus 52,1%). La fertilidad fue menor después de la deposición de semen en el cérvix que en el útero (51,7 versus 62,6%), siendo altamente dependiente de la motilidad espermática².

4. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

El método de transferencia de embriones requiere la sincronización entre la donadora y la receptora, asegurando que el embrión es recolectado en el estado apropiado de desarrollo (mórula o blastocisto temprano) y después transferido a la receptora en el estado adecuado del ciclo estral. Los métodos laparoscópicos de recolección y transferencia de embriones han reemplazado a los métodos de laparotomía quirúrgica, reduciendo el riesgo de complicaciones postoperatorias del tracto reproductivo. Similares tasas de concepción (70-75%) son obtenidas por ambos métodos. La colección de embriones es realizada 5-7 días después del estro²⁹.

Los experimentos de transferencia de embriones demuestran la importancia crítica del estado del ambiente uterino para la viabilidad del embrión, el cual está presente en el útero de la oveja al día 12-13 post-estro para prevenir la regresión del cuerpo lúteo⁸. Una dieta alta en contenido de energía y urea influye subsecuentemente sobre el desarrollo embrionario *in vitro*, los efectos perjudiciales de la urea dependen del consumo de energía. Los daños embrionarios causados por la urea se deben a alteraciones en el ambiente del oviducto o cambios en el folículo, más que a cambios en el ambiente uterino. También se demostró que la calidad de los embriones es menor al cuarto día de preñez en ovejas tratadas con urea, pero la dieta ofrecida a receptoras no tiene efecto sobre la supervivencia embrionaria. El exceso de nitrógeno degradable en dietas para ovejas, eleva la urea y el amonio en plasma y en útero, lo cual está asociado a un aumento en la mortalidad embrionaria²⁵.

Se han demostrado respuestas satisfactorias a la repetición de los tratamientos superovulatorios a intervalos de un año o seis meses. En ovejas donadoras de alto mérito genético, la capacidad de superovular repetidamente con alta respuesta y mínima variación sobre la tasa de ovulación y rendimiento de embriones, puede acelerar las tasas de mejoramiento genético⁵.

El éxito de la transferencia de embriones depende de la selección de las cabras donadora y receptora. Las cabras donadoras son usualmente superiores produciendo hembras con germoplasma valuable. Las cabras receptoras son usadas como madres sustitutas; deben ser fértiles, tener buena habilidad materna y producir leche adecuada para la lactancia de los cabritos. La supervivencia de los embriones transferidos es maximizada cuando las receptoras son sincronizadas para mostrar estro el mismo día o un día después que la donadora. Los machos celadores pueden ser utilizados para identificar a las cabras receptoras que son sincronizadas con las donadoras, a efectos de prepararlas para la transferencia¹.

El daño del espermatozoide durante el transporte a través del cérvix está asociado al uso de progestágeno para sincronizar el estro y de PMSG para inducir la superovulación. Tanto en la monta como en la inseminación cervical de las ovejas donadoras existe una alta

incidencia de falla parcial o completa de la fertilización. La inseminación de ovejas donadoras con semen fresco puede en gran parte eliminar esta limitación¹⁴. Los efectos detrimentales de la repetida recolección quirúrgica de embriones causa adherencias y reduce la fertilidad de las hembras donadoras, limitando la utilidad de la técnica para el mejoramiento genético. Los embriones son recolectados en animales en pie, usando anestesia epidural. La administración de PGE₂ y estradiol dilata el cérvix en cabras para la recolección exitosa de embriones².

El procedimiento de laparoscopia es una buena alternativa y aunque la tasa de recuperación de embriones es 15% menor que la de recolección quirúrgica, permite utilizar a las mismas ovejas donadoras sin afectar la fertilidad subsecuente¹⁴. La acción prolongada de la PMSG causa una alta incidencia de folículos anovulatorios con elevados niveles en la producción de estradiol, lo que altera el transporte del gameto a través del tracto genital y disminuye la tasa de recuperación embrionaria. Estos efectos adversos son reducidos al neutralizar la PMSG con anticuerpos monoclonales después de la estimulación folicular inicial, siendo una alternativa la administración de GnRH al inicio del estro⁸.

Las alteraciones endocrinas y maduración prematura del ovocito indican la pobre eficiencia de la PMSG. La variabilidad en la tasa de ovulación y número de embriones recuperados después de la superovulación son factores que limitan los programas de transferencia en pequeños rumiantes. Los factores estacionales, genéticos y nutricionales contribuyen a la variabilidad, independientemente del tratamiento superovulatorio empleado. La inseminación intrauterina por laparoscopia 48 horas después de remover la esponja, genera una alta fertilidad y una baja frecuencia de embriones degenerados, independientemente de la tasa de ovulación, lo que indica que el ovocito a fertilizar no es dañado por la superovulación con FSH⁸.

Producción *in vitro* de embriones. Las técnicas de maduración *in vitro* de ovocitos foliculares (IVM), su fertilización por espermatozoides capacitados *in vitro* y el cultivo *in vitro* de los embriones producidos (IVC), han sido establecidos exitosamente para ovinos y caprinos⁸. Los ovocitos de animales sacrificados proveen una fuente importante de embriones, pero su valor es limitado para el uso en programas de mejoramiento de ganado. La colección *in vitro* por aspiración folicular, seguida por el corte de la corteza ovárica para liberar ovocitos de folículos que no son evidentes sobre la superficie ovárica provee un método eficiente de colección.

Los ovocitos pueden ser colectados *in vivo* de ovejas por exposición de ovarios por laparoscopia o laparotomía abdominal para visualizar los folículos para la aspiración. El método laparoscópico es conveniente para ovarios con un pequeño número de folículos y tiene la ventaja de poder repetir aspiraciones a intervalos cortos. Para ovarios que presentan un gran número de

folículos después de la estimulación por gonadotropina, la laparotomía abdominal bajo anestesia general hace más eficiente la aspiración y es mayor la tasa de recuperación de ovocitos.

La respuesta ovárica a la estimulación gonadotrópica es caracterizada por una gran variabilidad entre las donadoras. Uno de los factores que contribuyen a esta variabilidad es la edad de la donadora, con un número mayor de folículos presentes a edades tempranas. Para la colección *in vivo*, solo folículos antrales son accesibles y la eficiencia de colección es mejorada por estimulación con hormonas gonadotrópicas para aumentar el tamaño antral. Una consideración importante en la selección del tratamiento hormonal es si el objetivo es obtener ovocitos que han experimentado maduración meiótica *in vivo* antes de la colección u obtener ovocitos inmaduros que pueden ser sujetos a la IVM antes de la adición de espermatozoides para la IA.

Los procedimientos para la producción de embriones *in vitro* pueden ser divididos en: (1) maduración *in vitro*; (2) procesamiento de espermatozoides y capacitación; (3) fecundación *in vitro*; y (4) cultivo *in vitro* de embriones a estados convenientes para la transferencia o criopreservación. Los embriones producidos por IA y sujetos a cultivo bajo ciertas condiciones pueden presentar una alta incidencia de anomalías fetales y mayor peso al nacimiento que los embriones producidos *in vivo*³.

La maduración y fertilización *in vitro* comprometen el subsecuente desarrollo embrionario y fetal. Se ha demostrado que el cultivo *in vitro* prolonga la gestación, aumenta el peso al nacimiento del cordero y aumenta la tasa de muerte perinatal después de la transferencia embrionaria. El uso de suero como fuente de proteína en el medio de cultivo puede acelerar el desarrollo embrionario temprano. La exposición de embriones a condiciones *in vivo* como la asincronía del útero u oviductos de ovejas tratadas con progesterona, son causas de aumento del crecimiento fetal¹⁶.

Los ovocitos ovulados fertilizados y cultivados *in vitro* rinden entre 60 y 70% de blastocistos. Cuando son usados blastocistos madurados *in vitro* la tasa de desarrollo es aproximadamente la mitad. El mayor problema radica en la selección de ovocitos competentes para la maduración *in vitro*, fertilización y subsecuente desarrollo. El tamaño del folículo del cual se origina el ovocito puede ser considerado en la recolección de ovocitos para IVM. La adquisición de la capacidad meiótica y subsecuente desarrollo ocurre progresivamente durante el crecimiento folicular⁸.

El blastocisto es criopreservado mejor que la mórula y la técnica de un paso (1,4 M de glicerol) es mejor que la de tres pasos. Los blastocistos generan tasas de preñez de 90 versus 57% y tasas de supervivencia embrionaria de 45 versus 19% para las técnicas de un paso y tres pasos, respectivamente. Luego los embriones son sumergidos en nitrógeno líquido para almacenarlos después de la equilibración en una unidad de criopreservación. Los embriones caprinos también son tratados con

etilenglicol, el cual es un mejor agente crioprotector que el glicerol (35 versus 22% de cabritos nacidos de embriones descongelados, respectivamente) ².

El etilenglicol ha demostrado ser un mejor crioprotector para el congelamiento de embriones a comparación del glicerol, ya que mejora la supervivencia embrionaria post descongelamiento. Además, su eliminación por el método de un paso con sucrosa es lo más conveniente para la criopreservación de embriones ovinos ²².

Los ovocitos con capacidad para desarrollarse pueden ser seleccionados de ovarios de cabra obtenidos del matadero. Entre 1,5 y 2,1 ovocitos por ovario son obtenidos por aspiración o disección de folículos. Además, la recuperación del complejo *cumulus*-ovocito (COC) por corte del ovario es una técnica sencilla y más eficiente que los métodos de aspiración y perforación. Los folículos mayores de 3 mm tienen más capas de *cumulus* y presentan una mejor maduración *in vitro*, circunstancias a tener en cuenta para seleccionar ovocitos al final de su fase de crecimiento.

Los ovocitos de folículos grandes (> 5 mm de diámetro) generan mayor número de blastocistos que aquéllos de folículos medianos a pequeños (< 5 mm de diámetro). Un promedio de 9 COC son obtenidos por ovario después de preparar a las cabras con FSH. La colecta de ovocitos por aspiración laparoscópica de cabras genéticamente superiores después de la preparación con FSH permite obtener 3-4 COC por ovario. Los efectos de la suplementación del medio utilizando glucoproteínas (LH, FSH, hCG y TSH) durante la IVM de ovocitos de cabra, indican que estas hormonas son requeridas para el desarrollo exitoso de ovocitos en IA.

Un progreso significativo fue el desarrollo de un buen medio de maduración de ovocitos que consiste en fluido folicular caprino (10%) y FSH ovina (100 ng/ml) en medio M199 cultivado bajo 5% de CO₂ a 39°C. Esto reemplaza el co-cultivo con células de la granulosa que provee un método simplificado y eficiente de IVM. El espermatozoide experimenta un proceso de maduración que conduce a la reacción acrosomal, causando la liberación de enzimas proteolíticas que pueden auxiliar la penetración del espermatozoide en el ovocito. Un agente causa la entrada de Ca²⁺ en el acrosoma y un aumento de pH dentro del espermatozoide posibilita su capacitación.

Heparina o cafeína pueden ser adicionados al medio, ya que son agentes estimulantes de la capacitación. La heparina también incrementa la penetración espermatozoide-ovocito cuando es añadida al medio que contiene suero ovino. El espermatozoide caprino puede no requerir del periodo de capacitación. Una alta tasa de fertilización (85%) fue lograda usando un medio de cultivo suplementado con suero estral ovino para inducir la capacitación del espermatozoide ².

Altas tasas de preñez pueden lograrse por la transferencia de embriones derivados por cultivo en un medio de fluidos sintéticos del oviducto (SOF) con albúmina sérica bovina (BSA) y aminoácidos o con SOF suple-

mentado con suero fetal bovino ⁸. En las técnicas de cultivo, una simple solución salina suplementada con aminoácidos y suero con incubación bajo 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ ha tenido éxito. Se ha demostrado que bajo estas condiciones la capacidad de los embriones para desarrollarse es similar a las tasas de los desarrollados *in vivo* (61% de blastocistos producidos *in vitro* resultaron en cabritos vivos) ².

5. MANIPULACIÓN GENÉTICA

La ovulación múltiple en mamíferos es una característica compleja que depende de factores genéticos y ambientales. Muchas razas de ovejas presentan una o dos ovulaciones por ciclo y en la variación de la tasa de ovulación influyen la genética, edad, estación y nutrición. Existe evidencia de la segregación de un *locus* con un efecto mayor sobre el tamaño de camada en la raza Merino Booroola, lo cual generó la búsqueda de genes que influyeran sobre la tasa de ovulación en otras razas de ovejas. La raza Merino Booroola presenta un solo *locus* autosomal denominado *Fecundidad Booroola* (FecB). El efecto sobre el tamaño de la camada es semidominante porque la pérdida embrionaria causa falla parcial de preñez múltiple. Los efectos fisiológicos del *locus* FecB se ejercen sobre la tasa de ovulación y el tamaño y número de folículos ovulatorios.

Los folículos maduros de ovejas portadoras homocigóticas (BB) y heterocigóticas (B+) presentan un diámetro significativamente pequeño comparado con las ovejas no portadoras (++) , debido a que contienen menor número de células de la granulosa. Pero la producción total de estradiol de ovarios de ovejas BB/B+ y ++ son similares. El *locus Fecundidad Inverdale* (FecX¹) fue identificado en una línea prolífica de ovejas Romney que descienden de una oveja (A281) con una historia de 33 corderos procedentes de 11 partos. Los estudios de segregación demostraron que el *locus* se encuentra en el cromosoma X. El efecto de la mutación en hembras portadoras heterocigóticas aumenta la tasa de ovulación alrededor de 1,0 y el tamaño de camada alrededor de 0,6. Las hembras homocigóticas no presentan signos de actividad folicular ^{12,24}.

REFERENCIAS

1. Amoah EA, Gelaye S. 1990. Superovulation, synchronization and breeding of does. Review. *Small Rum Res* 3: 63-72.
2. Amoah EA, Gelaye S. 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. Review. *J Anim Sci* 75: 578-585.
3. Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR. 1997. Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9: 333-339.
4. Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrell B. 2000. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of

- embryos within a MOET program in sheep. *Theriogenology* 53: 727-742.
5. **Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray A, Merrrel B.** 2001. The repetibility of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology* 56: 147-155.
 6. **Bister JL, Noël B, Perrad B, Mandiki SN, Mbayahaga J, Paquay R.** 1999. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Dom Anim Endocr* 17: 315-328.
 7. **Bretzlaff KN, Romano JE.** 2001. Advanced reproductive techniques in goats. Review. *Food Anim Pract* 17: 421-434.
 8. **Cognie Y.** 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Review. *Theriogenology* 51: 105-116.
 9. **Daniel JA, Sterle SW, McFadin-Buff EL, Keisler DH.** 2001. Breeding ewes out-of-season using melengestrol acetate, one injection of progesterone, or a controlled internal drug releasing device. *Theriogenology* 56: 105-110.
 10. **Evans G, Maxwell WM.** 1990. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*, Acibia, Zaragoza.
 11. **Folch J, Ramón JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF.** 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 55: 1777-1785.
 12. **Godfrey RW, Collins JR, Hensley EL, Wheaton JE.** 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. *Theriogenology* 51: 985-997.
 13. **Hafez ES.** 1996. *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 3^o ed., McGraw-Hill, México.
 14. **Haresign W.** 1992. Manipulation of reproduction in sheep. Review. *J Repr Fert* 45: 127-139.
 15. **Hill JR, Thompson JA, Perkins NR.** 1998. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology* 49: 697-709.
 16. **Holm P, Walker SK, Seamark RF.** 1996. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized zygotes cultured *in vitro* or *in vivo*. *J Repr Fert* 107: 175-181.
 17. **Hunter MG.** 1991. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. Review. *J Repr Fert* 43: 91-99.
 18. **Husein MQ, Bailey MT, Ababneh MM, Romano JE, Crabo BG, Wheaton JE.** 1998. Effect of PMSG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology* 49: 997-1005.
 19. **Knights M, Maze TD, Bridges PJ, Lewis PE, Inskoop EK.** 2001. Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrus ewes. *Theriogenology* 55: 1181-1191.
 20. **Lucidi P, Barboni B, Mattioli M.** 2001. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology* 55: 1797-1805.
 21. **Lymberopoulos AG, Amiridis GS, Kühholzer Besenfelder U, Christodoulou Vainas E, Brem G.** 2001. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology* 55: 1855-1862.
 22. **Martínez AG, Matkovic M.** 1998. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 49: 1039-1049.
 23. **McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS.** 1998. Melatonin treatment of embryo donor and recipient ewes during anestrus affects their endocrine status, but no ovulation rate, embryo survival or pregnancy. *Theriogenology* 49: 943-955.
 24. **Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP.** 2000. Genes controlling ovulation rate in sheep. Review. *Reproduction* 121: 843-852.
 25. **Papadopoulos S, Lonergan P, Gath V, Quinn KM, Evans AC, O'Callaghan D, Boland MP.** 2001. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology* 55: 1059-1069.
 26. **Rorie RW.** 1999. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. *Theriogenology* 52: 1273-1280.
 27. **Salamon S, Maxwell WM.** 2000. Storage of ram semen. Review. *Anim Repr Sci* 62: 77-111.
 28. **Scaramuzzi RJ, Murray JF, Downing JA, Campbell BK.** 1999. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Dom Anim Endocr* 17: 269-277.
 29. **Sharkey S, Callan RJ, Mortimer R, Kimberling C.** 2001. Reproductive techniques in sheep. Review. *Food Anim Pract* 17: 435-455.
 30. **Smith RF, Dobson H.** 2002. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. Review. *Dom Anim Endocr* 23: 75-85.