



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y

SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

**TRANSFERENCIA DE DEMI-EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS *IN VIVO*:
SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO FETAL**

TESIS

Que como requisito parcial

para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

Ana Jiménez Pérez

Bajo la supervisión de: **Raymundo Rangel Santos, Ph.D.**



APROBADA

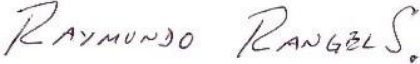


Chapingo, Estado de México, mayo de 2021

**TRANSFERENCIA DE DEMI-EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS *IN VIVO*:
SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO FETAL**

Tesis realizada por **ANA JIMÉNEZ PÉREZ**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

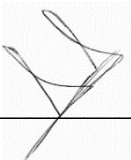
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:  _____

Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR:  _____

Ph.D. AGUSTÍN RUÍZ FLORES

ASESOR:  _____

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VI
DEDICATORIAS	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Transferencia de embriones	4
2.2 Fisiología hormonal y sincronización del estro	4
2.3 Factores que afectan la respuesta a la ovulación múltiple	5
2.4 Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donadora y receptora	5
2.5 Colecta de embriones.....	6
2.6 Evaluación de la calidad morfológica embrionaria	6
2.7 Limitantes de la transferencia de embriones.....	8
2.8 Desarrollo del blastocisto	9
2.9 Reconocimiento materno de la preñez y receptividad uterina para la implantación en rumiantes	10
2.10 Mecanismo de acción de la progesterona.....	12
2.11 Técnica de bisección de embriones.....	12
2.12 Literatura Citada.....	15
3. TRANSFERENCIA DE DEMI-EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS <i>IN</i> <i>VIVO</i> : SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO FETAL	22
3.1 Resumen.....	22
3.2 Abstract	23
3.3 Introducción	24

3.4 Objetivo	25
3.5 Materiales y Métodos.....	25
3.5.1 Localización.....	26
3.5.2 Animales.....	28
3.5.3 Tratamientos	28
3.6 Procedimiento.....	29
3.6.1 Recolección de embriones	29
3.6.2 División de embriones	30
3.6.3 Transferencia de embriones y diagnóstico de gestación.....	31
3.7 Variables de respuesta.....	32
3.8 Análisis estadístico.....	32
3.9 Resultados y Discusión	33
3.9.1 Respuesta ovulatoria y Recolección de embriones	33
3.9.2 Tasa de ovulación	34
3.9.3 Tasa de recuperación embrionaria	34
3.9.4 Tasa de embriones transferibles	35
3.9.5 Tasa de ovocitos	35
3.9.6 Supervivencia de demi-embriones	36
3.9.7 Tasa de gestación	37
3.9.8 Tasa de partos	37
3.9.9 Tasa de pérdidas fetales	39
3.9.10 Tasa de gemelos idénticos.....	40
3.9.11 Tasa de supervivencia de demi-embriones	41
3.10 Eficiencia general.....	41
3.11 Conclusión	42
3.12 Recomendación	42
3.13 Literatura citada	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Temperaturas mínimas, máximas y promedio presentadas en Singuilucan Hidalgo	26
2	Temperaturas mínimas, máximas y promedio presentadas en Singuilucan Hidalgo	27
3	Respuesta superovulatoria de ovejas donadoras de la raza Charollais mantenidas en condiciones de clima templado (CT) o cálido (CC)	34
4	Sobrevivencia <i>in vivo</i> de demi-embriones de ovejas Charollais mantenidas bajo condiciones de clima templado (CT) o clima cálido (CC)	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Temperatura máxima, mínima y promedio en Iguala, Guerrero	26
2	Temperatura máxima, mínima y promedio en Singuilucan, Hidalgo	27

ABREVIATURAS

bTP-1	Proteína Trofoblástica bovina 1
CL	Cuerpo Lúteo
cTP-1	Proteína Trofoblástica caprina 1
eCG	Gonadotropina Coriónica equina
FGA	Acetato de Fluorogestona
FIV	Fertilización <i>In Vitro</i>
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
IETS	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
IFN-t	Interferón tau
LH	Hormona Luteinizante
MAP	Acetato de Medroxyprogesterona
MCI	Masa Celular Interna
MOET	Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones
oTP-1	Proteína Trofoblástica ovina 1
P ₄	Progesterona
PBS	Solución Buffer a base de Fosfatos
PMSG	Gonadotropina Sérica de Yegua Gestante
RMP	Reconocimiento Materno de la Preñez
TE	Trofectodermo
TNCS	Transferencia Nuclear Celular Somática

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y cariño, que siempre me han apoyado en todo momento incondicionalmente: **MI FAMILIA**, por no dejarme caer, los llevo en mi corazón, gracias por inculcarme valores e impulsarme a salir adelante, y por brindarme su amor. ¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado durante el periodo de mis estudios de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera.

A la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y el Posgrado en Producción Animal (PPA) que me ha brindado la oportunidad de crecer profesionalmente y darme los conocimientos para enfrentar los desafíos del campo.

A la explotación comercial de ovinos localizada en Singuilucan, Hidalgo, quien me brindó todas las facilidades y comodidades para la realización del trabajo de campo.

A la explotación comercial de ovinos localizada en Iguala, Guerrero, quien me brindó todas las facilidades y comodidades para la realización de la presente investigación.

A mi comité asesor: el Ph.D. Raymundo Rangel Santos, Ph.D. Agustín Ruíz Flores y el Dr. Demetrio Alonso Ambriz García por darme la confianza y oportunidad de trabajar en conjunto para la realización de este trabajo, por el apoyo, asesoría y disponibilidad en la elaboración y revisión de la tesis.



DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Ana Jiménez Pérez
Fecha de nacimiento	12 de junio de 1992
Lugar de nacimiento	Vicente Guerrero, Ensenada, Baja California
CURP	JIPA920612MBCMRN04
Profesión	Ingeniero en Sistemas Pecuarios
Cédula profesional	10588784

Desarrollo académico

Maestría	DEIS en Zootecnia, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo (URUZA)

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La transferencia de embriones ha llevado a métodos de micromanipulación para aumentar el potencial reproductivo de hembras genéticamente superiores (Beckett et al., 1999; Zavos, Illmensee, & Kaskar, 2005).

La producción de embriones genéticamente idénticos se puede realizar de dos maneras: transferencia nuclear celular somática (TNCS) o división de embriones. La división de embriones imita el proceso natural que origina gemelos idénticos. Dependiendo de la etapa de desarrollo de un embrión, la división se puede realizar mediante separación y cultivo de blastómeros aislados (para embriones en etapa de división) o bisección (para mórula o blastocisto) (Noli, Ogilvie, Khalaf, & Ilic, 2017) y producir animales genéticamente idénticos con fines de investigación (Illmensee & Levanduski, 2010).

La división de embriones se utiliza para fraccionar mecánicamente blastocistos en compactación en dos mitades similares que, incluyen una distribución uniforme de la masa celular interna (MCI) y las células del trofoectodermo (TE) entre los demi-embryones resultantes (Tao, Reichelt, & Niemann, 1995). Willadsen y Polge (1981) demostraron que una proporción reducida de la MCI lleva a una disminución de la viabilidad. La etapa de desarrollo del embrión es importante al momento de la bipartición, ya que el tamaño del embrión original es proporcional al número de células usadas para el desarrollo de los demi-embryones resultantes (Noli et al., 2017).

La supervivencia de demi-embryones después de su transferencia a receptoras suele ser menor que cuando se transfieren embriones enteros, lo anterior puede deberse a la pérdida de viabilidad después de la división, por lo que, el demi-embrión no es capaz de prevenir la regresión del cuerpo lúteo (CL) en la hembra receptora (Beckett et al., 1999). El establecimiento de la gestación posterior a la transferencia de demi-embryones depende en gran medida de la sincronía entre la edad o etapa embrionaria y el endometrio receptor con relación al día de la

ovulación (Schramm & Paprocki, 2004), pero también influye el número y la calidad de las células embrionarias (Heyman, 1985). La pérdida de células trofoblásticas en demi-embriones atribuida a la bisección es 27 y 33 % en blastocistos tempranos y blastocistos expandidos, respectivamente, y 65 % en demi-mórulas (Tao et al., 1995).

La bipartición causa que el número de células y la fertilidad tiendan a disminuir debido al daño fisiológico provocado al momento del corte (Dahlen, DiCostanzo, Spell, & Lamb, 2012). Para que se logre una producción alta de embriones bipartidos es importante minimizar el daño del embrión y mantener el número de células viables al momento del corte, y así, producir demi-embriones con mayor potencial de desarrollo (Hashiyada, 2017). La transferencia de demi-embriones frescos aumenta el porcentaje de partos 69 % (9/13), comparado con demi-embriones congelados 11 % (1/9) (Seike, Sakai, & Kanagawa, 1991). Utilizando la división de embriones en especies de interés zootécnico, es posible aumentar la tasa de preñez de 70 % por transferencia de embriones producidos *in vivo* de buena calidad, a 110 % transfiriendo dos demi-embriones (Wood, 2001).

La tasa de sobrevivencia para un demi-embrión varía entre 50 y 55 %, por lo que, la división embrionaria proporciona un aumento de 30 a 40 % en la tasa de preñez (Wood & Trounson, 2000). En bovinos y ovinos, se han reportado tasas de sobrevivencia de 50 % o más cuando los demi-embriones se transfirieren 20 a 30 minutos después de la división (Shelton & Széll, 1988). Asimismo, Széll y Hudson (1991) indicaron que demi-embriones ovinos y particularmente blastocistos son viables cuando se transfieren en fresco a ovejas receptoras. La división de embriones se ha usado para aumentar la eficiencia en programas de transferencia de embriones en ovinos en condiciones de clima templado. Sin embargo, estudios donde se compare la efectividad de la técnica bajo condiciones medioambientales variables es limitada. Por lo cual, en el estudio se evaluó la eficiencia de la división de embriones como parte de un programa de transferencia de embriones ovinos en condiciones de clima templado y cálido.

En el Capítulo 2 se presenta una Revisión de Literatura, en donde se describen la importancia de transferencia de embriones, procesos fisiológicos y trabajos donde se ha realizado la técnica de división de embriones.

El Capítulo 3 es el artículo científico derivado del trabajo de tesis, se muestran los resultados obtenidos con la transferencia de demi-embryones producidos *in vivo* en dos condiciones ambientales de clima templado o clima cálido.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Transferencia de embriones

La división de embriones se ha utilizado ampliamente en medicina veterinaria para obtener ganado con características genéticas deseables. Los primeros terneros generados por división de embriones fueron registrados en la Asociación Holstein USA en 1982 (Yang et al., 2007). En ovejas, la división de embriones se ha utilizado para aumentar el número de progenie (Széll & Hudson, 1991).

La división consiste en dividir mecánicamente embriones post-compactación en dos mitades iguales. Al fraccionar blastocistos, los demi-embryones resultantes deben incluir una distribución uniforme de la masa celular interna (MCI) y las células del trofoectodermo (TE) (Tao et al., 1995). La bisección del blastocisto ha sido eficaz en especies de mamíferos incluyendo cabras (Udy, 1987), ovinos (Széll & Hudson, 1991), bovinos (Reichelt & Niemann, 1994) porcinos (Nagashima, Kato, & Ogawa, 1989), ratones (Nagashima, Matsui, Sawasaki, & Kano, 1984), equinos (da Silveira, de Souza, Sousa, Gelson, McManus, & Rumpf, 2005) y humanos (Noli et al., 2015).

2.2 Fisiología hormonal y sincronización del estro

Para una mayor eficiencia productiva y reproductiva es necesario utilizar fármacos hormonales específicos en hembras donadoras y receptoras. Las gonadotropinas, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), son glicoproteínas almacenadas en la hipófisis anterior, y participan en la regulación ovárica (Moor & Seamark, 1986). La FSH promueve el crecimiento y la maduración folicular de los ovocitos, induce en los folículos maduros la estimulación de receptores a LH y apoya la liberación de estrógenos; su secreción es constante, y presenta dos picos: uno conjuntamente a la descarga preovulatoria de LH, y otro de menor intensidad dos a tres días después (Filipiak, Viqueira, & Bielli, 2016). La LH aumenta su concentración, durante un corto período, en forma de pulsos que decrecen progresivamente hasta su

concentración basal (Franco & Uribe, 2012). La hipófisis anterior secreta los pulsos de LH en respuesta a la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la cual se libera al flujo portal-hipofisiario por el hipotálamo (Uribe-Velásquez, Restrepo-Cadavid, & Osorio, 2010). Los mecanismos que modulan la liberación pulsátil de GnRH, que a su vez induce los pulsos de LH, representan una función importante en el mantenimiento del ciclo (Campbell, Dobson, & Scaramuzzi, 1998). Durante la fase preovulatoria, el aumento de la secreción de estrógenos liberados por los folículos ejerce una retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo hipofisiario, que induce al denominado "pico preovulatorio de LH". La LH participa juntamente con la FSH en la maduración final del folículo, produce la ovulación, y la formación del CL a partir del folículo que presenta ovulación (Gibbons & Cueto, 1995).

2.3 Factores que afectan la respuesta a la ovulación múltiple

El factor intrínseco de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple, por lo que un porcentaje de hembras no responderá al tratamiento hormonal. La variabilidad individual a la respuesta hormonal de ovulación múltiple está condicionada por el estado fisiológico del ovario y el número de folículos pequeños (1 a 2 mm) (Martínez-Rojero, Mejía-Villanueva, Zarco-Quintero, Mastache-Lagunas, & Reyna-Santamaría, 2017). La raza es otro factor de variación, presentándose mayor respuesta a la ovulación múltiple, embriones transferibles y crías nacidas en razas prolíficas (Scaramuzzi & Radford, 1983). Igualmente, la época de reproducción también influye el número de ovulaciones por oveja (Baril, Casamitjana, Perrin, & Vallet, 1989). Finalmente, la alimentación juega una función importante en la respuesta a los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, pues se ha demostrado que no solo afecta la respuesta ovulatoria, sino que además es posible que se presente regresión prematura de CL (Scaramuzzi et al., 2006).

2.4 Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donadora y receptora

La sincronización del estro en hembras receptoras y donadoras, generalmente

se realiza mediante tratamiento progestacional con dispositivos intravaginales, que contienen Progesterona (P_4), Acetato de Medroxyprogesterona (MAP) o Acetato de Fluorogestona (FGA) (Olivera, 2011). El objetivo de la sincronización es disponer de un estado fisiológico sexual similar entre donadoras y receptoras, al momento de realizar la transferencia de embriones. En ovinos, la gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) (200 a 400 UI) se aplica al momento de retirar las esponjas, y su retiro se adelanta 12 h con respecto a las hembras donadoras (Gibbons & Cueto, 1995).

2.5 Colecta de embriones

La recuperación de embriones se realiza mediante un lavado uterino, el cual se practica entre siete y ocho días después del servicio (Trasorras et al., 2017). El día del lavado uterino, la región abdominal se lava con agua limpia y detergente, las hembras se rasuran y desinfectan con alcohol al 70 %, y se debe prestar especial atención a la eliminación de cualquier material fecal residual (Fonseca et al., 2016). Las donadoras se tranquilizan con xilacina (0.1 mg por cada 10 kg de peso corporal, vía intramuscular). Después de la exposición del tracto genital por laparoscopia, se cuentan los CL presentes en los ovarios. Los embriones se recuperan enjuagando la punta de cada cuerno uterino con 50 ml de solución buffer a base de fosfatos (PBS). El medio se inyecta para producir una corriente de arrastre (lavado o flushing) a través de los cuernos uterinos (Martínez et al., 2015). Los embriones recuperados se evalúan con un microscopio estereoscópico, para calificar la etapa de desarrollo y la calidad de acuerdo con los criterios determinados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) (Lindner & Wright, 1983).

2.6 Evaluación de la calidad morfológica embrionaria

De acuerdo con Rodríguez (2012), la calidad de las mórulas se evalúa a través de sus características morfológicas: la calidad uno o excelente consiste en un embrión compacto (la masa celular debe ser mayor del 85 %), esférico, color

claro, desarrollo de acuerdo con su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares ni blastómeros extruidos; la calidad dos o buena se refiere a un embrión compacto que puede presentar una pequeña descompactación (más de 50 % de las células deben estar intactas), color uniforme, desarrollo de acuerdo con su edad, presencia de pocas vesículas, blastómeros extruidos y desechos celulares; la calidad tres o regular presenta una descompactación marcada (por lo menos 25 % de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o zonas claras y oscuras, vesículas y blastómeros extruidos y masa pequeña; y la calidad cuatro o mala o no transferible indica un embrión con degeneración marcada, masa pequeña (menor del 25 % de lo normal) color oscuro, descompactación marcada, vesículas e irregularidades en los blastómeros.

Cuando un embrión se ha desarrollado hasta tener dos componentes celulares MCI y TE y cavidad o blastocele, se convierte en blastocisto; siendo distinguidas para la evaluación de la calidad. Los blastocistos que son simétricos y esféricos con una MCI y TE intactos, que no contienen blastómeros extruidos visibles se clasifican como una morfología normal y se designan como calidad uno. Los blastocistos anormales clasificados como calidad dos son embriones con; uno o más blastómeros extruidos presentes bajo la zona pelúcida; uno o más blastómeros extruidos bajo la cavidad del blastocele; vacuolas en la capa de trofoblasto; o ninguna masa celular interna visible (Zijlstra et al., 2008).

Desde el desarrollo de las primeras técnicas exitosas para la reproducción asistida en mamíferos, se ha hecho evidente que existe una relación directa entre la calidad del embrión y el éxito gestacional después de la transferencia de embriones (Rocha et al., 2016). Lindner y Wright (1983) describen las etapas de desarrollo de blastocistos recuperados en donadoras superovuladas:

Blastocisto: diferenciación pronunciada de la capa externa de TE y la MCI oscura y compacta. El blastocele es prominente con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino.

Blastocisto expandido: el diámetro total del embrión aumenta drásticamente, con un adelgazamiento simultáneo de la zona pelúcida, aproximadamente un tercio de su grosor original. Los embriones recuperados en la etapa de blastocisto expandido con frecuencia parecen colapsados. Esto se caracteriza por una pérdida total o parcial del blastocele; sin embargo, la zona pelúcida rara vez recupera su grosor original.

Blastocisto eclosionado: los embriones recuperados en esta etapa de desarrollo pueden estar experimentando el proceso de eclosión de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con blastocele bien definido o colapsados.

2.7 Limitantes de la transferencia de embriones

Las técnicas de transferencia de embriones utilizadas en pequeños rumiantes se basan en procedimientos quirúrgicos; se realizan con anestesia general que necesita una combinación de ayuno y medicamentos para el manejo y manipulaciones quirúrgicas en los animales (Fonseca et al., 2013). Las principales limitantes son las adherencias formadas por la cirugía en ovarios y útero, que pueden comprometer el acceso al útero como la captura de ovocitos, y son responsables de disminuir el éxito y limitar colecciones sucesivas de embriones (Fonseca et al., 2016).

Algunos factores que influyen en la eficiencia de los programas de Ovulaciones Múltiples y Transferencia de Embriones (MOET) son: i) la dificultad para obtener embriones de buena calidad; ii) la supervivencia del embrión después de su transferencia; iii) el uso de hormonas exógenas, así como protocolos para su aplicación; y iv) la variación en la respuesta ovulatoria (Bari, Khalid, Haresign, Murray, & Merrell, 2000). La variabilidad en la respuesta a los tratamientos de superestimulación se asocia a factores como la estación del año, el número de veces que se superestimula la misma oveja, el tipo y la dosis de gonadotropina empleada, las condiciones ambientales, el tamaño y etapa de desarrollo de los folículos antrales presentes en los ovarios al momento de iniciar el tratamiento de

superestimulación y la fase de la onda folicular cuando se inyectan las gonadotropinas (Téllez, 2012).

La supervivencia del embrión después de su transferencia depende de factores relacionados tanto con la receptora como con el mismo embrión, siendo esencial la sincronización de donadoras y receptoras, obteniéndose mayor supervivencia cuando existen ± 12 h de asincronía. La variabilidad de la supervivencia de los embriones (0 a 78 %) cuando la calidad embrionaria es la misma, se conoce como "efecto donante" (Gibbons & Cueto, 2011).

El estrés térmico disminuye la tasa de preñez y está asociado con la muerte embrionaria temprana (Wolfenson & Roth, 2019) que interrumpe las funciones ováricas y uterinas. La elevación de la temperatura afecta diversos aspectos relacionados con la gestación, como la secreción de hormonas reproductivas, la calidad de los ovocitos, el éxito de la fertilización y el desarrollo embrionario (Hansen et al., 2001). Los embriones en etapa temprana (de uno a ocho células), son más susceptibles a temperaturas elevadas que embriones en etapa avanzada, como mórulas o blastocistos (Hansen, 2007). Cuando los embriones expuestos a estrés térmico en etapa temprana sobreviven, presentan un menor número total de células, especialmente células del TE en blastocistos (Sakatani, 2017). Por otro lado, la calidad y el número de embriones derivados de la superovulación disminuyen en condiciones de estrés térmico, debido a una alteración en la foliculogénesis, así como la reducción en el flujo sanguíneo uterino y en las concentraciones de progesterona circulante (Silva et al., 2013).

2.8 Desarrollo del blastocisto

El establecimiento de la preñez en ovejas y otros rumiantes domésticos comienza en la etapa de blastocisto, e implica señalización coordinada del reconocimiento de la preñez e implantación del conceptus y posterior placentación (Spencer, Johnson, Bazer, Burghardt, & Palmarini, 2007). Posterior a la ovulación, si el ovocito se fertiliza en el oviducto, el embrión resultante ingresa al útero aproximadamente cuatro días después, formando un blastocisto entre los seis y siete días, el cual contiene dos capas de células, la MCI y una capa de células

TE que rodean la cavidad del blastocelo (Spencer, Johnson, Bazer, & Burghardt, 2004). Después de la eclosión de la zona pelúcida en el día ocho, los blastocistos se desarrollan en forma tubular el día 11, el día 12 comienzan a alargarse alcanzando 10 cm o más de longitud, el día 14 alcanzan 25 cm o más, y el día 17 se forma un conceptus filamentosos (Forde & Lonergan, 2017; Hernández-Ledezma et al., 1992).

Aunque los blastocistos se pueden producir usando fertilización *in vitro* (FIV), deben transferirse a un útero receptivo para que los blastocistos eclosionados crezcan y se desarrollen para formar un conceptus filamentosos alargado (Heyman, Camous, Fèvre, Méziou, & Martal, 1984). Las tasas de biosíntesis de proteína trofoblástica ovina-1 (oTP-1) por el embrión se limita a los días 13 a 21 de preñez, durante el período de máxima producción alrededor del día 15, un solo embrión puede producir de 0.1 a 0.5 mg de Interferón tau (IFN-t) en un período de 24 h de cultivo *in vitro* (Gray, Burghardt, Johnson, Bazer, & Spencer, 2002).

Heyman et al. (1984) encontraron que embriones desarrollados de 14 a 16 días en el útero de ovejas cíclicas podían prolongar la vida útil del CL durante un mes, en esta etapa de desarrollo temprano, el conceptus es largo y el trofoblasto es aproximadamente 50 veces más desarrollado que el disco embrionario.

2.9 Reconocimiento materno de la preñez y receptividad uterina para la implantación en rumiantes

El reconocimiento materno de la preñez (RMP) en ovinos, bovinos y caprinos involucra mecanismos fisiológicos que resultan en la protección de los CL de la luteólisis por modificación o inhibición de la producción uterina de pulsos luteolíticos de PGF2 α (Thatcher et al., 1985). Las proteínas uno del trofoblasto ovino, bovino y caprino (oTP-1, bTP-1 y cTP-1, respectivamente) son secretadas por el TE del conceptus entre los días 10, 21 y 24 de preñez, respectivamente. Estas proteínas antiluteolíticas son las responsables de inhibir la producción uterina de cantidades luteolíticas de PGF2 α (Bazer et al., 1991).

Desde el estado de blastocisto se detectan concentraciones bajas de ARNm y de la proteína de IFN-t, aumentando su producción alrededor del día 10 al iniciarse la fase de elongación del embrión y su orientación sobre la superficie endometrial (Ealy & Yang, 2009). El aumento en la producción de IFN-t se correlaciona con una alta concentración de P₄ (Nephew et al., 1991), alcanzando una concentración máxima del día 14 al 16 de gestación. La expresión de IFN-t disminuye posteriormente y deja de ser detectable a partir del día 25 (Spencer & Bazer, 2004). Además, al detectarse el receptor de interferón en embriones de 15 y 16 días, se ha considerado la posibilidad de una regulación autocrina de IFN-t (Imakawa et al., 2002).

En la mayoría de las especies, surge una necesidad crítica en la primera etapa de gestación para llevar a cabo el RMP (Bowen, 2000). Esto se ha atribuido a una disminución de la comunicación entre embrión y endometrio materno, debido a una insuficiencia de apoyo hormonal (Dey et al., 2004). Las funciones de la P₄ son: i) promover la secreción uterina de IFN-t para el crecimiento y desarrollo del conceptus, ii) insertar una ventana de receptividad, iii) inducir quiescencia y no la contractilidad del miometrio para evitar el aborto, y iv) protección del embrión contra el inmunosistema materno (Bazer, 2013).

El desarrollo del conceptus implica la transición de un blastocisto esférico en el día siete de gestación, a través de las formas ovoide intermedia (día 12-13) y tubular (día 14-15), a un conceptus filamentosos (día 16-17), durante la elongación aumenta en más de mil veces su tamaño, asociado con un aumento en el contenido total de proteínas (Forde & Lonergan, 2017). La longitud del trofoblasto se duplica diariamente entre los días nueve y 16, con un aumento particularmente marcado del día 13 al 14 (Berg, van Leeuwen, Beaumont, Berg, & Pfeffer, 2010).

Como el IFN-t es producido únicamente por el TE del conceptus, existe una correlación positiva entre la longitud y la secreción de IFN-t (Rizos et al., 2012). Los embriones, por lo tanto, deben alcanzar un tamaño adecuado para producir cantidades suficientes de IFN-t y prevenir la luteólisis (Berg et al., 2010), de lo

contrario se provocaría una falta inherente de competencia en el desarrollo o una consecuencia de la asincronía con el entorno materno (Forde & Lonergan, 2017).

2.10 Mecanismo de acción de la progesterona

La P₄ favorece un adecuado ambiente uterino para el desarrollo embrionario y el mantenimiento del conceptus. La P₄ es una hormona esteroide sintetizada por las gónadas (ovarios y testículos), bajo la influencia de las hormonas hipotálamo-hipofisarias FSH y LH, la corteza adrenal (zona glomerular y fasciculata) y en hembras por la placenta durante la gestación (Cutini, 2010). Sin embargo, la fertilidad se ve reducida durante períodos de temperatura, humedad o ambos elevados, indicando que las concentraciones plasmáticas de P₄ son bajas (Friedman, Roth, Voet, Lavon, & Wolfenson, 2012). Esto se puede atribuir a la interrupción del proceso de formación del CL, una baja síntesis de progesterona bajo hipertermia, o puede ser el resultado de folículos preovulatorios deteriorados que posteriormente forman un CL con función subóptima, donde las células de la granulosa y teca luteinizadas obtenidas de los folículos en estrés térmico produjeron bajas concentraciones de P₄ comparadas con las producidas en invierno (Wolfenson & Roth, 2019).

2.11 Técnica de bisección de embriones

La bisección de embriones se ha realizado en varias especies domésticas como ovinos (Willadsen, 1989), bovinos (Ozil, 1983), caprinos (Udy, 1987) y humanos (Escribá, Valbuena, Remohí, Pellicer, & Simón, 2002) siendo ahora una práctica comercial. La técnica de bisección de embriones se realiza en embriones de seis a ocho días después de la fertilización (Gatica, Boland, Crosby, & Gordon, 1984; Loi et al., 1998). Una ventaja de la técnica es que se puede aplicar en embriones derivados de métodos *in vivo* e *in vitro* (Hashiyada, 2017). Durante el período de 1978-1983, Willadsen (1979) trabajó en varias micromanipulaciones de embriones, principalmente en ovejas y vacas. Además, fue el primero en producir mellizos monocigotos por bisección de embriones de ovejas, vacas y caballos en 1978, 1979 y 1980, respectivamente.

En ovinos, la bisección de embriones se ha utilizado para aumentar el número de embriones disponibles y producir grupos de gemelos idénticos para aumentar el número de progenie de ovejas donadoras (Cognié, 1999; Keefer, 2015). Existen factores que influyen en la viabilidad de demi-embriones: la etapa de desarrollo al momento de la división (Széll & Hudson, 1991) encontrando mayor porcentaje de sobrevivencia para demi-blastocistos comparados con demi-mórulas (Shelton, 1992), la calidad del embrión, la micromanipulación, y la presencia de células en demi-embriones resultantes (Chan et al., 2000).

Un embrión de oveja en etapa de blastocisto tiene en promedio 115 células (81 células trofoblásticas y 37 en MCI), en el caso de demi-embriones tiene en promedio 50 células (35 células trofoblásticas y 15 en MCI), y la pérdida promedio de células dañadas es 15 (Skrzyszowska & Smorag, 1989). Teóricamente un demi-embrión debería tener la mitad del número total de células de un embrión completo, pero esto no se cumple en la práctica, debido a esto, el número de células se reduce posterior al momento del corte (Morton, Rowe, Maxwell & Evans, 2006). La mayor pérdida de células entre la MCI y TE en demi-embriones se presenta principalmente en MCI, reduciendo su sobrevivencia (Skrzyszowska & Smorag, 1989), aumenta la apoptosis, afectando la viabilidad, la implantación y el desarrollo fetal (Rho, Johnson & Betteridge, 1998).

Un factor importante al momento de biseccionar embriones por sistemas convencionales, es hacer el corte sin dañar gravemente o destruir el embrión (Escribá et al., 2002). La bisección microquirúrgica de embriones se realiza bajo un microscopio y con la ayuda de una micronavaja y un micromanipulador, el procedimiento dura aproximadamente dos minutos (Széll, 1992). En estudios preliminares para aplicaciones comerciales, la rapidez en la división es a menudo importante, indicando que cortar el embrión tarda en promedio cinco minutos en comparación con colocar demi-embriones en zonas pelúcidas vacías que demanda en promedio 12 minutos. Sin embargo, también puede significar menos pares de gemelos monocigóticos, y un menor número de descendientes nacidos

por embrión dividido debido a una menor capacidad del demi-embrión para sobrevivir (Udy, 1987).

El factor más importante que limita el uso de la bisección embrionaria es la sobrevivencia de demi-embriones después de su transferencia (Skrzyszowska & Smorag, 1989). La sobrevivencia de cada demi-embrión es baja, es menos viable que un embrión entero. Sin embargo, la bisección representa una posible estrategia reproductiva para aumentar el número de crías nacidas por hembra (Escribá et al., 2002). La técnica de bisección de embriones en los sistemas de producción comercial permite la producción de animales con características y genotipo deseados en cada nacimiento (carne, leche o lana) (Nicholas & Smith, 1983). Además, no se han reportado defectos fisiológicos o de desarrollo en la descendencia resultante de embriones divididos.

2.12 Literatura Citada

- Aké, L. J. R., Heredia y Aguilar, M., Gamboa, M. A., Castro F. C., & Rodríguez, O. R. (2003). Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de ovejas Pelibuey. *Veterinaria México*, 34(3), 225-233. doi: 10.21753/vmoa.34.003.92.
- 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(3), 727-742. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00270-8.
- Baril, B., Casamitjana, P., Perrin, J., & Vallet, J. C. (1989). Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 24(3), 101-115. doi: 10.1111/j.1439-0531.1989.tb00427.x.
- Bazer, F. W. (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 4-23. doi: 10.1186/2049-1891-4-23.
- Bazer, F. W., Thatcher, W. W., Hansen, P. J., Mirando, M. A., Ott, T. L., & Plante, C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 43(1), 39-47. doi: 10.1186/2049-1891-4-23.
- Beckett, D. M., Oppenheim, S. M., Moyer, A. L., BonDurant, R. H., Rowe, J. D. & Anderson, G. B. (1999). Progestin implants can rescue demi-embryo pregnancies in goats: A case study. *Theriogenology*, 51(8), 1505-1511. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00093-x.
- Berg, D. K., van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M., & Pfeffer, P. L. (2010). Embryo loss in cattle between days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*, 73(2), 250-260. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.09.005.
- Bowen, R. (2000). Maternal recognition of pregnancy. De *Fertility and Early Embryonic Development*. [http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/fert/mrop.html]. Consultado el 05 de octubre de 2018.
- Campbell, B. K., Dobson, H., & Scaramuzzi, R. J. (1998). Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH-antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *Journal of Endocrinology*, 156(1), 213-222. doi: 10.1677/joe.0.1560213.
- Chan, A. W. S., Dominko, T., Luetjens, C. M., Neuber, E., Martinovich, C., Hewitson, L., Simerly, C. R., & Schatten, G. P. (2000). Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science*, 287(5451), 317-319. doi: 10.1126/science.287.5451.317.
- Cognié, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 105-116. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00235-0.
- Cutini, P. H. (2010). Regulación de la función vascular por progesterona: mecanismos celulares y moleculares. Tesis de Doctorado. Repositorio

- Digital Institucional de la Universidad Nacional del Sur (RID-UNS). Bahía Blanca, Argentina.
- Dahlen, C. R., DiCostanzo, A., Spell, A. R., & Lamb, G. C. (2012). Use of embryo transfer seven days after artificial insemination or transferring identical demi-embryos to increase twinning in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 90(13), 4823-4832. doi: 10.2527/jas.2011-4778.
- da Silveira, L. L., de Souza, R. V., Sousa, M. N. S., Gelson, P. T., McManus, C., & Rumpf, R. (2005). A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferencia de embriões eqüinos. *Ciência Rural*, 35(2), 412-416. doi: 10.1590/S0103-84782005000200026.
- Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocrine Society*, 25(3), 341-373. doi: 10.1210/er.2003-0020.
- Ealy, A. D., & Yang, Q. E. (2009). Control of Interferon-Tau expression during early pregnancy in ruminants. *American Journal of Reproductive Immunology*, 61(2), 95-106. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00673.x.
- Escribá, M., Valbuena, D., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2002). New techniques on embryo manipulation. *Journal of Reproductive Immunology*, 55(1-2), 149-161. doi: 10.1016/s0165-0378(01)00138-3.
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 14-22.
- Fonseca, F. J., Zambrini, N. F., Alvimb, P. G., Peixoto, G. C. D. M., Verneque, S. R., Viana, H. M. J. (2013). Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminant Research*, 111(1-3), 96-99. doi: 10.1016/j.smallrumres.2012.08.007.
- Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Leite, C. R., Nascimento-Penido, P. M. P., Brandão, F. Z., & Lehloeny, K. C. (2016). Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 86(1), 144-151. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.025.
- Forde, N., & Lonergan, P. (2017). Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*, 154(5), 33-43. doi: 10.1530/REP-17-0432.
- Franco, J., & Uribe, V. L. F. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Biosalud*, 11(1), 41-56.
- Friedman, E., Roth, Z., Voet, H., Lavon, Y., & Wolfenson, D. (2012). Progesterone supplementation postinsemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 3092-3099. doi: 10.3168/jds.2011-5017.
- Gatica, R., Boland, M. P., Crosby, T. F., & Gordon, I. (1984). Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology*, 21(4), 555-560. doi: 10.1016/0093-691x(84)90440-0.
- Gibbons, A. E., & Cueto M. I. (1995). Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Área de investigación en producción animal grupo de reproducción. INTA EEA Bariloche Centro Regional Patagonia Norte. Pág.4.

- Gibbons, A. E., & Cueto M. I. (2011). Embryo transfer in sheep and goats a training manual. Área de Investigación en Producción. INTA EEA Bariloche Centro Regional Patagonia Norte. Pág. 38.
- Gray, C. A., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2002). Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*, 124(2), 289-300. doi: 10.1530/rep.0.1240289.
- Hansen, P. J. (2007). To be or not to be determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 68(1), 40-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.03.013.
- Hansen, P. J., Drost, M., Rivera, R. M., Paula-Lopes, F. F., Al-Katanani, Y. M., Krininger, C. E., & Chase, C. C. (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55(1), 91-103. doi: 10.1016/s0093-691x(00)00448-9.
- Hashiyada, Y. (2017). The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *Journal of Reproduction and Development*, 63(6), 527-538. doi: 10.1262/jrd.2017-096.
- Hernández-Ledezma, J. J., Sikes, J. D., Murphy, C. N., Watson, A. J., Schultz, G. A. & Roberts, R. M. (1992). Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by *in vitro* techniques. *Biology of Reproduction*, 47(3), 374-380. doi:10.1095/biolreprod47.3.374.
- Heyman, Y. (1985). Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 2(1), 63-75. doi: 10.1016/0093-691x(85)90073-1.
- Heyman, Y., Camous, S., Fèvre, J., Méziou, W., & Martal, J. (1984). Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes. *Journal Reproduction and Fertility*, 70(2), 533-540. doi: 10.1530/jrf.0.0700533.
- Illmensee, K. & Levanduski, M. (2010). Embryo splitting. *Middle East Fertility Society Journal*, 15(2), 57-63.
- Imakawa, K., Tamura, K., Lee, R. S., Ji, Y., Kogo, H., Sakai, S., & Christenson, R. K. (2002). Temporal expression of type I Interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: Demonstration that human IFN Alpha. can bind to this receptor. *Endocrine Journal*, 49(2), 195-205. doi: 10.1507/endocrj.49.195.
- Keefer, C. L. (2015). Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), 8874-8878. doi: 10.1073/pnas.1501718112.
- Lindner, G., & Wright, R. W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407-416. doi: 10.1016/0093-691x(83)90201-7.
- Loi, P., Ptak, G., Dattena, M., Ledda, S., Naitana, S., & Cappai, P. (1998). Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, 38 (6), 615-628.
- Martinez, E. A., Martinez, C. A., Nohalez, A., Sanchez-Osorio, J., Vazquez, J. M., Roca, J., Parrilla, I., Gil, M. A., & Cuello, C. (2015). Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, *in vivo*-derived, porcine embryos is as effective

- as the default surgical approach. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9. doi: 10.1038/srep10587.
- Martínez-Rojero, R., Mejía-Villanueva, O., Zarco-Quintero, L., Mastache-Lagunas, A., & Reyna-Santamaría, L. (2017). Evaluation of a superovulation protocol for embryo transfer in Creole ewes from the Guerrero Mountain. *Abanico Veterinario*, 7(3), 30-36. doi: 10.21929/abavet2017.73.3.
- Moor, R. M., & Seamark, R. F. (1986). Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. *Journal of Dairy Science*, 69(3), 927-943. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(86)80482-9.
- Morton, K. M., Rowe, A. M., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2006). *In vitro* and *in vivo* survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 65(7), 1333-1345. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.08.009.
- Nagashima, H., Kato, Y., & Ogawa, S. (1989). Microsurgical bisection of porcine morulae and blastocysts to produce monozygotic twin pregnancy. *Gamete Research*, 23(1), 1-9. doi: 10.1002/mrd.1120230102.
- Nagashima, H., Matsui, K., Sawasaki, T., & Kano, Y. (1984). Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *Reproduction*, 70(1), 357-362. doi: 10.1530/jrf.0.0700357.
- Nephew, K. P., McClure, K. E., Ott, T. L., Dubois, D. H., Bazer, F. W., & Pope, W. F. (1991). Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. *Biology of Reproduction*, 44(3), 536-539. doi: 10.1095/biolreprod44.3.536.
- Nicholas, F. W., & Smith, C. (1983). Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Animal Science*, 36(3), 341-353. doi: 10.1017/s0003356100010382.
- Noli, L., Dajani, Y., Capalbo, A., Bvumbe, J., Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Ogilvie, C., Khalaf, Y., & Ilic, D. (2015). Developmental clock compromises human twin model created by embryo splitting. *Human Reproduction*, 30(12), 2774-2784. doi: 10.1093/humrep/dev252.
- Noli, L., Ogilvie, C., Khalaf, Y., & Ilic, D. (2017). Potential of human twin embryos generated by embryo splitting in assisted reproduction and research. *Human Reproduction Update* 23(2), 156-165. doi: 10.1093/humupd/dmw041.
- Olivera, L. C. E. (2011). Uso de esponjas intravaginales con medroxiprogesterona y atractividad sexual en la oveja. Tesis de Doctorado. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Ozil, J. P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *Reproduction*, 69(2), 463-468. doi: 10.1530/jrf.0.0690463.
- Reichelt, B., & Niemann, H. (1994). Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *Reproduction*, 100(1), 163-172. doi: 10.1530/jrf.0.1000163.
- Rho, G. J., Johnson, W. H., & Betteridge, K. J. (1998). Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae

- and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 50(6), 885-895. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00193-9.
- Rizos, D., Scully, S., Kelly, A. K., Ealy, A. D., Moros, R., Duffy, P., Al Naib, A., Forde, N., & Lonergan, P. (2012). Effects of human chorionic gonadotrophin administration on day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(3), 472-481. doi: 10.1071/rd11139.
- Rocha, J. C., Passalia, F., Matos, F. D., Maserati, M. P., Alves, M. F., de Almeida, T. G., Cardoso, B. L., Basso, A. C., & Nogueira, G. M. F. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assisted Reproduction*, 20(3), 150-158. doi: 10.5935/1518-0557.20160033.
- Rodríguez, S. J. L. (2012). Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México.
- Sakatani, M. (2017). Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 63(4), 347-352. doi: 10.1262/jrd.2017-045.
- Scaramuzzi, R. J., Campbell, B. K., Downing, J. A., Kendall, N. R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M., & Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*, 46(4), 339-354. doi: 10.1051/rnd:2006016.
- Scaramuzzi, R. J., & Radford, H. M. (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. *Reproduction*, 69(1), 353-367. doi: 10.1530/jrf.0.0690353.
- Seike, N., Sakai, M., & Kanagawa, H. (1991). Development of frozen-thawed demi-embryos and production of identical twin calves of different ages. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 53(1), 37-42. doi: 10.1292/jvms.53.37.0.
- Shelton, J. N. (1992). Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology*, 37(3), 713-721. doi: 10.1016/0093-691x(92)90150-p.
- Shelton, J. N. & Széll, A. (1988). Survival of sheep demi-embryos *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 30(5), 855-863. doi: 10.1016/s0093-691x(88)80047-5.
- Silva, C. F., Sartorelli, E. S., Castilho, A. C. S., Satrapa, R. A., Puelker, R. Z., Razza, E. M., & Barros, C. M. (2013). Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 79(2), 351-357. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.10.003.
- Skrzyszowska, M., & Smorag, Z. (1989). Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology*, 32(1), 115-122. doi: 10.1016/0093-691x(89)90527-x.

- Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 49-63. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.014.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., & Burghardt R. C. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, 128(6), 657-668. doi: 10.1530/rep.1.00398.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., & Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 65-78. doi: 10.1071/rd06102.
- Széll, A., & Hudson, R. H. (1991). Factors affecting the survival of bisected sheep embryos *in vivo*. *Theriogenology*, 36(3), 379-387. doi: 10.1016/0093-691x(91)90466-q.
- Széll, A. (1992). Embryo transfer in sheep. *Journal of the Department of Agriculture, Western Australia*, 4(33), 146-151.
- Tao, T., Reichelt, B., & Niemann, H. (1995). Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi and intact pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104(2), 251-258. doi:10.1530/jrf.0.1040251.
- Thatcher, W. W., Knickerbocker, J. J., Bartol, F. F., Bazer, F. W., Roberts, R. M., & Drost, M. (1985). Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: Endocrine aspects. *Theriogenology*, 23(1), 129-143. doi: 10.1016/0093-691x(85)90078-0.
- Trasorras, V. L., Carretero, M. I., Neild, D. M., Chaves, M. G., Giuliano, S. M., & Miragaya, M. H. (2017). Production, preservation, and transfer of South American camelid embryos. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(190), 1-14. doi: 10.3389/fvets.2017.00190.
- Téllez, R. S. (2012). Transferencia de embriones en ovejas Suffolk y Rideau Arcott en clima templado. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México.
- Udy, G. B. (1987). Commercial splitting of goat embryos. *Theriogenology*, 28(6), 837-847. doi: 10.1016/0093-691x(87)90035-5.
- Uribe-Velásquez, L. F., Restrepo-Cadavid, R., & Osorio, H. J. (2010). Cambios en la secreción de los esteroides ováricos y de la hormona luteinizante durante el ciclo estral en la oveja. Una revisión. *Biosalud*, 9(1), 64-78.
- Willadsen, S. M. (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277(5694), 298-300. doi: 10.1038/277298a0.
- Willadsen, S. M. (1989). Cloning of sheep and cow embryos. *Genome*, 31(2), 956-962. doi: 10.1139/g89-167.
- Willadsen, S. M., & Polge, C. (1981). Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Veterinary Record*, 108(10), 211-213. doi: 10.1136/vr.108.10.211.
- Wolfenson, D., & Roth, Z. (2019). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, 9(1), 32-38. doi: 10.1093/af/vfy027.
- Wood, C. (2001). Embryo splitting: a role in infertility? *Reproduction, Fertility and Development*, 13(1), 91-93. doi: 10.1071/rd00059.

- Wood, E. C., & Trounson A. (2000). Uses of embryo duplication in humans: embryology and ethics. *Human Reproduction*, 15(3), 497-501. doi: 10.1093/humrep/15.3.497.
- Yang, X., Tian, X. C., Kubota, C., Page, R., Xu, J., Cibelli, J., & Seidel, G. J. (2007). Risk assessment of meat and milk from cloned animals. *Nature Biotechnology*, 25(1), 77-83. doi: 10.1038/nbt1276.
- Zavos, P. M., Illmensee, K., Kaskar, K. (2005). Efficient blastomere biopsy for mouse embryo splitting for future applications in human assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(6), 716-725. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61690-2.
- Zijlstra, C., Kidson, A., Schoevers, E. J., Daemen, A. J. J. M., Tharasanit, T., Kuijk, E. W., & Roelen, B. A. J. (2008). Blastocyst morphology, actin cytoskeleton quality and chromosome content are correlated with embryo quality in the pig. *Theriogenology*, 70(6), 923-935. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.055.

3. TRANSFERENCIA DE DEMI-EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS *IN VIVO*: SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO FETAL

3.1 Resumen

La respuesta a programas MOET es afectado por diversos factores, entre ellos las condiciones medioambientales y en particular el estrés calórico. El estudio evaluó el efecto de dos condiciones climáticas; clima templado (CT) o clima cálido (CC) sobre la transferencia de demi-embriones producidos *in vivo* en ovejas. Se incluyeron 25 donadoras Charollais (17 en CT y 8 en CC) y se analizó tasa de ovulación (TO), tasa de recuperación embrionaria (TRE), porcentaje de embriones transferibles (ET) y porcentaje de ovocitos (OV). También se consideraron 57 receptoras de pelo (38 en CT y 19 en CC) y se evaluó porcentaje de gestación (PG), de partos (PP), de pérdidas fetales (PF), de partos gemelares (PGEM) y de sobrevivencia de demi-embriones (PDE). Todas las hembras fueron multíparas. Las ovejas se sincronizaron con esponjas conteniendo 20 mg de Acetato de Medroxyprogesterona (MAP) por 12 días, y las donadoras superovuladas con 240 mg de FSH aplicada dos veces al día por cuatro días en dosis descendente. Los estros se detectaron con macho marcador y las donadoras se inseminaron por laparoscopia con 300×10^6 espermatozoides como semen fresco. Los embriones se colectaron siete días después del estro por medios quirúrgicos. Blastocistos expandidos calidad uno, fueron divididos y transferidos en pares a receptoras. El diagnóstico de gestación se realizó 35 días después por ultrasonografía. Los resultados se analizaron con GENMOD de SAS. Solo se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre CT y CC para ET (82.93 ± 0.03 vs 32.76 ± 0.06), OV (12.20 ± 0.03 vs 67.24 ± 0.06), PP (70.37 ± 0.88 vs 38.46 ± 0.13), PF (29.63 ± 0.09 vs 61.54 ± 0.13), PGEM (29.63 ± 0.09 vs 7.69 ± 0.07) y PDE (35.53 ± 0.05 vs 15.79 ± 0.06). En conclusión, las condiciones de CC redujeron significativamente la producción y sobrevivencia de demi-embriones ovinos producidos *in vivo*.

Palabras clave: ovejas, superovulación, sobrevivencia, demi-embriones, cálido, templado.

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ana Jiménez Pérez

Director: Raymundo Rangel Santos

TRANSFER OF OVINE DEMI-EMBRYOS PRODUCED *IN VIVO*: SURVIVAL AND FETAL DEVELOPMENT

3.2 Abstract

The response to MOET program is affected by a number of factors, including environmental conditions and, in particular, heat stress. The study evaluated the effect of two climatic conditions, temperate (CT) or warm climate (CC), on the transfer of demi-embryos produced *in vivo* in sheep. In total, 25 Charollais ewes were used as donors (17 in CT and 8 in CC), and ovulation rate (TO), embryo recovery rate (TRE), percentage of transferable embryos (ET) and percentage of oocytes (OV) were analyzed. Furthermore, 57 hair type ewes were included as recipients (38 in CT and 19 in CC) and pregnancy rate (PG), lambing rate (PP), fetal losses (PF), twinning rate (PGEM), and demi-embryo survival rate (PDE) were evaluated. All females were multiparous. The ewes were synchronized with sponges containing 20 mg of Medroxyprogesterone Acetate (MAP) for 12 days, and superovulated donors with 240 mg FSH applied twice daily for four days in a descending regime. The oestruses were detected with a teaser ram, and donors were inseminated by laparoscopy with 300×10^6 spermatozoa as fresh semen. The embryos were collected seven days after oestrus by surgical procedures. Expanded quality one blastocysts were split and transferred in pairs into recipient ewes. The diagnosis of pregnancy was carried out 35 days later by ultrasonography. The results were analyzed with GENMOD of SAS. Differences ($p < 0.05$) were only found between CT and CC for ET (82.93 ± 0.03 vs 32.76 ± 0.06), OV (12.20 ± 0.03 vs 67.24 ± 0.06), PP (70.37 ± 0.88 vs 38.46 ± 0.13), PF (29.63 ± 0.09 vs 61.54 ± 0.13), PGEM (29.63 ± 0.09 vs 7.69 ± 0.07) and PDE (35.53 ± 0.05 vs 15.79 ± 0.06). In conclusion, CC conditions significantly reduced the production and survival of sheep demi-embryos produced *in vivo*.

Key words: sheep, superovulation, survival, demi-embryos, warm, temperate.

Master of Science Thesis, Graduate Program in Animal Production, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Ana Jiménez Pérez

Advisor: Raymundo Rangel Santos

3.3 Introducción

La división de mórulas y blastocistos en mitades antes de la transferencia de embriones es un procedimiento común de manipulación embrionaria aplicado a las especies de interés zootécnico (Beckett et al., 1999). La producción de embriones genéticamente idénticos se puede realizar de dos maneras: transferencia nuclear celular somática (SCNT) o división de embriones. La división de embriones imita el proceso natural que produce gemelos idénticos. Dependiendo de la etapa de desarrollo de un embrión, la división se puede realizar mediante la biopsia de blastómeros (para embriones en etapa de división) o bisección (para mórula o blastocisto) (Noli, Ogilvie, Khalaf, & Ilic, 2016).

Algunos factores que afectan la sobrevivencia de embriones divididos incluyen su calidad (De Sousa et al., 2017; Hashiyada, 2017; Lopatarova et al., 2008; Shea, 1999; Széll, MacLeod, Windsor, & Kelly, 1994), etapa de desarrollo (McEvoy & Sreenan, 1990; Shelton, 1992; Williams, Elsden, & Seidel, 1984), técnica de división (Bredbacka, 1991; Godke, Sansinena, & Youngs, 2014; Hashiyada, 2017; Hashiyada, Okada, & Imai, 2005), microinstrumento de bisección (Lopes, Forell, Oliveira, & Rodrigues, 2001; Willadsen & Godke, 1984) y experiencia del técnico (Rangel-Santos, 1991).

En general el uso de la división de embriones se justifica para producir pares de gemelos idénticos con fines de investigación (Bredbacka, Huhtinen, Aalto, & Rainio, 1992; Celi et al., 2007; Chesné, Colas, Cognié, Guérin, & Sévellec, 1987) y desde el punto de vista aplicado para incrementar al doble la producción de embriones a transferirse (Chesné et al., 1987) y en consecuencia el número de crías generadas de animales seleccionados en programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) (Wells, Thompson, Tervit, James, & Udy, 1990).

La supervivencia después de la transferencia de demi-embryones a receptoras suele ser menor en comparación con la transferencia de embriones enteros (Beckett et al., 1999), lo que podría deberse al daño fisiológico provocado al momento del corte (Dahlen, DiCostanzo, Spell, & Lamb, 2012), generando la

pérdida de viabilidad, por lo que el demi-embrión no es capaz de prevenir la regresión del CL en la hembra receptora (Beckett et al., 1999). El establecimiento de la gestación posterior a la transferencia de demi-embiones depende también en gran medida de la sincronía entre la edad o etapa embrionaria y el endometrio receptor (Schramm & Paprocki, 2004). Además, el número y la calidad de las células embrionarias influyen en su sobrevivencia (Heyman, 1985). A este respecto, la pérdida de células trofoblásticas en demi-embiones atribuida a la bisección es de 27, 33 y 65 % en blastocistos tempranos, blastocistos expandidos y demi-mórulas, respectivamente (Tao, Reichelt, & Niemann, 1995). Asimismo, Heyman (1985) indicó que posiblemente se debe a que algunos demi-embiones no contienen el suficiente número de células viables para sostener un desarrollo normal o que los demi-embiones tienen requerimientos diferentes comparados con embriones enteros.

Mantener la viabilidad de las células en los demi-embiones es vital para su sobrevivencia, por un lado, debido a que las células trofoblásticas están involucradas en el reconocimiento de la gestación (Heyman, Camous, Fèvre, Méziou, & Martal, 1984) y por otro, las células de la masa celular interna originarán al nuevo producto (Gardner, Papaioannou, & Barton, 1973). La división de embriones ha sido usada para incrementar la eficiencia en programas de MOET en ovinos generalmente mantenidos bajo condiciones de clima templado. Sin embargo, estudios donde se compare la efectividad de la técnica bajo condiciones medioambientales variables es limitada.

3.4 Objetivo

Evaluar la eficiencia de la división de embriones como parte de un programa MOET en ovinos bajo condiciones de clima templado y cálido.

3.5 Materiales y Métodos

Localización, animales y tratamientos

El experimento se realizó en dos explotaciones ovinas comerciales caracterizadas por condiciones medioambientales divergentes. Una con

condiciones de clima cálido (Iguala, Guerrero) y otra de clima templado (Singuilucan, Hidalgo).

3.5.1 Localización

La primera parte del estudio se llevó a cabo en Iguala, Guerrero. Se localiza al norte del estado de Guerrero, entre las coordenadas geográficas 18°13' y 18°27' N, y a 99°29' y 99°42' O, a una altitud de 731 m. El clima es Aw que corresponde a un clima de sabana o tropical seco, el período seco ocurre en invierno, con una temperatura media anual de 34 °C. El clima es cálido a lo largo de todo el año, superando todos los meses temperaturas máximas de 30 °C, mientras que las mínimas oscilan entre 18 °C, y una precipitación promedio anual de 1022 mm. A continuación, se muestran las temperaturas durante el año de experimento (Cuadro 1). Asimismo, una representación gráfica del comportamiento de las temperaturas máximas, mínimas y promedio (Figura 1).

Cuadro 1. Temperaturas mínimas, máximas y promedio presentadas en Singuilucan Hidalgo.

	Meses											
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Mín.	14.1	15.8	18.0	20.2	21.3	21.0	20.0	20.0	20.0	18.8	16.3	14.3
Máx.	39.0	42.5	42.5	44.0	45.0	44.0	39.5	39.5	39.5	39.0	38.0	38.0
Prom.	31.9	33.9	36.5	38.3	37.7	34.0	32.3	32.0	31.5	31.9	32.0	31.6

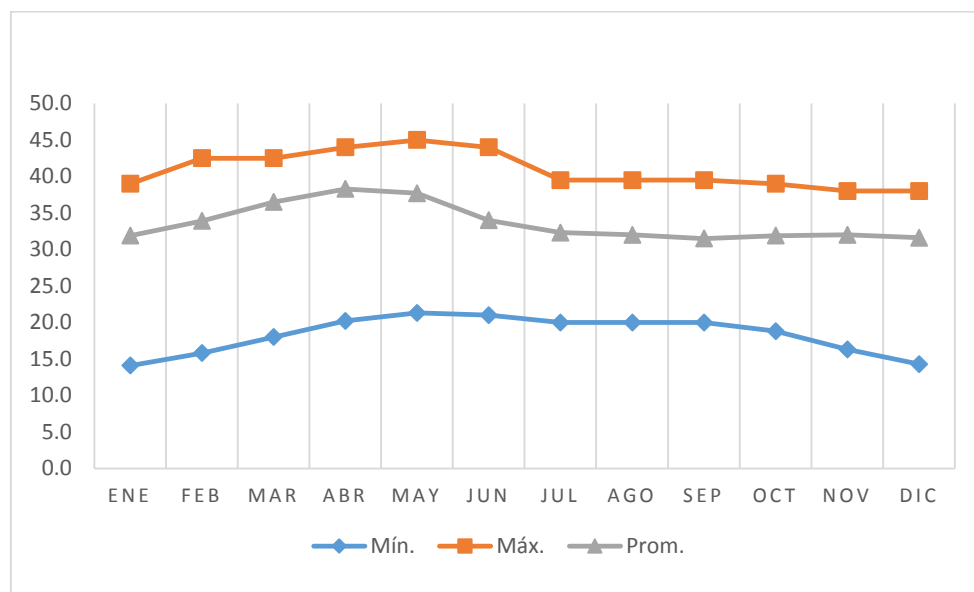


Figura 1. Temperatura máxima, mínima y promedio en Iguala, Guerrero.

La segunda parte se llevó a cabo en una explotación comercial de ovinos localizada en Singuilucan, Hidalgo entre las coordenadas 19° 52' y 20° 08' N; 98° 21' y 98° 38' O, a una altitud de 2250 m. El clima es C(w)b(i') g que corresponde a un clima templado, el más seco de los subhúmedos con lluvias en verano, poca oscilación térmica y temperatura media anual de 14 °C, presentando una temperatura mínima de 6 °C, y una precipitación promedio anual de 645 mm (García, 1997). El estudio duró ocho meses, comprendiendo de noviembre a junio. En el (Cuadro 2) se muestran las temperaturas durante el experimento, además de presentar de manera gráfica las temperaturas máximas, mínimas y promedio (Figura 2).

Cuadro 2. Temperaturas mínimas, máximas y promedio presentadas en Singuilucan Hidalgo.

	Meses											
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Mín.	2.8	3.6	5.3	7.2	8.3	8.7	8.1	8.0	8.1	6.4	4.5	3.4
Máx.	20.1	21.5	23.8	25.5	25.1	22.8	21.3	21.4	20.5	20.3	20.1	20.2
Prom.	11.5	12.4	14.6	16.2	16.6	15.7	14.6	14.6	14.3	13.3	12.4	11.7

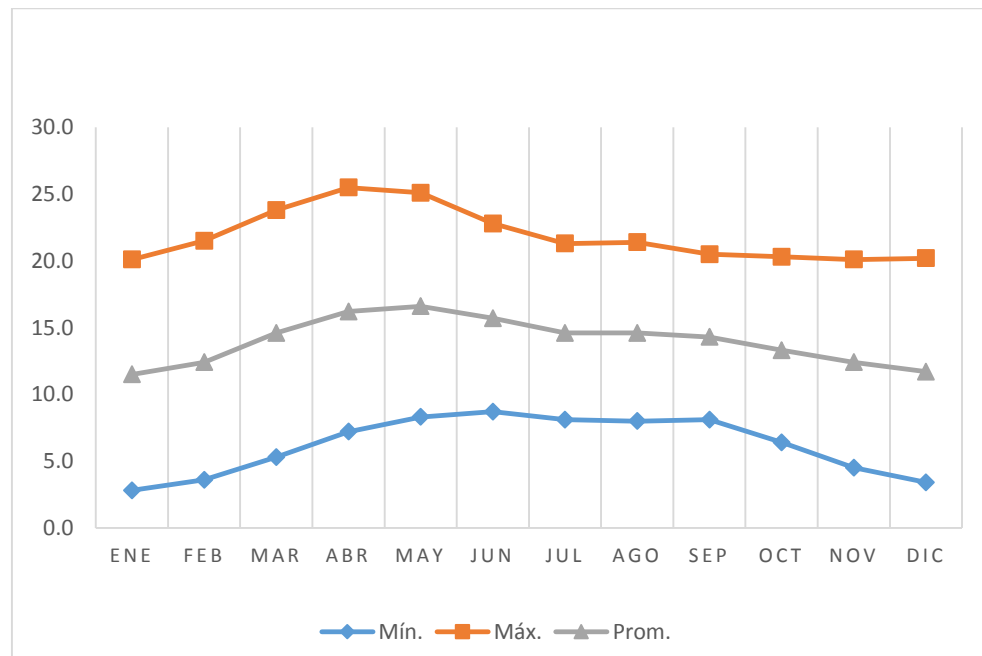


Figura 2. Temperatura máxima, mínima y promedio en Singuilucan, Hidalgo.

3.5.2 Animales

En total se utilizaron 25 ovejas multíparas de la raza Charollais como donadoras de embriones (17 en Singuilucan y ocho en Iguala) y 57 ovejas multíparas F1 (Pelibuey x Katahdin) como receptoras (38 en Singuilucan y 19 en Iguala).

Las ovejas Charollais usadas como donadoras se sincronizaron con dos esponjas intravaginales con 20 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest, Intervet, Holanda), las cuales fueron insertadas por 12 días, la primera esponja permaneció insertada los primeros seis días y la segunda el tiempo restante. En el día 9.5 se aplicaron 333 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Novormon 5000, Zoetis, México). En un intento por inducir ovulaciones múltiples se suministraron 240 mg de una fuente altamente purificada de hormona folículo estimulante (FSH; Folltropin, Vetoquinol, Canadá), la cual se aplicó en ocho inyecciones (40, 40, 40, 40, 30, 30, 10 y 10 mg), dos inyecciones diarias por cuatro días, iniciando 60 h antes de remover la esponja. Posterior al retiro de la esponja, los estros se detectaron con la ayuda de un macho marcador con mandil, iniciando a las 18 h y hasta 48 h de retirada la esponja. Una vez detectado el celo se suministraron 200 µg de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; GnRH, Sanofi, México). Todas las inyecciones se aplicaron vía intramuscular (IM). Las donadoras se inseminaron por laparoscopía (McKelvey, Robinson, & Aitken, 1985) 18 h postcelo en la parte media de ambos cuernos uterinos independientemente de la respuesta ovulatoria con 1.5 pajillas de semen fresco diluido conteniendo 100×10^6 de espermatozoides por pajilla por cuerno. Las ovejas receptoras fueron sincronizadas igual que las donadoras, pero sólo con una esponja, la cual se insertó por 12 días, además al día 10 se aplicaron 333 UI de eCG vía IM. Una vez retirada la esponja, se detectaron los estros con apoyo de un macho marcador provisto de un mandil, iniciando a las 24 h y hasta las 48 h de retirada la esponja. Se registró la hora y secuencia de estros.

3.5.3 Tratamientos

En el estudio se utilizaron dos tratamientos, que fueron las condiciones medioambientales divergentes.

T1: Transferencia de un par de demi-embriones (clima templado)

T2: Transferencia de un par de demi-embriones (clima cálido)

3.6 Procedimiento

3.6.1 Recolección de embriones

El lavado de las donadoras para obtener los embriones se realizó siete días después del estro (considerando como día cero el de inicio del estro), mediante una laparotomía medio ventral (Gibbons & Cueto, 2010) y el lavado gravitacional de los cuernos uterinos (Aké et al., 2003). El procedimiento se describe en seguida. Las donadoras seleccionadas para lavar fueron dietadas de agua y alimento por 18 h y fueron pesadas. Se aplicó vía IM 0.1 ml de Xilacina al 2 % (0.08 mg) (Procin 2 %, Pisa) por cada 10 kg de peso y después de 10 minutos se inyectó vía intravenosa 0.1 ml (10 mg) de Ketamina (Anesket, Pisa) por cada 10 kg de peso. En seguida las hembras fueron colocadas en una camilla, rasuradas y desinfectadas con alcohol al 70 %, y se ingresaron al laboratorio. Se colocaron en posición inclinada a 45° aproximadamente, se aplicaron 2.5 ml de xilocaína al 2 % en cada lado de la línea media y se introdujo aire para expandir la cavidad abdominal. En seguida se introdujo un trocar de 4 mm por el lado izquierdo y un laparoscopio de 3 mm, con el propósito de determinar la respuesta ovulatoria. Por el lado derecho se insertó un manipulador para ayudar a maniobrar los ovarios. Sólo ovejas con tasa ovulatoria ≥ 3 mm fueron lavadas. Por la misma incisión se introdujo una pinza Babcock de 5 mm para fijar el último tercio de uno de los dos cuernos uterinos. Posteriormente se realizó una incisión de aproximadamente 5 cm en la línea media, el útero fue expuesto y se fijó con una gasa estéril.

Para el lavado uterino, primero se realizó una incisión en la base del cuerno con una pinza hemostática chica, a través de la cual se colocó una sonda Foley #10, se infló el globo de la sonda con 3 a 5 cm³ de aire dependiendo del tamaño del cuerno y se confirmó que estuviera bien posicionada. En seguida se colocó un punzocat #18 aproximadamente a 1 cm de la unión útero-tubárica y se conectó una jeringa desechable con 50 ml de medio de lavado (ViGro Complete Flush Solution, Vetoquinol, Canadá). El medio se suministró en forma lenta y constante, y al mismo tiempo el cuerno fue masajeado para facilitar el flujo del medio y la

salida de los embriones. El medio se colectó en un filtro estéril con malla de 80 micras (EmCon). El procedimiento se repitió en el cuerno contrario y todo el medio colectado en el mismo filtro. Durante el procedimiento el útero se mantuvo hidratado aplicando solución salina en forma frecuente. Posteriormente se decantó 85 a 90 % del medio y el resto se utilizó para la búsqueda de los embriones, lo cual se llevó a cabo con un microscopio estereoscópico y una magnificación de 10X, y la evaluación de su etapa de desarrollo y calidad a 80X. Finalmente se identificaron los blastocistos expandidos calidad 1 factibles para dividirse.

Al terminar el lavado, el útero fue retornado a la cavidad abdominal, se introdujeron aproximadamente 100 ml de solución salina conteniendo dexametazona, heparina y antibióticos para minimizar la formación de adherencias.

3.6.2 División de embriones

Los embriones utilizados fueron producidos *in vivo*. Se incluyeron sólo blastocistos expandidos calidad uno o excelente, clasificados en función de sus características morfológicas y de acuerdo a los criterios establecidos y aceptados por la IETS (Lindner & Wright, 1983; Stringfellow & Seidel, 1990).

La división se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio invertido (TS100, Nikon, Japón), un micromanipulador mecánico (Leica, Leitz, Alemania) y una micronavaja (AB Technology, Pullman, WA) utilizando la técnica del rayado de la base de la caja de Petri (Bredbacka, 1991). Antes de iniciar el procedimiento se alinearon los equipos para nivelar la micronavaja y confirmar un ángulo y longitud de corte apropiados, así como el rayado de la caja de Petri. En seguida se tomó el embrión en aproximadamente 10 µl de medio de conservación y transferencia (Syngro Holding Media, Vetoquinol, Canadá) y se depositó en una gota de 50 µl de medio de división (ViGro Splitting Plus, Vetoquinol, Canadá), en otra caja de Petri colocada en el microscopio invertido. Esto se llevó a cabo con una magnificación de 4X. En seguida se localizó el embrión, se centró en el campo de visión y la magnificación se aumentó a 40X. Las células del trofoblasto y la masa celular interna fueron visualizadas y el embrión se alineó de tal forma que

la micronavaja partiría el embrión aproximadamente a la mitad. La micronavaja se colocó en la parte superior del embrión y con movimiento firme y descendente se cortó el embrión, en ocasiones fue necesario mover la micronavaja hacia adelante y hacia atrás para lograr un corte completo. Posterior al corte se apreció la presencia de dos mitades simétricas con una distribución uniforme de la masa celular interna (MCI) y las células del trofoectodermo (TE) entre los demi-embiones resultantes (Tao et al., 1995). En seguida se retiró la micronavaja del medio de división y los demi-embiones se removieron en 10 µl de medio de conservación y mantenidos a 35 °C por menos de 30 minutos hasta su transferencia. Los demi-embiones se transfirieron aleatoriamente en pares a cada oveja receptora.

3.6.3 Transferencia de embriones y diagnóstico de gestación

Los demi-embiones se transfirieron a las receptoras siete días después del celo por medios quirúrgicos con la ayuda de un laparoscopio de 3 mm y ángulo 0° (Storz, Alemania). El procedimiento consiste en dietar a las potenciales ovejas receptoras de agua y alimento por 18 h. Las receptoras se seleccionaron en base a su hora de celo con el fin de que coincidiera con la hora de celo de la donadora. Se aplicaron 0.5 ml vía intravenosa de 10 ml de Ketamina y 3 ml de Xilazina al 2 %. Las ovejas se colocaron en una camilla, se rasuraron y se desinfectaron con alcohol al 70 %. En seguida se aplicaron 2 ml de Xilocaína al 2 % en ambos lados de la línea media y la cavidad abdominal fue insuflada con aire. Se introdujo un trocar de 4 mm por el lado izquierdo, y en seguida el laparoscopio. Posteriormente se introdujo un manipulador por el lado derecho para confirmar la presencia de la ovulación, y la calidad de los cuerpos lúteos fue estimada en función de su tamaño y color. En la receptora seleccionada se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en el mismo sitio donde se introdujo el manipulador, a través de la cual se introdujo una pinza Babcock de 5 mm y la parte final del cuerno uterino ipsilateral al ovario donde se encontró la ovulación fue sujeta. Finalmente, el cuerno fue extraído y expuesto para ser transferido. Previo a la transferencia se realizó una incisión aproximadamente a 2 a 3 cm de la unión útero-tubárica con un alambre de acero inoxidable de 1 mm, por donde se

introdujo un capilar de vidrio unido a una manguera delgada y una jeringa de insulina, conteniendo los demi-embriones. La transferencia concluyó con la expulsión de los dos demi-embriones en el lumen del cuerno uterino. En seguida el cuerno fue retornado a la cavidad abdominal, se suturó sólo la piel, y se aplicó desinfectante y antibióticos antes de retornar las hembras a su corral.

El diagnóstico de gestación de las receptoras transferidas, dietadas de agua y alimento por 18 h se realizó 35 días posteriores a la transferencia de los demi-embriones con un equipo de ultrasonografía y un transductor transabdominal de 3.5 MHz (Aloka, ProSound 2, Japón).

3.7 Variables de respuesta

Las variables de respuesta en donadoras fueron: tasa de ovulación (TO), tasa de recuperación embrionaria (TRE), embriones transferibles (ET), porcentaje de ovocitos (OV), y las variables de respuesta en receptoras fueron porcentaje de gestación (PG), porcentaje de partos (PP), pérdidas fetales (PF), partos simples (PS), partos gemelares (PGEM) y porcentaje de sobrevivencia de demi-embriones (PDE). La TO se evaluó con el total de CL entre el total de ovejas de cada tratamiento; para TRE se realizó con el total de TRE entre el total de CL; para OV se realizó con el total de ovocitos entre el total de TRE; en PG se evaluó el total de ovejas gestantes entre el total de hembras por tratamiento; el PP se realizó con el total de ovejas paridas entre el total de ovejas gestantes; PF se realizó con el total de ovejas gestantes y la diferencia de ovejas gestantes y paridas; para PS se evaluó el total de ovejas con partos simples entre el total de ovejas gestantes; PGEM el total de partos gemelares entre el total de ovejas gestantes; y por último, PDE se analizó con el total de corderos nacidos de cada tratamiento entre el total de demi-embriones de cada tratamiento.

3.8 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, la unidad experimental fue una oveja, los tratamientos fueron las condiciones climáticas siendo clima templado y cálido, las repeticiones variaron dependiendo de la variable analizada. Los datos de las variables TRE, ET, OV, PG, PP, PF, PS, PGEM y PDE se analizaron mediante la comparación de proporciones binomiales, mientras que

TO se evaluó con una distribución de Poisson. El estadístico de prueba fue el cociente de verosimilitud y el procedimiento estadístico usado fue GENMOD, disponible en SAS (SAS, 2013).

El modelo usado fue:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

y_{ij} = variable de respuesta para el i-ésimo tratamiento y j-ésima repetición.

μ = la media poblacional.

T_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento.

ε_{ij} = efecto aleatorio del error experimental variables asumiendo distribución aleatorias normal e independiente con media cero y varianza (σ^2), con excepción para TO.

3.9 Resultados y Discusión

3.9.1 Respuesta ovulatoria y Recolección de embriones

Los resultados generales de la respuesta ovulatoria y la producción de embriones en las dos condiciones climáticas se presentan en el Cuadro 1. En total se utilizaron 25 ovejas, de las cuales 17 fueron donadoras en clima templado (CT) y 8 en clima cálido (CC).

Cuadro 3. Respuesta superovulatoria de ovejas donadoras de la raza Charollais mantenidas en condiciones de clima templado (CT) o cálido (CC).

Variables	CT	CC
Número de ovejas	17	8
Número total de CL	214	92
Estructuras recuperadas totales	123	58
Embriones transferibles totales	102	19
Ovocitos totales	15	39
Tasa de ovulación ($\bar{x} \pm EE$)	12.59±0.86 ^a	11.50±1.20 ^a
Tasa de recuperación embrionaria (% $\pm EE$)	57.48±0.03 ^a	63.04±0.05 ^a
Embriones transferibles (% $\pm EE$)	82.93±0.03 ^a	32.76±0.06 ^b
Tasa de ovocitos (% $\pm EE$)	12.20±0.03 ^a	67.24±0.06 ^b

^{a, b} Los valores con superíndice diferente en el mismo renglón difieren significativamente ($p < 0.05$).

3.9.2 Tasa de ovulación

La tasa de ovulación no fue diferente ($p > 0.05$) (Cuadro 1) entre ovejas donadoras Charollais mantenidas en CT y CC (12.59±0.86 vs 11.50±1.20). Se han reportado resultados similares por otros autores (Dobson, Fergani, Routly, & Smith, 2012; Naqvi, Maurya, Gulyani, Joshi, & Mittal, 2004; Mitchell et al., 2002; Cueto, Gibbons, Pereyra-Bonnet, Silvestre, & González-Bulnes, 2010; Luna-Palomera, Macías-Cruz, & Sánchez-Dávila, 2019; Sartori et al., 2002; Thwaites, 1967). Sin embargo, Chang, Fan, Luo, Wu y Tan (2006) encontraron mayor tasa de ovulación en cabras mantenidas en clima templado. Por otro lado, Tabarez-Rojas et al. (2009) indicaron que la exposición de ovejas superovuladas al estrés térmico puede aumentar la incidencia de regresión prematura del CL. Los resultados sugieren que el tratamiento de superestimulación podría ejercer un efecto positivo en la actividad ovárica o receptividad uterina, que podría mejorar la fertilidad, especialmente en clima cálido (Chagas-e-Silva, Lopes-da-Costa, Ciudadão, & Robalo-Silva, 2003), por lo cual, se ha sugerido que la fertilidad en el ovino podría ser afectada por el fotoperiodo y factores nutricionales que por altas temperaturas ambientales (Vicente-Pérez et al., 2020).

3.9.3 Tasa de recuperación embrionaria

La TRE no fue diferente entre ovejas mantenidas en CT y CC ($p > 0.05$) (57.48±0.03 vs 63.04±0.05). Resultados similares fueron encontrados en otros

estudios (Alliston & Ulberg, 1961; Cueto et al., 2010; Dobson et al., 2012; Mitchell et al., 2002; Luna-Palomera et al., 2019). El efecto del clima en TRE fue mínimo en este estudio. Esto se atribuye a tres razones: (1) el clima cálido no fue lo suficientemente alto para interrumpir la foliculogénesis, (2) la adaptabilidad de las ovejas, y (3) el bajo número de animales utilizados, que no permitió detectar diferencias estadísticas (Macías-Cruz et al., 2015).

3.9.4 Tasa de embriones transferibles

El porcentaje de ET fue mayor ($p<0.05$) en ovejas mantenidas en CT en comparación con las mantenidas en CC (82.93 ± 0.03 vs 32.76 ± 0.06). Los resultados de la literatura no son consistentes al respecto. Pues resultados similares fueron reportados por otros investigadores en ovinos (Cueto et al., 2010; Dutt, 1964; Naqvi et al., 2004; Wakayo, Brar, & Prabhakar, 2015) y caprinos (Chang et al., 2006). Sin embargo, Tabarez-Rojas et al. (2009) y Shi et al. (2015) no encontraron diferencias significativas. Hansen et al. (2001) y Moghaddam, Karimi y Pooyanmehr (2009) indicaron que el estrés calórico redujo el número de embriones transferibles, debido a una respuesta superovulatoria baja, afectando la tasa de fertilización y calidad embrionaria. Además, se ha encontrado reiteradamente que embriones en etapas tempranas de desarrollo son extremadamente sensibles al estrés térmico (Baruselli et al., 2020; Sartori et al., 2002).

3.9.5 Tasa de ovocitos

El porcentaje de ovocitos (OV) fue mayor ($p<0.05$) en ovejas mantenidas en CC comparado con CT (67.24 ± 0.06 vs 12.20 ± 0.03). Resultados similares fueron reportados por Cueto et al. (2010), Ju (2005), Mitchell et al. (2002), Shi et al. (2015), y van Wettere et al. (2021). El mismo efecto se encontró en vacas (Wolfenson & Roth, 2018), donde los ovocitos recolectados expuestos a estrés térmico tuvieron menor potencial para desarrollar embriones viables (Al-Katanani, Paula-Lopez, & Hansen, 2002; Roth & Hansen, 2004). La tasa de fertilización después de la inseminación artificial (IA) es afectada por el estrés calórico (Hansen et al., 2001). Los efectos observados están relacionados con los

ovocitos (Mellado et al., 2013), pues se ha encontrado una relación positiva entre el tamaño de folículos >3 mm (Mitchell et al., 2002) y el éxito de fertilización cuando se presenta un diámetro de ovocitos >150 μm (Shi et al., 2015). Por tanto, el estrés térmico en el período de crecimiento folicular compromete la viabilidad del ovocito (Tabarez-Rojas et al., 2009; Takahashi, 2011), ya sea por acciones directas de la temperatura elevada en el ovocito o por alteraciones en la función folicular que podrían comprometer su calidad (Khan et al., 2020; Hooda, Singh, Kundu, & Vaidya, 2011).

3.9.6 Sobrevivencia de demi-embriones

Los resultados generales de la sobrevivencia de los demi-embriones ovinos transferidos en las dos condiciones climáticas se presentan en el Cuadro 2. En total se transfirieron 57 ovejas, de las cuales 38 fueron receptoras mantenidas en clima templado (CT) y 19 en clima cálido (CC).

Cuadro 4. Sobrevivencia *in vivo* de demi-embriones de ovejas Charollais mantenidas bajo condiciones de clima templado (CT) o clima cálido (CC).

Variables	CT	CC
Ovejas transferidas	38	19
Embriones enteros	38	19
Embriones divididos	76	38
Ovejas gestantes	27	13
Tasa de gestación (% $\pm$ EE)	71.05 $\pm$ 0.07 ^a	68.42 $\pm$ 0.10 ^a
Ovejas paridas	19	5
Tasa de partos (% $\pm$ EE)	70.37 $\pm$ 0.88 ^a	38.46 $\pm$ 0.13 ^b
Tasa de pérdidas fetales (% $\pm$ EE)	29.63 $\pm$ 0.09 ^a	61.54 $\pm$ 0.13 ^b
Partos simples	11	4
Tasa de partos simples (% $\pm$ EE)	40.74 $\pm$ 0.09 ^a	30.77 $\pm$ 0.13 ^a
Partos dobles	8	1
Tasa de gemelos idénticos (% $\pm$ EE)	29.63 $\pm$ 0.09 ^a	7.69 $\pm$ 0.07 ^b
Total de corderos	27	6
Tasa de sobrevivencia de demi-embriones (% $\pm$ EE)	35.53 $\pm$ 0.05 ^a	15.79 $\pm$ 0.06 ^b
Tasa de sobrevivencia como embrión entero (% $\pm$ EE)	71.05 $\pm$ 0.07 ^a	31.58 $\pm$ 0.11 ^b

^{a, b} Los valores con superíndice diferente en el mismo renglón difieren significativamente ($p < 0.05$).

3.9.7 Tasa de gestación

El número de embriones transferidos puede ser aumentado por bisección de embriones, seleccionando hembras de alto valor genético y fenotípico (Széll, 1992). La supervivencia después de la transferencia de demi-embiones en receptoras suele ser menor comparado con embriones enteros (Beckett et al., 1999; Ozil, Heyman, & Renard, 1982; Tsunoda, Tokunaga, Sugie, & Katsumata, 1985; Vivanco, Rangel, & Lynch, 1991; Willadsen, 1980; Williams et al., 1984), lo cual podría deberse al número y la calidad de las células embrionarias transferidas (Heyman, 1985), no siendo capaz de prevenir la regresión del CL (Beckett et al., 1999).

En el presente estudio el diagnóstico de gestación se llevó a cabo 35 días después de la transferencia. El porcentaje de gestación fue similar ($p>0.05$) en ovejas mantenidas bajo condiciones de clima templado y clima cálido (71.05 ± 0.07 vs 68.42 ± 0.10). Resultados similares fueron reportados en otros estudios (Gimenez, 2012), sin embargo, en bovinos Correa-Calderón et al. (2019) encontraron mayor ($p<0.05$) porcentaje de gestación en novillas Holstein en el día 35 post-IA, favoreciendo el clima templado (65.0 vs 37.5 %).

3.9.8 Tasa de partos

En general el porcentaje de partos puede ser afectado por diversos factores que finalmente generan condiciones de estrés en los animales. Entre ellos se incluyen factores asociados a la hembra, el macho y factores del medio ambiente, principalmente altas temperaturas y humedad. Además, Ramón (1997) menciona que la exposición de animales a condiciones de estrés por frío, lluvia, calor o manejo reduce la sobrevivencia de embriones en las primeras tres semanas de gestación.

En el presente estudio el porcentaje de partos fue inferior ($p<0.05$) en las ovejas mantenidas en CC comparadas con las ovejas mantenidas en CT (70.37 ± 0.88 vs 38.46 ± 0.13), lo cual indica la presencia de un alto porcentaje de pérdidas embrionarias y fetales. Lo anterior posiblemente se debe a un efecto negativo de

altas temperaturas y alto contenido de humedad (Hartley, Alexander, & Edwards, 1974).

Resultados altos de pérdidas embrionarias en ovinos (15 a 30 %) fueron reportados en varios estudios (Edey, 1969, 1976; Fernández-Abella, Castells, Piaggio, & Deleon, 2006; Fernández-Abella et al., 2007; Fernández-Abella, Folena, Formoso, & Irabuena 2008a; Fernández-Abella et al., 2008b; Fernández-Abella, 2011; Wilkins & Croker, 1990), pero valores alrededor de 50 % también han sido encontrados (Chagas-e-Silva et al., 2003; Kleemann et al., 1990; Restall, Brown, Blockey, Cahill, & Kearins, 1976; Shi et al., 2015). Exposición de ovejas preñadas bajo estrés calórico durante los primeros 50 a 100 días o de los 100 a 150 días causa un severo retraso en el crecimiento de los corderos (Edwards, Saunders, & Shiota, 2003), provocando microencefalia y lesiones de cavitación del cerebro (Hartley et al., 1974). Pérdidas embrionarias similares se encontraron en otros estudios (Fernández-Abella, 2011; Gustafsson, 1985; Roche, Boland, & McGeady, 1981), quienes reportaron 30 a 40 % de pérdidas embrionarias en vaquillas.

Ramón, Villalvazo, Cervera, Domínguez y Quintal (2012) indicaron una reducción de 20 a 40 % en la tasa de gestación del día 17 al 45 en ovejas receptoras Katahdin que recibieron demi-embriones en estadio de mórula. Los autores asociaron los resultados a pérdidas embrionarias posiblemente ocasionadas por condiciones estresantes de altas temperaturas y alto contenido de humedad. Aunque el hecho de haber usado mórulas pudo estar asociado con la baja tasa de gestación.

Altas temperaturas afectan negativamente la maduración del ovocito (Moor & Crosby, 1985), proceso de implantación y desarrollo del embrión (Dutt, 1964; Lindsay, Knight, Smith, & Oldham, 1975), siendo los embriones más sensibles al estrés calórico durante sus primeros tres días de vida (Dunlap & Vincent, 1971; Ealy, Drost, & Hansen, 1993; Rutledge, 2001). Temperaturas superiores a 32 °C durante el empadre aumentaron la tasa de retorno al celo y redujeron la fertilidad, probablemente aumento en la incidencia de pérdidas embrionarias (Kleemann &

Walker, 2005). Asimismo, exposición a altas temperaturas por al menos una semana o más tiempo genera pérdidas embrionarias tardías (Smith, Bell, & de Chaneet, 1966).

El efecto negativo del estrés térmico también se manifiesta en los machos. Carneros expuestos a altas temperaturas y humedad elevadas generan anomalías espermáticas que en consecuencia aumentan la mortalidad embrionaria. En varios estudios se ha demostrado que el espermatozoides sometido a temperaturas elevadas pierde la capacidad de fecundar y generar un embrión viable (Rathore, 1968, 1970; Waites, Ortavant, Bure, & Cornu, 1968).

El estadio de desarrollo del embrión afecta su capacidad de sobrevivencia. En este sentido, los resultados de la literatura muestran menor sobrevivencia de mórulas comparativamente con blastocistos tempranos (McEvoy & Sreenan, 1990; Wells et al., 1990; Williams et al., 1984;), blastocistos expandidos (Arave, Bunsch, Mickelsen, & Warnick, 1987; Rangel-Santos, 1991) e incluso blastocistos eclosionados (Chesné et al., 1987; Rangel-Santos, 1991). Por otro lado, en otros estudios se ha demostrado un aumento en la tasa de gestación conforme la edad de los embriones avanza (Dunlap & Vincent, 1971; Ealy et al., 1993; Kippax, Christie, & Rowan, 1991; Marquez & Hidalgo, 1978; Maurer, 1988; Williams et al., 1984).

El efecto adverso de estrés calórico sobre la fertilidad de hembras parece ser generalizado, una vez que dicho efecto también ha sido reportado en ovinos (Dutt, 1964), cerdos (Tompkins, Heidenreich, & Stob, 1967) y conejos (Wolfenson & Blum, 1988).

3.9.9 Tasa de pérdidas fetales

El porcentaje de pérdidas fetales fue mayor ($p < 0.05$) en el grupo de ovejas mantenidas en CC en comparación con las ovejas que permanecieron en CT (61.54 ± 0.13 vs 29.63 ± 0.09). Los resultados son considerablemente de mayor magnitud principalmente en el grupo de ovejas mantenidas en CC en comparación con reportes de la literatura, donde las pérdidas durante la etapa fetal fluctúan entre 2 y 3 % (Nicoll, Dodds, & Alderton, 1999; Smith, Kleemann, &

Grimson, 1988; Wilkins et al., 1984; Wilkins & Croker, 1990) y en otros estudios hasta 5 a 7 % (Edey, 1969, 1976; Fernández-Abella et al., 2006, 2007, 2008a, 2008b; Wilkins & Croker, 1990). Dahlen et al. (2012) reportaron mayores pérdidas embrionarias o fetales desde el día 33 hasta el nacimiento en vaquillas que recibieron demi-embriones en comparación con vaquillas transferidas con embriones enteros, lo cual fue asociado con la concentración de P₄. Las mayores pérdidas se encontraron en vaquillas con <1 ng ml⁻¹ en comparación con vaquillas con concentraciones >3 ng ml⁻¹. Dichas concentraciones de P₄ fueron asociadas con la presencia de un CL (Daly, Smith, McGrice, Kind, & van Wettere, 2020). Aumentos significativos de P₄ también se alcanzan al inducir la formación de CLs mediante la aplicación de hCG (Torres, Chagas e Silva, Diniz, & Lopes-da-Costa, 2013).

Las altas tasas de pérdidas fetales en el estudio posiblemente están asociadas no sólo al efecto del clima directamente, sino también a otros factores de manejo. Condiciones estresantes por estrés calórico han sido relacionadas con modificaciones en la producción de tiroxina y factores de crecimiento similar a insulina (McGuire et al., 1991), P₄ (Rosenberg, Herz, Davidson, & Folman, 1977), estrógenos y gonadotropinas (Gilad, Meidan, Berman, Graber, & Wolfenson, 1993).

3.9.10 Tasa de gemelos idénticos

En ambos lugares se registró la incidencia de partos gemelares. Sin embargo, el porcentaje de gemelos idénticos fue mayor ($p < 0.05$) en hembras mantenidas en CT en comparación con las de CC (29.63 ± 0.09 vs 7.69 ± 0.07). Los reportes de la literatura al transferir demi-embriones ovinos o caprinos mencionan resultados considerablemente variables. Algunos autores reportan porcentajes más bajos (12.8 %; Udy, 1987), en otros se han encontrado resultados similares (25-33.3 %; Shelton & Szell, 1988), no obstante, en algunos estudios se indican resultados considerablemente mayores (37.5-77.8 %; Chesné et al., 1987; Gatica, Boland, Crosby, & Gordon, 1984; Széll & Hudson, 1991; Ramón et al., 2012). En bovinos

también se han reportado porcentajes de gemelos idénticos similares (Ozil et al., 1982; Ozil, 1983).

3.9.11 Tasa de sobrevivencia de demi-embriones

El porcentaje de sobrevivencia de demi-embriones fue mayor ($p<0.05$) en ovejas en CT comparadas con las de CC (35.53 ± 0.05 vs 15.79 ± 0.06). El primer estudio (Trounson & Moore, 1974) donde se usó la división de embriones para producir crías no tuvo éxito. Sin embargo, en estudios posteriores las metodologías de división fueron mejoradas y en consecuencia la eficiencia de la técnica. En el presente estudio, el 72 % de sobrevivencia obtenido en el grupo de ovejas mantenidas en CT es superior al 38.5 a 55 % reportado en varios estudios (Ramón et al., 2012; Shelton & Szell, 1988). No obstante resultados superiores (80 a 94 %) se han encontrados en otros estudios (Gatica et al., 1984; Vivanco et al., 1991; Vivanco & Greaney, 1992). Porcentajes de sobrevivencia incluso mayores (97.1 %) fueron reportados por Vivanco y Greaney (1992), además en otros estudios (Chesné et al., 1987; Széll & Hudson, 1991; Vivanco et al., 1991) han reportado porcentajes incluso superiores al 100 % de sobrevivencia de los demi-embriones (número de fetos generados entre el número de embriones enteros originales). En un estudio realizado por Rangel-Santos (1991) no se encontraron diferencias en sobrevivencia entre demi-embriones de diferentes razas de ovinos (Gotland y Finnish Texel vs Danish Texel y Finnish Texel), y no hubo diferencias en la sobrevivencia de demi-embriones obtenidos de donadoras de 24 y 10 meses de edad.

3.10 Eficiencia general

Los procedimientos actuales de bisección de embriones han mostrado su potencial. La bisección de embriones también se ha implementado con éxito en otras especies de mamíferos de interés zootécnico incluyendo bovinos (Arave et al., 1987), cabras (Tsunoda et al., 1985), cerdos (Reichelt & Niemann, 1994) y caballos (da Silveira et al., 2005). La bipartición ocasiona un daño fisiológico a las células (Dahlen et al., 2012), ocasionando un efecto mayor en las células de la masa celular interna que son las que dan origen propiamente al nuevo producto

(Gardner et al., 1973) y menor sobrevivencia, por lo que es importante minimizar el daño del embrión y mantener el número de células intactas al momento del corte, con el fin de producir demi-embryones con mayor potencial de desarrollo (Hashiyada, 2017). La aplicación de la técnica puede aumentar la eficiencia de programas MOET a nivel comercial en un 20 a 30 %, no obstante, su uso es considerablemente limitado. Las causas pueden incluir la variabilidad de resultados, el costo de los equipos y el deficiente dominio de la técnica. La disponibilidad de embriones de excelente calidad y su capacidad de sobrevivencia como demi-embryones representa la oportunidad para que la división de embriones fuera realizada en forma rutinaria en programas MOET a nivel comercial (Vivanco et al., 1991).

3.11 Conclusión

Las condiciones de clima cálido redujeron significativamente la producción y sobrevivencia de demi-embryones ovinos.

3.12 Recomendación

Con base en los resultados del estudio, se recomienda la bisección de embriones bajo condiciones de clima templado, debido que aumenta el número de embriones transferibles de alto valor genético, obteniendo mayor porcentaje de partos, y crías nacidas, siendo positivo este efecto para el productor.

3.13 Literatura citada

- Aké, L. J. R., Heredia y Aguilar, M., Gamboa, M. A., Castro, F. C., & Rodríguez, O. R. (2003). Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. *Veterinaria México*, 34(3), 225-233. doi: 10.21753/vmoa.34.003.92.
- Alliston, C. W., & Ulberg, L. C. (1961). Early pregnancy loss in sheep at ambient temperatures of 70° and 90° F as determined by embryo transfer. *Journal of Animal Science*, 20(3), 608-613. doi: 10.2527/jas1961.203608x.
- Al-Katanani, Y. M., Paula-Lopez, F. F., & Hansen, P. J. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 390-396. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(02)74086-1.
- Arave, C. W., Bunsch, T. D., Mickelsen, C. H., & Warnick, H. (1987). Factors affecting survivability of transferred whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology*, 28(3), 373-382. doi: 10.1016/0093-691x(87)90025-2.
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Vieira, L. M., Souza, A. H., Bó, G. A., & Rodrigues, C. A. (2020). Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*, 155(10), 1-11. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.028.
- Beckett, D. M., Oppenheim, S. M., Moyer, A. L., Bondurant, R. H., Rowe, J. D., & Anderson, G. B. (1999). Progestin implants can rescue demi-embryo pregnancies in goats: a case study. *Theriogenology*, 51(8), 1505-1511. doi: 10.1016/S0093-691x(99)00093-X.
- Bredbacka, P. (1991). Biopsy of morulae and blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals*, 26(2), 82-84. doi: 10.1111/j.1439-0531.1991.tb01520.x.
- Bredbacka, P., Huhtinen, M., Aalto, J., & Rainio, V. (1992). Viability of bovine demi- and quarter-embryos after transfer. *Theriogenology*, 38(1), 107-113. doi: 10.1016/0093-691x(92)90222-d.
- Celi, P., Walkden-Brown, S. W., Blache, D., Széll, A. Z., Wilkinson, H. M., & Martin, G. B. (2007). Twin efficiency for reproductive variables in monozygotic twin sheep. *Theriogenology*, 68(4), 663-672. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.056.
- Chagas-e-Silva, J., Lopes-da-Costa, L., Cidadão, R., & Robalo-Silva, J. (2003). Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology*, 60(3), 521-532. doi: 10.1016/s0093-691x(03)00045-1.
- Chang, Z., Fan, X., Luo, M., Wu, Z., & Tan, J. (2006). Factors affecting superovulation and embryo transfer in Boer goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(3), 341-346. doi: 10.5713/ajas.2006.341.
- Chesné, P., Colas, G., Cognié, Y., Guérin, Y., & Sévellec, C. (1987). Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology*, 27(5), 751-757. doi: 10.1016/0093-691x(87)90297-4.

- Correa-Calderón, A., Angulo-Valenzuela, I., Betancourth, F., Oroz-Rojo, F., Fierros-Castro, K., Macías-Cruz, U., Díaz-Molina, R., & Avendaño-Reyes, L. (2019). Conception rate following artificial insemination with sexed semen in Holstein heifers under artificial cooling during summer compared with winter season. *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 203-209. doi: 10.1007/s11250-019-01998-9.
- Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Silvestre, P., & González-Bulnes, A. (2010). Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in fine-wool Merinos maintained under field conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(5), 770-775. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01738.x.
- Dahlen, C. R., DiCostanzo, A., Spell, A. R., & Lamb, G. C. (2012). Use of embryo transfer seven days after artificial insemination or transferring identical demi-embryos to increase twinning in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 90(13), 4823-4832. doi: 10.2527/jas.2011-4778.
- Daly, J., Smith, H., McGrice, H. A., Kind, K. L., & van Wettere, W. H. E. J. (2020). Towards improving the outcomes of assisted reproductive technologies of cattle and sheep, with particular focus on recipient management. *Animals*, 10(2), 293-307. doi: 10.3390/ani10020293.
- da Silveira, L. L., de Souza, R. V., Sousa, M. N. S., Gelson, P. T., McManus, C., & Rumpf, R. (2005). A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferencia de embriões eqüinos. *Ciência Rural, Santa Maria*, 35(2), 412-416. doi: 10.1590/S0103-84782005000200026.
- De Sousa, R. V., da Silva Cardoso, C. R., Butzke, G., Dode, M. A. N., Rumpf, R., & Franco, M. M. (2017). Biopsy of bovine embryos produced in vivo and *in vitro* does not affect pregnancy rates. *Theriogenology*, 90(3), 25-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.003.
- Dobson, H., Fergani, C., Routly, J. E., & Smith, R. F. (2012). Effects of stress on reproduction in ewes. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 135-140. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.006.
- Dunlap, S. E., & Vincent, C. K. (1971). Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 32(6), 1216-1218. doi: 10.2527/jas1971.3261216x.
- Dutt, R. H. (1964). Detrimental effects of high ambient temperature on fertility and early embryo survival in sheep. *International Journal of Biometeorology*, 8(1), 47-56. doi: 10.1007/bf02186927.
- Ealy, A. D., Drost, M., & Hansen, P. J. (1993). Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 2899-2905. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77629-8.
- Edey, T. N. (1969). Prenatal mortality in sheep. A review. *Animal Breeding Abstracts*, 37(2), 173-190.
- Edey, T. N. (1976). Embryo mortality in sheep breeding. In: *Sheep Breeding*. Proceedings International Congress Muresk, (pp. 400).
- Edwards, M. J., Saunders, R. D., & Shiota, K. (2003). Effects of heat on embryos and fetuses. *International Journal of Hyperthermia*, 19(3), 295-324. doi: 10.1080/0265673021000039628.

- Fernández-Abella, D. (2011). Pérdidas embrionarias y fetales en ovinos en Uruguay. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría, 8-10 de junio de 2011. Paysandú, Uruguay. Pp. 1-18.
- Fernández-Abella, D., Castells, D., Piaggio, L., & Deleon, N. (2006). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. I. Efecto de distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y fecundidad. *Producción Ovina*, 18, 25-31.
- Fernández-Abella, D., Formoso, D., Goicoechea, I., Locatelli, A., Scarlato, S., Ibañez, W., & Irabuena, O. (2007). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. III. Efecto de la asignación de forraje y de un estrés pluviométrico artificial sobre la tasa ovulatoria y pérdidas reproductivas en ovejas Corriedale. *Producción Ovina*, 19, 15-23.
- Fernández-Abella, D., Folena, G., Formoso, D., & Irabuena, O. (2008a). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. IV. Efecto del estrés pluviométrico artificial y natural sobre la actividad ovárica y las pérdidas reproductivas. *Producción Ovina*, 20, 21-29.
- Fernández-Abella D., Formoso, D., Aguerre, J.J., Buzoni, G., Galli, C., Varela, J.P., Hernández, Z., & Fernández, S. (2008b). Efecto del tipo y la oferta de forraje y carga parasitaria previo al servicio sobre la tasa ovulatoria y fecundidad de ovejas Corriedale. *Producción Ovina*, 20, 31-40.
- García, E. (1997). *Cartas de Climas, escala 1: 1, 000,000 según el Sistema de Köppen* Modificado por García. 23 de agosto de 2016 de CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>. Consultado el 19 de abril de 2021.
- Gardner, R. L., Papaioannou, V. E., & Barton, S. C. (1973). Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 30(3), 561-572.
- Gatica, R., Boland, M. P. Crosby, T. F., & Gordon, I. (1984). Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology*, 21(4), 555-560. doi: 10.1016/0093-691X(84)90440-0.
- Gibbons, A. E., & Cueto, M. I. (2010). Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Área de investigación en producción animal grupo de reproducción. INTA EEA Bariloche Centro Regional Patagonia Norte. 38 P.
- Gilad, E., Meidan, R., Berman, A., Graber, Y., & Wolfenson, D. (1993). Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(2), 315-321. doi: 10.1530/jrf.0.0990315.
- Gimenez, D. C. A. (2012). Evaluation of recipient and embryo factors on success of inter-breed embryo transfer in sheep. Doctoral dissertation. University of Sassari, Sassari, Italy.
- Godke, R. A., Sansinena, M., & Youngs, C. R. (2014). Assisted reproductive technologies and embryo culture methods for farm animals. (Third Edition). In Laboratory Handbook (Ed.), *Transgenic Animal Technology* (pp.581-638). doi: 10.1016/B978-0-12-410490-7.00022-0

- Gustafsson, H. (1985). Characteristics of embryos from repeat breeder and virgen heifers. *Theriogenology*, 23(3), 487-498. doi: 10.1016/0093-691X(85)90021-4.
- Hansen, P. J., Drost, M., Rivera, R. M., Paula-Lopes, F. F., Al-Katanani, Y. M., Krininger, C. E., & Chase, C. C. (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55(1), 91-103. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00448-9.
- Hartley, W. J., Alexander, G., & Edwards, M. J. (1974). Brain cavitation and micrencephaly in lambs exposed to prenatal hyperthermia. *Teratology*, 9(3), 299-303. doi: 10.1002/tera.1420090309.
- Hashiyada, Y. (2017). The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *Journal of Reproduction and Development*, 63(6), 527-538. doi: 10.1262/jrd.2017-096.
- Hashiyada, Y., Okada, M., & Imai, K. (2005). Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo-cultured *in vitro*-fertilized embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 51(6), 749-756. doi: 10.1262/jrd.17032.
- Heyman, Y. (1985). Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23(1), 63-75. doi: 10.1016/0093-691X(85)90073-1.
- Heyman, Y., Camous, S., Fèvre, J., Méziou, W., & Martal, J (1984). Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(2), 533-540. doi: 10.1530/jrf.0.0700533.
- Hooda, O. K., Singh, S. V., Kundu, S. S., & Vaidya, M. M. (2011). Follicular dynamics its regulation and heat stress effects on folliculogenesis: A review. *Wayamba Journal of Animal Science*, ISSN: 2012-578X, 103-106.
- Ju, J. C. (2005). Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. *Animal Reproduction*, 2(2), 79-90.
- Khan, A., Dou, J., Wang, Y., Jiang, X., Khan, M. Z., Luo, H., Usman T., & Zhu, H. (2020). Evaluation of heat stress effects on cellular and transcriptional adaptation of bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 25. doi: 10.1186/s40104-019-0408-8.
- Kippax, I. S., Christie, W. B., & Rowan, T. G. (1991). Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on fetal survival in comercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology*, 35(1), 25-35. doi: 10.1016/0093-691X(91)90145-4.
- Kleemann, D. O., Walker, S. K., Walkley, J. R. W., Smith, D. H., Grimson, R. J., & Seamark, R. F. (1990). Fertilization and embryo loss in Booroola Merino × South Australian Merino ewes: Effect of the F gene. *Theriogenology*, 33(2), 487-498. doi: 10.1016/0093-691X(90)90506-O.
- Kleemann, D. W., & Walker, S. K. (2005). Fertility in South Australian comercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. *Theriogenology*, 63(9), 2416-2433. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.052.
- Lindner, G., & Wright, R.W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407-416. doi: 10.1016/0093-691X(83)90201-7.

- Lindsay, D. R., Knight, T. W., Smith, J. F., & Oldham, C. M. (1975). Studies in ovine fertility in agricultural regions of Western Australia: ovulation rate, fertility and lamb performance. *Australian Journal of Agricultural Research*, 26(1), 189-198. doi: 10.1071/AR9750189.
- Lopatarova, M., Cech, S., Krontorad, P., Holy, L., Hlavicova, J., & Dolezel, R. (2008). Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. *Veterinární Medicína*, 53(11), 595-603. doi: 10.17221/1864-vetmed.
- Lopes, R. F. F., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2001). Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 56(9), 1383-1392. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00641-0.
- Luna-Palomera, C., Macías-Cruz, U., & Sánchez-Dávila, F. (2019). Superovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes treated with FSH or FSH plus eCG during non-breeding season. *Tropical Animal Health and Production*, 51(5), 1283-1288. doi: 10.1007/s11250-019-01801-9.
- Macías-Cruz, U., Gastélum, M. A., Álvarez, F. D., Correa, A., Díaz, R., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., & Avendaño-Reyes, L. (2015). Effects of summer heat stress on physiological variables, ovulation and progesterone secretion in Pelibuey ewes under natural outdoor conditions in an arid region. *Animal Science Journal*, 87(3), 354-360. doi: 10.1111/asj.12430.
- Marquez, G. C., & Hidalgo, M. A. (1978). Efecto de la temperatura y evaporación ambiental sobre la concepción en vacas Holstein in la Chontalpa Tabasco. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Maurer, R. P. (1988). Embryo splitting and transfer in sheep. [Abstract]. *Theriogenology*, 29 (1), 276. doi: 10.1016/0093-691x(88)90104-5.
- McEvoy, T. G., & Sreenan, J. M. (1990). Effect of embryo quality and stage of development on the survival zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology*, 33(6), 1245-1253. doi: 10.1016/0093-691X(90)90042-R.
- McGuire, M. A., Beede, D. K., Collier, R. J., Buonomo, F. C., DeLorenzo, M. A., Wilcox, C. J., Huntington, G. B., & Reynolds, C. K. (1991). Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *Journal of Animal Science*, 69(5), 2050-2056. doi: 10.2527/1991.6952050x.
- McKelvey, W., Robinson, J., & Aitken, R. (1985). The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24(5), 519-535. doi: 10.1016/0093-691x(85)90059-7.
- Mellado, M., Sepulveda, E., Macias-Cruz, U., Avendaño, L., Garcia, J. E., Veliz, F. G., & Rodríguez, A. (2013). Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 265-269. doi: 10.1007/s11250-013-0470-8.
- Mitchell, L. M., Dingwall, W. S., Mylne, M. J. A., Hunton, J., Matthews, K., Gebbie, F. E., McCalluma, G. J., & McEvoy, T. G. (2002). Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in

- superovulated ewes. *Animal Reproduction Science*, 74(3-4), 163-174. doi: 10.1016/s0378-4320(02)00190-2.
- Moghaddam, A., Karimi, I., & Pooyanmehr, M. (2009). Effects of short-term cooling on pregnancy rate of dairy heifers under summer heat stress. *Veterinary Research Communications*, 33(6), 567-575. doi: 10.1007/s11259-009-9205-8.
- Moor, R. M., & Crosby, I. M. (1985). Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75(2), 467-473. doi: 10.1530/jrf.0.0750467.
- Naqvi, S. M. K., Maurya, V. P., Gulyani, R., Joshi, A., & Mittal, J. P. (2004). The effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Ruminant Research*, 55(1-3), 57-63. doi: 10.1016/j.smallrumres.2004.02.009.
- Nicoll, G. B., Dodds, K. G., & Alderton, M. J. (1999). Field data analysis of lamb survival and mortality rates occurring between pregnancy scanning and weaning. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 59, 98-100.
- Noli, L., Ogilvie, C., Khalaf, Y., & Ilic, D. (2016). Potential of human twin embryos generated by embryo splitting in assisted reproduction and research. *Human Reproduction Update*, 23(2), 156-165. doi: 10.1093/humupd/dmw041.
- Ozil, J. P., Heyman, Y., & Renard, J. P. (1982). Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *The Veterinary Record*, 110(6), 126-127. doi: 10.1136/vr.110.6.126.
- Ozil, J. P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69(2), 463-468. doi: 10.1530/jrf.0.0690463.
- Ramón, J. P. (1997). Factores de mortalidad embrionaria en ovejas. *Agrociencia*, 31, 113-120.
- Ramón, U. J., Villalvazo, M. V., Cervera, P. D., Domínguez, R. A., & Quintal, F. J. (2012). Bisection and embryo transfer in hair sheep. *Biotechnology Summit*, 138-142. Yucatán, México.
- Rangel-Santos, R. (1991). Investigations into procedures for the implementation of a multiple ovulation and embryo transfer scheme using ewe lambs. Doctoral dissertation. Massey University, New Zealand.
- Rathore, A. K. (1968). Effects of high temperature on sperm morphology and subsequent fertility in Merino sheep. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 7, 270-274.
- Rathore, A. K. (1970). Fertility of rams heated for 1, 2, 3, and 4 days mated to superovulated ewes. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(2), 355-358. doi: 10.1071/AR9700355.
- Reichelt, B., & Niemann, H. (1994). Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(1), 163-172. doi: 10.1530/jrf.0.1000163.
- Restall, B. J., Brown, G. H., Blockey, M. de B., Cahill, L., & Kearins, R. (1976). Assessment of reproductive wastage in sheep. 1. Fertilization failure and

- early embryonic survival. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 16, 329-335. doi: 10.1071/EA9760329.
- Roche, J. F., Boland, M. P., & McGeady, T. A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *The Veterinary Record*, 109(18), 401-404. doi: 10.1136/vr.109.18.401.
- Rosenberg, M., Herz, A., Davidson, M., & Folman, Y. (1977). Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 51(2), 363-367. doi: 10.1530/jrf.0.0510363.
- Roth, Z., & Hansen, P. J. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, 71(6), 1898-1906. doi: 10.1095/biolreprod.104.031690.
- Rutledge, J. J. (2001). Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, 55(1), 105-111. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00449-0.
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2803-2812. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1.
- SAS Institute Inc. (2013). SAS/STAT 9.4 User's Guide. Cary, N. C. USA: SAS Institute.
- Schramm, R. D., & Paprocki, A. M. (2004). Strategies for the production of genetically identical monkeys by embryo splitting. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 38-42. doi: 10.1186/1477-7827-2-38.
- Shea, B. F. (1999). Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*, 51(4), 841-854. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00030-8.
- Shelton, J. N. (1992). Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology*, 37(3), 713-721. doi: 10.1016/0093-691X(92)90150-P.
- Shelton, J. N., & Szell, A. (1988). Survival of sheep demi-embryos *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 30(5), 855-863. doi: 10.1016/S0093-691X(88)80047-5.
- Shi, J. M., Yi, J. Y., Tian, X. Z., Wang, F., Lian, Z. X., Han, H. B., Fu, J. C., Lv, W. F., & Liu, G. S. (2015). Effects of seasonal changes on the ovulation rate and embryo quality in superovulated Black Suffolk ewes. *Neuro Endocrinology Letters*, 36(4), 330-336.
- Smith, I. D., Bell, G. H., & de Chaneet, G. (1966). Embryonic mortality in Merino ewes exposed to high ambient temperatures. *Australian Veterinary Journal*, 42(12), 468-470. doi: 10.1111/j.1751-0813.1966.tb14478.x.
- Smith, D. H., Kleemann, D. O., & Grimson, R. J. (1988). Litter size determination in high fecundity Merino flocks: a comparison of real-time ultrasound imaging with twice-daily observations of lambing. [Abstract]. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 17, 468.

- Stringfellow, D. A., & Seidel, G. (1990). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 2nd ed. USA, Champaign. pp. 79. International Embryo Technology Society, 19.
- Széll, A. (1992). Embryo transfer in sheep. *Journal of the Department of Agriculture, Western Australia*, 33(4), 146-151.
- Széll, A., & Hudson, R. H. H. (1991). Factors affecting the survival of bisected sheep embryos in vivo. *Theriogenology*, 36(3), 379-387. doi: 10.1016/0093-691x(91)90466-q.
- Széll, A., MacLeod, I. M., Windsor, D. P., & Kelly, R. W. (1994). Production of identical twin lambs by embryo splitting. *Theriogenology*, 41(8), 1643-1652. doi: 10.1016/0093-691x(94)90829-8.
- Tabarez-Rojas, A., Porras-Almeraya, A., Vaquera-Huerta, H., Hernández-Ignacio, J., Valencia, J., Rojas-Maya, S., & Hernández-Cerón, J. (2009). Desarrollo embrionario en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. *Agrociencia*, 43(7), 671-680.
- Takahashi, M. (2011). Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, 11(1), 37-47. doi: 10.1007/s12522-011-0105-6.
- Tao, T., Reichelt, B., & Niemann, H. (1995). Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi- and intact pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104(2), 251-258. doi: 10.1530/jrf.0.1040251.
- Téllez, R. S. (2012). Transferencia de embriones en ovejas Suffolk y Rideau Arcott en clima templado. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Thwaites, C. J. (1967). Embryo mortality in the heat stressed ewe. I. The influence of breed. *Reproduction*, 14(1), 5-14. doi: 10.1530/jrf.0.0140005.
- Tompkins, E. C., Heidenreich, C. J., & Stob, M. (1967). Effect of post-breeding thermal stress on embryonic mortality in swine. *Journal of Animal Science*, 26(2), 377-380. doi: 10.2527/jas1967.262377x.
- Torres, A., Chagas e Silva, J., Diniz, P., & Lopes-da-Costa, L. (2013). Evaluation of treatments with hCG and carprofen at embryo transfer in a demi-embryo and recipient virgin heifer model. *Animal*, 7(8), 1317-1322. doi: 10.1017/s1751731113000426.
- Trounson, A. O., & Moore, N. W. (1974). Attempts to produce identical offspring in the sheep by mechanical division of the ovum. *Australian Journal of Biological Sciences*, 27(5), 505-510.
- Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Sugie, T., & Katsumata, M. (1985). Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goat. *Theriogenology*, 24(3), 337-343. doi: 10.1016/0093-691X(85)90225-0.
- Udy, G. B. (1987). Commercial splitting of goat embryos. *Theriogenology*, 28(6), 837-847. doi: 10.1016/0093-691X(87)90035-5.
- van Wettere, W. H. E. J., Kind, K. L., Gatford, K. L. Swinbourne, M. A., Leu, T. S., Hayman, T. P., Kelly, M. J., Weaver, C. A., Kleemann, O. D., & Walker, K. S. (2021). Review of the impact of heat stress on reproductive performance of sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 26-43. doi: 10.1186/s40104-020-00537-z.

- Vicente-Pérez, R., Macías-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L., Correa-Calderón, A., López-Baca, M. A., & Lara-Rivera A. L. (2020). Heat stress impacts in hair sheep production. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 205-222. doi: 10.22319/rmcp.v11i1.4923.
- Vivanco, H. W., Rangel, R., & Lynch, P. (1991). Large scale commercial application of bisection of sheep embryos. [Abstract]. *Theriogenology*, 35(1), 292.
- Vivanco, H. W., & Greaney, K. B. (1992). Comparison of survival of bisected and whole sheep embryos transferred in-season and out of season. [Abstract]. *Theriogenology*, 37(1), 316.
- Wakayo, B. U., Brar, P. S., & Prabhakar, S. (2015). Review on mechanisms of dairy summer infertility and implications for hormonal intervention. *Open Veterinary Journal*, 5(1), 6-10.
- Waites, G. M. H., Ortavant, R., Bure, A., & Cornu, C. (1968). Effets précoces d'une brève élévation de la température testiculaire sur la spermatogenèse du bélier. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 8(3), 323-331. doi: 10.1051/rnd:19680301.
- Wells, D. G., Thompson, J. G. E., Tervit, H. R., James, R. W., & Udy, G. B. (1990). Experiences in the application of embryo bisection in sheep MOET programmes. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 50(1), 431-435.
- Willadsen, S. M. (1980). The viability of early cleavage stages containing half of the normal number of blastomeres in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59(2), 357-362. doi: 10.1530/jrf.0.0590357.
- Willadsen, S. M., & Godke, R. A. (1984). A simple procedure for the production of identical sheep twins. *The Veterinary Record*, 114(10), 240-243. doi: 10.1136/vr.114.10.240.
- Williams, T. J., Elsdon, R. P., & Seidel, G. E. (1984). Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22(5), 521-531. doi: 10.1016/0093-691x(84)90051-7.
- Wilkins, J. F., & Croker, K. P. (1990). Embryonic wastage in ewes. In: Addham, C. M., Martin, G. B., & Purvis, I. W. (Eds) *Reproductive Physiology of Merino Sheep: concepts and consequences* (pp. 13: 169-177). School of Agriculture, University of Western Australia.
- Wilkins, J. F., Fowler, D. G., Bindon, B. M., Piper, L. R., Hall, D. G., & Fogarty, N. M. (1984). Measuring fetal loss with real-time scanning. [Abstract]. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 15, 768.
- Wolfenson, D., & Blum, O. (1988). Embryonic development, conception rate, ovarian function and structure in pregnant rabbits heat-stressed before or during implantation. *Animal Reproduction Science*, 17(3-4), 259-270. doi: 10.1016/0378-4320(88)90063-2.
- Wolfenson, D., & Roth, Z. (2018). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, 9(1), 32-38. doi: 10.1093/af/vfy027.