



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**RESPUESTA INMUNE, TASA OVULATORIA Y CALIDAD DE EMBRIONES EN
OVEJAS PELIBUEY Y BLACK BELLY TRATADAS CON VACUNAS DE ADN
CONTRA INHIBINA**

Tesis

Que para obtener el título de

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

Sonia Tinal Ortiz

Lorena Patricia García Soberano

ASESOR

Dr. Carlos Luna Palomera

M.C. Jorge Alonso Peralta Torres

Villahermosa Tabasco



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

"2014, Conmemoración del 150 Aniversario de
la Gesta Heroica del 27 de febrero de 1864"



5 junio de 2014

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT
PRESENTE.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del (la) interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) C. Sonia Tinal Ortiz, con matrícula 081C7004, egresado(a) de la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis** Titulado: **"Respuesta inmune, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly tratadas con vacunas de ADN contra inhibina)".**

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente
Alumno.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

DIVISIÓN ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

"2014, Conmemoración del 150 Aniversario de
la Gesta Heroica del 27 de febrero de 1864"



5 junio de 2014

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT
PRESENTE.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del (la) interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) C. Lorena Patricia García Soberano, con matrícula 08207183, egresado(a) de la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis** Titulado: **"Respuesta inmune, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly tratadas con vacunas de ADN contra inhibina)".**

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR

DIVISIÓN
CIENCIAS

C.c.p.- Expediente

Consortio de
Universidades
Mexicanas

Carretera Villahermosa-Teapa Km. 25 R/A La Huasteca 2° Sección Villahermosa,
Tabasco

C.P. 86280 Tel. (993) 358-15-85, 142-91-51 Ext. 6608

E-mail: direccion.daca@ujat.mx

docencia.daca@ujat.mx

CARTA DE AUTORIZACION

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada **"Respuesta inmune, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly tratadas con vacunas de ADN contra inhibina"** de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 5 días del mes de Julio del año 2014.

AUTORIZO



Sonia Tinal Ortiz

CARTA DE AUTORIZACION

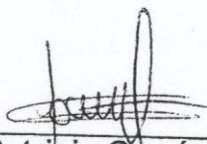
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada **"Respuesta inmune, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly tratadas con vacunas de ADN contra inhibina"** de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 5 días del mes de Julio del año 2014.

AUTORIZO



Lorena Patricia García Soberano

DEDICATORIA:

SONIA

A Dios:

Por concederme salud, guiarme hacia las oportunidades y ayudarme a tomar decisiones. Por darme fuerzas para seguir adelante con dedicación y amor hacia mi profesión.

A mis padres:

Gracias por traerme al mundo, hacerme una mujer de bien con principios y valores pero sobre todo por la más valiosa herencia que me dejan, que es la oportunidad de forjar mi camino en esta carrera. A mi padre por tantos años de trabajo para poder pagar los estudios de sus cuatro hijos ahora ya profesionales y sobre todo a mi madre que es una mujer ejemplar que con dedicación, amor y FE nunca se dejó vencer y ante toda adversidad salió adelante dándonos el ejemplo de una entrañable fortaleza y que no hay amor más grande que el de los padres a sus hijos.

A mis sobrinos:

Daniel, Valeria, Jaasiel y Alejandro; porque desde que llegaron han sido una motivación, porque no hay nada más hermoso que el saber que me aman tanto como yo a ustedes.

AGRADECIMIENTOS:

SONIA

A mis hermanos:

Alejandro; gracias por ser un excelente ejemplo de hermano mayor, enseñarme a que las cosas no son fáciles que siempre hay que esforzarse para alcanzar las metas, gracias por confiar en que lo lograría y por sentirte orgulloso de mí, gracias por estar siempre para cuando más lo he necesitado.

Conrado; por enseñarme a ser fuerte y defender lo que creemos, por tus consejos, por tu ejemplo de paciencia, por dejarme ser una gran tía amorosa y consentidora y chiquearme como tikitita.

Sofía; por confiar siempre en mí, demostrar ser la mejor hermana; gracias por ser un gran ejemplo de sabiduría, por alentarme a tomar retos, por compartir sueños y ahora por enseñarme a que las metas son cada vez mas difíciles pero aun así arriesgarse a lograrlas.

A mis cuñadas y cuñado:

Gracias por estar siempre al pendiente, por el apoyo cuando los he necesitado, y por la confianza que me han brindado.

A mis amigas:

Bety; por cinco años que compartimos durante la carrera, porque me brindaste tu amistad incondicional, tu apoyo cuando lo necesite, pero más que nada por creer en esta amistad sin dejar que nadie la manche ¡Te quiero mucho amiga!

Lore; por compartir este proyecto, por ser ejemplo de bondad, por regalarme años de amistad, por tu apoyo y confianza, por darte cuenta y preocuparte de cuando algo me está afectando, escucharme y buscar que vuelva a sonreír. ¡Te quiero mucho!

Jaqui; gracias por años de amistad, por confiar en mí, por tu buen humor que alegra a cualquiera, por esos momentos familiares, por tu cercanía cuando estuve lejos haciendo que esta amistad creciera más, pero sobre todo por creer en que esta amistad será por siempre. ¡Te quiero mucho!

A mi asesor de tesis, Dr. Carlos Luna Palomera:

Por su paciencia, tiempo, confianza y más que nada por la oportunidad que nos brindó para permitirnos sacar adelante este proyecto.

A la MC. Claudia Virginia Zaragoza Vera:

Por brindarme sus conocimientos, por su apoyo durante todo este tiempo, por los ánimos que nos daba, y por estar al pendiente. ¡Por sus chiqueos; gracias la quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

LORENA

Gracias Dios por dar sentido a mi vida, por mi hermosa familia, por poner a lo largo de mis años personas que han se han convertido en más que conocidos.

Gracias mami por siempre dar lo mejor de ti, por tu fuerza y coraje. Eres una excelente madre, me sienta tan orgullosa de saber que eres una mujer forjada de valores, este logro es de las dos. Espero poder seguir tu ejemplo, por lo pronto hemos llegado a una de nuestras metas. Te amo mami.

Gracias hermanita por tu apoyo durante esta etapa, y a lo largo de mi vida llenándola de incontables historias, sé que puedo contar contigo siempre. Te amo.

Gracias abuelito por incontables muestras de amor y por tus consejo.

Gracias tía Leo y Toño los tíos consentidos, ejemplos de perseverancia, gracias por todos los momentos de alegrías a su lado.

Gracias a toda mi familia porque sé que siempre estarán para mí en las buenas y malas superando cualquier obstáculo y celebrando los momentos felices. Por siempre contar con su apoyo, los amo.

Amigas estos últimos años han sido los mejores, gracias por tantas risas e historias, aunque con personalidades diferentes una de otra, no ha sido obstáculo para que sigamos siendo amigas. Las quiero mucho Beti, Jaqui y Soni.

Gracias maestros por su enseñanza tanto en el salón de clases como en la escuela de la vida.

Dr. Carlos Luna Palomera. Gracias por la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

MC Claudia Virginia Zaragoza Vera. Gracias por su apoyo y amistad.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de Cuadros	viii
Índice de Figuras	ix
Resumen	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	3
1.2. Objetivo General	3
1.3. Objetivos Específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Ciclo estral de la oveja	4
2.1.2. Fase folicular	4
2.1.3. Fase lútea	5
2.2. Métodos de sincronización de estro	6
2.2.1. Prostaglandinas	7
2.2.2. Progestágenos	7
2.2.3. Dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR-G)	8
2.3. Superovulación	8
2.3.1. Superovulación con FSH	9
2.3.2. Estimulación del crecimiento folicular mediante el uso de eCG	9
2.3.3. Ovulación inducida mediante la administración de GnRH	10
2.4. Inmunización contra inhibinas	11
2.4.1. Inmunización con fluido folicular purificados conteniendo inhibina	12
2.4.2. Péptidos sintéticos	13
2.4.3. Inhibina recombinante	14
2.5. Vacunas de ADN para inmunización contra INHA	16

2.6. Método de medición de anticuerpos contra inhibina	17
2.7. Método de colecta de embriones	17
2.8. Elección de donantes	18
2.9. Evaluación de embriones	18
2.10. Transferencia de embriones	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Ubicación geográfica	20
3.2. Animales y Manejo	20
3.3. Construcción de vacunas en pCINeo y purificación del plásmido	20
3.4. Diseño de Tratamientos	21
3.5 Determinación de anticuerpos por ELISA	22
3.6. Determinación de la tasa de ovulación, numero y calidad de embriones	24
3.7. Variable a evaluar y análisis estadístico	25
4. RESULTADOS	
4.1. Determinación de anticuerpos contra INHA	26
4.2. Conducta estral	26
4.3. Tasa de ovulación, desarrollo y calidad embrionaria	27
5. DISCUSIÓN	
5.1. Determinación de anticuerpos contra INHA	31
5.2. Conducta estral	33
5.3. Tasa de ovulación, desarrollo y calidad de embriones	34

6. CONCLUSIONES

6. LITERATURA CITADA

37

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Títulos de anticuerpos en ovejas inmunizadas contra inhibina en diluciones dobles seriadas, utilizando como antígeno inhibina recombinante.	26
Cuadro 2. Media $\pm$ DE del inicio y duración del estro, y tasa ovulatoria en ovejas de pelo tratadas con una vacuna de ADN contra inhibina o FSH.	28
Cuadro 3. Distribución del estro a las 24, 48 y >48 hrs pos retiro del CIDR	29
Cuadro 4. Grado de desarrollo de embriones de ovejas tratadas con vacunas de ADN contra INHA.	29
Cuadro 5. Calidad de embriones de ovejas tratadas con vacunas de ADN contra INHA.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo estral de la oveja	6
Figura 2. Esquema de construcciones de vacunas de ADN expresando la cadena α de inhibina (165-300) con los epitopos del toxoide tetánico P2 y P30.	20
Figura 3. Calendario de manejo reproductivo de ovejas e inmunización contra Inhibina	21

RESUMEN

Evaluar la respuesta inmune, la conducta estral, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly inmunizada con tres vacunas de ADN contra inhibina. Se emplearon 40 ovejas de pelo (Pelibuey y Black Belly) primarias de 12 meses de edad, condición corporal (CC) de 3.0 y 25 kg de peso promedio. El primer grupo (INHA 1, n=10) recibió I.M. una inmunización y dos refuerzos con 100 µg del ADN de plásmido con el péptido maduro de inhibina. El segundo grupo (INHA 2, n=10) recibió I.M. una inmunización y dos refuerzos con 100 µg del ADN de plásmido con el péptido maduro de inhibina y el epítipo del toxoide tetánico P2. El tercer grupo (INHA 3, n=10) recibió I.M. una inmunización y dos refuerzos con 100 µg del ADN de plásmido con el péptido maduro de inhibina y los epítipos del toxoide tetánico P2 y P30. Se tomó una muestra de suero de todas las ovejas al inicio de los tratamientos y posteriormente cada 14 días y 14 días posteriores a la aplicación del último refuerzo para la cuantificación de anticuerpos por ELISA. Las ovejas del grupo control (PBS, n=10) recibieron el mismo volumen de PBS. A todas las ovejas se le sincronizó el estro 14 días posterior al segundo refuerzo mediante un dispositivo intravaginal (CIDR-G) el cual fue removido 13 días después a las 06:00 h, y se aplicó I.M. 100 UI oveja⁻¹ de gonadotropina coriónica equina (eCG). Posterior al retiro del CIDR, se monitoreó la presentación de estros dos veces al día (día 15, 7:00 a.m. y 6:00 p.m.) se dio dos servicios con un carnero fértil a intervalo de 12 h, se registró el día y hora del estro. El día siete posterior al servicio por laparotomía media ventral se evaluó la tasa ovulatoria por conteo del número de cuerpos lúteos (CL's), se realizó el lavado de los cuernos uterinos para la recuperación de embriones y evaluación de sus grados de desarrollo y calidad. Se realizó la cuantificación de anticuerpo mediante estadística descriptiva. Se realizó análisis de varianza para comparar la conducta estral, la tasa ovulatoria entre ovejas inmunizadas contra INHA 1, 2 y 3, y las ovejas control. No se detectaron anticuerpos contra INHA. El comportamiento estral, en las variables de mayor relevancia, fue similar. La tasa de ovulación, calidad y grado de desarrollo fue similar entre tratamientos. No se logró inducir anticuerpos y ovulación múltiple con las vacunas de ADN contra INHA.

Palabras claves. Superovulación, vacunas de ADN, inhibina.

1. Introducción

Los protocolos tradicionales de ovulación múltiple y transferencia de embriones (OMTE) en ovejas, vacas y otros mamíferos incluyen el uso solo o combinado de factores liberadores de gonadotropinas (GnRH), y estimuladores de las gonadotropinas (FSH, hCG y eCG) con respuestas ováricas y calidad embrionaria satisfactorias (Benyei *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2007; Forcada *et al.*, 2011).

En la actualidad la mayoría de los tratamientos son efectuados con FSH debido a los mejores resultados obtenidos en la tasa de ovulación como en la calidad de los embriones que utilizando eCG (Garzón *et al.*, 2007). Pero su aplicación pueden representar más del 50% de los costos de producción de un embrión (Bolívar *et al.*, 2008) e incrementarse fuertemente dependiendo del éxito reproductivo (Ruvuna *et al.*, 1992).

Sin embargo también se han explorado otras alternativas dentro de las que se incluyen la inmunización contra Inhibina fue identificado por primera vez como una hormona gonadal que inhibe potentemente la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) de la glándula pituitaria.

Las inhibinas son hormonas polipeptídicas dimericas y pertenecen a la superfamilia de factor- β de crecimiento transformante (TGF- β) (Chang *et al.*, 2002). La inhibina A (INHA) modula la producción de FSH de la pituitaria, la maduración folicular y esteroidogénesis (Knight 1996; de Kretser *et al.* 2002). La INHA disminuye el número de receptores de GnRH en las células de la pituitaria en cultivo, y por tanto los receptores de GnRH *in vivo* (Wang *et al.*, 1991).

Por tanto, existe una relación negativa entre las concentraciones de FSH en plasma y la inhibina, lo cual se ha comprobado en varias especies de mamíferos; Sasaki *et al.* 2006). El número de folículos que se desarrollan a tamaño ovulatorio depende tanto de la cantidad de FSH y el tiempo de exposición a la FSH (Sasaki *et al.*, 2006). La liberación de FSH por la hipófisis es a su vez controlada por la acción sinérgica de los folículos ovulatorios, inhibina y estradiol (Sasaki *et al.*, 2006).

En experimentos donde se ha inmunoneutralizado la inhibina endógena se ha encontrado un incremento significativo de los niveles de FSH, lo cual brinda evidencia que la inhibina es un factor importante en la regulación inhibitoria de la secreción de FSH en animales domésticos y de laboratorio (*Sasaki et al., 2006*), y que es imposible incrementar los niveles de FSH endógena y obtener ovulaciones múltiples a través de la inmunoneutralización de la inhibina.

El estudio del control de la inhibina sobre la secreción de FSH y la foliculogénesis inicialmente se ha hecho a partir de la administración de preparaciones de fluido folicular (FF) como fuente no purificada de inhibina en ovinos, porcinos y bovinos en estudios *in vitro* e *in vivo* (*Robertson et al., 1985; Forage et al., 1986, de Kretser y Robertson, 1989*). Sin embargo, estas preparaciones también cuentan con la presencia además de inhibina de otros péptidos tales como activina y follistatina (*de Kretser y Robertson, 1989*), lo cual ha generado respuestas variables; además, el proceso de purificación es laborioso, se necesitan grandes cantidades de fluido folicular y equipamiento muy especializado, lo que hace difícil su producción a grandes escalas.

Se han empleado inmunógenos desarrollados con base en péptidos sintéticos a partir de secuencias cortas N-terminal de la subunidad α de la inhibina bovina, porcina, ovina y humana, conjugada con proteínas capaces de mejorar la respuesta inmune (altos títulos de anticuerpos) con muy buenas respuestas en el incremento en los niveles de FSH y la tasa ovulatoria (entre 150 y 330%) en ovejas y cabras (*Wrathal et al., 1992; Tannetta et al., 1998; D'Alessandro et al., 1999; Medan et al., 2003*), vacas (*Glencross et al., 1994; Morris et al., 1995; Medan et al., 2006*), cerdas (*King et al., 1993*), entre otros; sin embargo, su disponibilidad es limitada debido a que la respuesta es variable y deben ser sintetizados artificialmente.

Otra alternativa exitosa es la generación de proteínas recombinantes a través de la clonación de fragmentos cortos N-terminal o la secuencia completa del péptido maduro (165-300 aa) de la subunidad α de inhibina en vectores de expresión. Los resultados muestran producción de anticuerpos e incrementos en los niveles de FSH y tasa de ovulación de 135 a 300% en ovinos (*Forage et al., 1987; Padilla et*

al., 2007), bovinos (Medan *et al.*, 2004) y porcinos (Brown *et al.*, 1990). La respuesta a la inmunización contra la inhibina en ratas, bovinos, porcinos, ovinos, cabras, yeguas entre otros, se ha logrado, incrementando significativamente los niveles de FSH y la tasa de ovulación. Debido a la naturaleza de la síntesis del péptido recombinante su forma biológica se asemeja más a la nativa, pero no adquiere la estructura conformacional postraducciona (Mao *et al.*, 2003), lo cual limita la aplicación de la inhibina como inmunógeno.

Actualmente las vacunas de ADN son producidas como estrategias en inmunoterapia específica en tratamientos de diversas enfermedades (Bonura y Colombo, 2011; Lee *et al.*, 2011), para dirigir respuestas inmune contra componentes proteicos de agentes infecciosos (Lodmell *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2000) o péptidos como el fragmento 1-32 del péptido maduro de inhibina (Han *et al.*, 2008). Las vacunas de ADN son relativamente fáciles de construir con gran potencial de producir una fuerte respuesta inmune humoral y celular (Garmory *et al.*, 2005).

1.1. Hipótesis. Al menos una de las vacunas de ADN contra inhibina producirá respuesta inmune incrementando la tasa ovulatoria en ovejas sin afectar la conducta estral y calidad de los embriones.

1.2. Objetivo General. Evaluar la respuesta inmune, la conducta estral, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly inmunizada con tres vacunas de ADN contra inhibina.

1.3. Objetivos específicos.

1. Evaluar la respuesta inmune y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey y Black Belly inmunizadas con tres vacuna de ADN contra inhibina.
2. Evaluar la conducta estral en ovejas Pelibuey y Black Belly inmunizadas con tres vacunas de ADN contra inhibina
3. Evaluar la calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly inmunizadas con tres vacuna de ADN contra inhibina.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Ciclo estral de la oveja

Es el periodo comprendido entre dos ovulaciones consecutivas (Ávila, 2004). Se regula de manera directa por la acción de hormona del ovario y de forma indirecta por otras secretadas por el lóbulo anterior de la hipófisis (Frandsen, 1995).

Se han identificado dos fases durante el ciclo estral en las hembras ovinas. Una fase lútea desde el segundo hasta el día 13, y una fase folicular, comprendiendo el día 14 hasta el primer día. En la fase folicular la mayoría de los animales domésticos presentan un patrón de ondas durante el ciclo estral. Una onda folicular es caracterizada por el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos, uno (o un número especie-específico) de ellos continúa creciendo (folículo dominante) mientras los otros regresan por inhibición de su desarrollo. La duración media del ciclo estral es de 16.5 ± 0.2 a 17.8 ± 0.2 días, siendo más corto en corderas comparado con las ovejas adultas deslanadas, con una duración de 16.8 y 17.2 días, respectivamente (Uribe *et al.*, 2009).

Para que se realice el ciclo estral se requiere de la interacción de las hormonas que se producen en el hipotálamo, lóbulo anterior de la hipófisis, las gónadas y el útero. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la que promueve la secreción de las hormonas folículo estimulante y luteinizante (LH) del lóbulo anterior de la hipófisis (Ávila, 2004). Estas actúan sobre las gónadas para que se realice el crecimiento folicular y la ovulación.

2.1.1. Fase folicular

El crecimiento folicular se encuentra bajo el control de las dos gonadotropinas liberadas en la hipófisis, llamada hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). La FSH estimula el crecimiento temprano de los folículos y la LH es necesaria para completar las últimas fases del crecimiento. Los folículos de Graaf producen cantidades, relativamente grandes de estrógenos, al principio el nivel relativamente bajo de estrógenos en la sangre

actúa en la hipófisis teniendo un efecto inhibitorio sobre la secreción de gonadotropinas. (Mata, 2010).

Esto colabora para evitar un estímulo excesivo a los ovarios. Sin embargo, cuando el nivel de estrógenos es lo suficientemente alto se dispara la oleada de LH que produce cambios en la pared del folículo que a su vez, conducen a la ruptura y liberación del folículo. La oleada de LH también es la responsable de la maduración meiótica del ovocito, es decir, la conversión de un ovocito primario en ovocito secundario.

Los estrógenos circulantes en el torrente sanguíneo durante la fase folicular son los responsables de la inducción del comportamiento estral en las hembras. El nivel de estrógenos en la sangre se eleva y alcanza el máximo justamente antes de la aparición del estro. La oleada preovulatoria de LH ocurre al principio del estro, siguiendo, a las 18 a 24 horas, la ovulación.

Además de los estrógenos, el folículo que madura produce la hormona inhibina que selectivamente inhibe la secreción de FSH por parte de la hipófisis. Al limitar la secreción de FSH, la inhibina evita el crecimiento folicular adicional cuando existen folículos de Graff con lo que se limita el ritmo de la ovulación (Mata, 2010).

2.1.2. Fase lútea

La fase lútea caracterizada por la formación de un cuerpo lúteo que secreta progesterona (Mc Cracken *et al.*, 1999), regula en forma determinante la duración del ciclo estral y es esencial para el mantenimiento de la gestación (Webb *et al.*, 2002). El cuerpo lúteo se encuentra presente en el ovario en la etapa del diestro; en las ovejas no gestantes sufre regresión entre los 14 ó 15 días después de la presentación del estro a consecuencia de la secreción episódica de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada por el útero durante la luteolisis la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es secretada en series de alta amplitud en respuesta a los picos de secreción lútea de oxitocina (Kim *et al.*, 2003).

El conocimiento del desarrollo folicular y de las complejas interrelaciones endocrinas que lo controlan, permiten diseñar herramientas biotecnológicas que mejoren el desempeño reproductivo y el rendimiento productivo de las explotaciones ovinas.

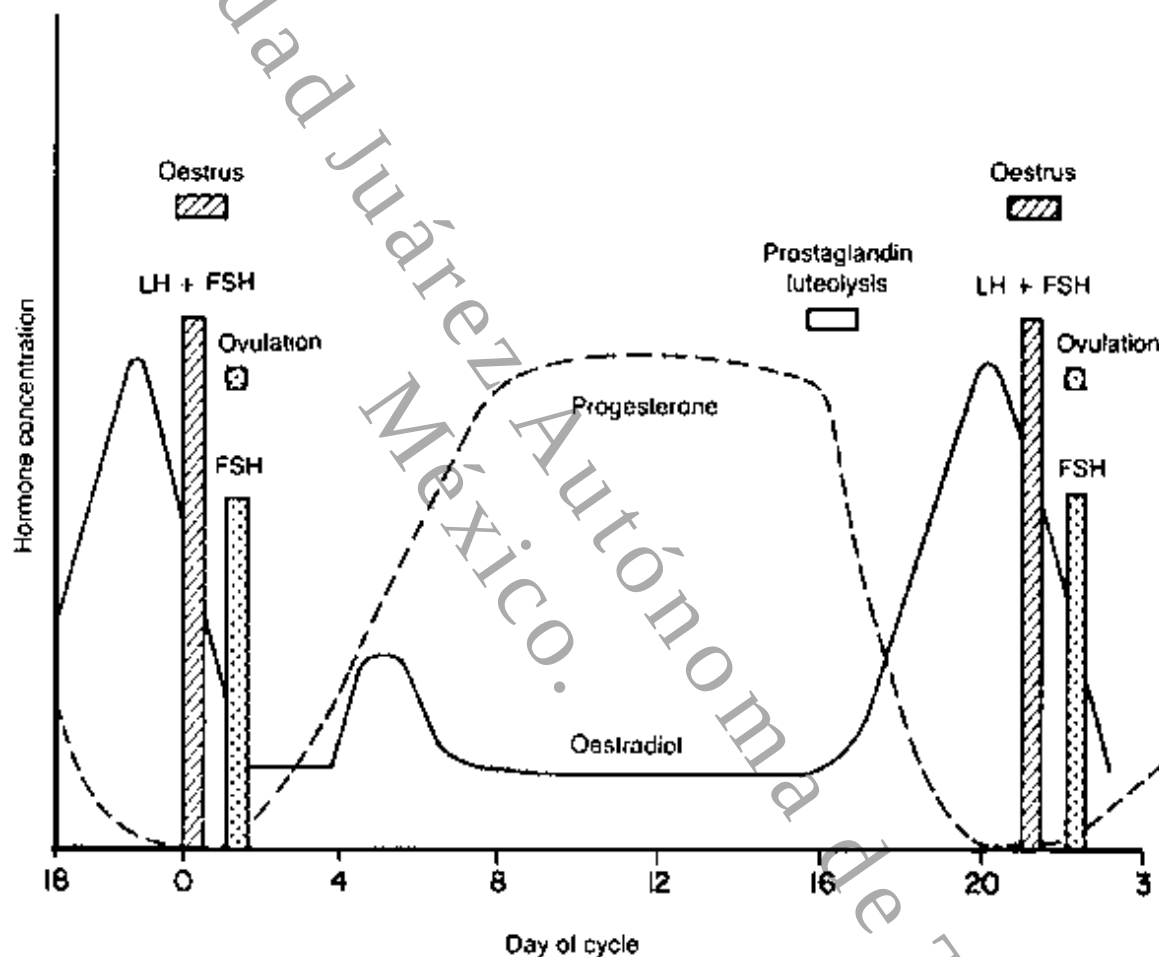


Figura 1. Ciclo estral de la oveja

2.2. Métodos de sincronización de estro

Los métodos de sincronización de celos se clasifican de acuerdo a la utilización o no de algún tipo de droga en: farmacológicos o naturales. El método de sincronización a utilizar depende de la época del año, raza, localización

geográfica, manejo, nutrición y condiciones climáticas así como el costo y grado de sincronización requerido (Ávila, 2004).

2.2.1. Prostaglandinas

Son ácidos grasos hidroxiinsaturados de 20 carbonos con un anillo ciclopentano. El ácido araquidónico es el precursor de las prostaglandinas relacionadas con la reproducción, PGF_{2α} y PGE₂. Transportadas por la sangre hasta el órgano blanco, la PGF_{2α} es el agente luteolítico natural que finaliza la fase lútea del ciclo estral y permite el inicio de un nuevo ciclo estral. Se pueden considerar como hormonas que regulan varios fenómenos fisiológicos y farmacológicos, como la contracción del músculo liso en los aparatos gastrointestinal y reproductivo, la erección, eyaculación, transporte de espermatozoides, la ovulación, formación del CL, el parto y la eyección de leche (Ortega, 2006).

2.2.2. Progestágenos

Los progestágenos administrados en esponjas intravaginales de poliuretano alcanzan su máxima concentración en sangre a las 48 horas de la inserción, descendiendo lentamente hasta el día 12-14, cuando son retirados. Durante este periodo, la pulsatilidad de la LH está reducida a frecuencias similares a las de la fase lútea, impidiendo así el crecimiento terminal de folículos de gran tamaño y favoreciendo la aparición de un mayor número de folículos pequeños, con menores tasas de atresia. Si bien la población folicular es bastante estable durante el tratamiento progestativo, el tamaño de los folículos es variable en función de los niveles de progestágeno, apareciendo folículos de mayor tamaño con niveles estereidogénicos más bajos.

En general, la inserción del progestágeno durante 14 días asegura la luteolisis espontánea de un cuerpo lúteo existente durante el tratamiento (López *et al.*, 2002).

2.2.3. Dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR-G)

Los dispositivos intravaginales conocidos como CIDR (dispositivo interno de liberación controlada de droga). Son una innovación reciente, la cual consiste en embeber hule silástico con P4 y forrar espirales de acero con ese material; se comprimen los espirales y se les coloca dentro de la vagina de la hembra, por detrás del himen, dejándolos sueltos en el interior. La P4 es liberada en dosis preestablecidas y su actividad es controlada muy bien, simulando la función de un CL de manera artificial, suprimiendo el estro y la ovulación de manera más eficiente (Pérez, 2010).

Se ha demostrado que el uso de progesterona natural es menos potente que los progestágenos, se recomienda aplicar en hembras donantes 2 dosis de CIDR por oveja, reemplazando la primera a los 8 días después de la inserción del primer CIDR y antes de iniciar las inyecciones de gonadotropinas, esto porque suelen algunas ovejas presentar celo aun estando con el CIDR, debido a la baja en el nivel de progesterona en la sangre a partir del día 8 después de la inserción, al reemplazar el CIDR el día 8, se restablece un alto nivel de progesterona (Pliego, 2005). Según los registros, los intervalos que oscilaron entre las 40 a 50 h de presentación de estros después del retiro del CIDR.

2.3. Superovulación

El factor más crítico que afecta la eficiencia total y los costos de la TE es sin duda “la estrategia superovulatoria”. Esta consiste en inducir en forma artificial la liberación de un mayor número de ovocitos que el número natural y característico para cada especie. En otras palabras, para lograr superovulación se requiere incentivar el “reclutamiento, desarrollo y maduración” de los folículos antrales y contrarrestar cualquier efecto negativo sobre este proceso (Stockebrand, 2003).

La superovulación se logra en los animales domésticos por medio de la aplicación de FSH, eCG, inmunización activa contra esteroides, inmunización pasiva con antisuero esteroideal, liquido folicular bovino y administración pulsátil de GnRH. En

las ovejas se emplea la eCG, y la FSH de origen porcino con mayor frecuencia (Ávila, 2004).

Los tratamientos de superovulación tienen la finalidad de aumentar la tasa ovulatoria de las hembras a través de la utilización de hormonas gonadotrópicas. El origen biológico de las gonadotropinas utilizadas en los tratamientos de inducción a la superovulación es de dos tipos: Hipofisiario y Coriónico. Entre las de origen Hipofisiario destacan el extracto Hipofisiario equino (HAP) o la hormona folículo estimulante (FSH) ya sea porcina u ovina.

2.3.1. Superovulación con FSH

La relación FSH-LH es un factor determinante en la variabilidad de la respuesta ovulatoria. La purificación y disponibilidad comercial de FSH porcino (FSH-P Folltropin; Stimufol; Super-Ov) y ovino (Embryo-S., Ovagen) marcaron la iniciación de nuevas estrategias superovulatoria. Las inyecciones de FSH ya sea en niveles constantes o decrecientes, iniciándose por lo general 3 días antes de la suspensión de tratamiento progestacional siendo la última inyección dada ya sea al momento de la suspensión del tratamiento progestacional o 12 horas más tarde. Los tratamientos repetidos de FSH ocasionan una disminución en la respuesta ovulatoria en ovejas. Otro punto de discusión ha sido referente a la forma de aplicar la FSH en inyecciones constantes o decrecientes, recomendándose más las inyecciones decrecientes. Así también se ha estudiado el uso de la relación LH y FSH y se ha observado que mientras más bajo es el nivel de LH es mejor, existen algunos productos nuevos que no contienen LH pero cuando se usa FSH (Folltropin-V) que contiene 5% de LH la respuesta ovulatoria es muy baja. Al introducir PMSG en los tratamientos de FSH se está introduciendo un producto con una alta actividad de LH (Pliego, 2005).

2.3.2. Estimulación del crecimiento folicular mediante el uso de eCG

La gonadotropinas corionica equina (antes PMSG) es una glicoproteína producida por las células del trofoblasto durante la gestación de la yegua. Sus niveles en sangre periférica comienzan a ser detectables a partir del día 32 y declinan

alrededor del 100-120. La hormona natural tiene fundamentalmente una acción FSH, si bien no es única ya que también es notable su acción LH. Las características y calidad de los preparados comerciales (después de la extracción del suero y purificación) tienen bastante variación en esta relación FSH/LH y dependen de productos y lotes. Después de su administración exógena, la eCG tiene una larga vida media, superior a tres días en el caso de la oveja, debido a su riqueza en ácido siálico.

A nivel folicular la eCG actúa sobre todos los folículos en crecimiento fijándose tanto en receptores FSH como LH. También se ha descrito un efecto sobre recuperación de folículos que entraban en fase de atresia, y en la formación del “antrum” de folículos pequeños. La eCG utilizada en el control del ciclo sexual ovino (dosis media de 500 UI), administrada en el momento de retirada del progestágeno, o previamente como sucede en el caso de caprinos o en la superovulación, estimula el crecimiento de los folículos pequeños y medianos (2-5 mm), induce una mayor secreción de estradiol en las células de la granulosa, apareciendo el celo y la ovulación de forma más sincronizada y con anterioridad a los animales sólo tratados con progestágenos (López, 2002).

2.3.3. Ovulación inducida mediante la administración de GnRH

La GnRH es un decapeptido sintetizado por células neurosecretoras a nivel hipotalámico y transportada a la eminencia mediana donde es liberada a la sangre venosa. A nivel hipofisario actúa en la estimulación de la síntesis de gonadotropinas (FSH y LH) en su liberación y en el aumento de la densidad a sus propios receptores. El tratamiento exógeno con GnRH, dependiendo de la dosis puede simular pulsatilidad, o con dosis superiores por vía intravenosa o intramuscular simular la descarga preovulatoria de LH. Los productos comerciales son análogos o agonistas, decapeptidos o nonapeptidos, con actividad biológica más importante que la de la hormona natural y fundamentalmente liberadores de LH. La corta vida media de la hormona natural (3-12 minutos) también está

prolongada en los análogos, por una mayor fijación hipofisaria y degradación menos rápida (López, 2002).

2.4. Inmunización contra inhibinas

Las gónadas son la fuente principal de inhibinas y proteínas que contribuyen a la regulación endocrina del sistema reproductor. En el macho son producidas por las células de Sertoli y por las células de la granulosa en la hembra. Es una proteína que consta de dos subunidades con puentes disulfuro llamadas α y β . Desempeñan un papel importante en la regulación hormonal de la foliculogénesis durante el ciclo estral. Las inhibinas actúan como señales químicas a la hipófisis respecto al número de folículos que crecen en el ovario. Reducen la secreción de FSH sin alterar la liberación de LH, pueden ser responsables de la liberación diferencial del LH y FSH hipofisaria (Ortega, 2006).

La INHA disminuye el número de receptores de GnRH en las células de la pituitaria en cultivo, y por tanto los receptores de GnRH *in vivo* (Wang *et al.*, 1991). Se ha establecido que la inhibina, ejerce su acción compitiendo con activina (compuesta de dos subunidades β) por los receptores ActII y ActI a través de los cuales se translocan al núcleo estimulando la transcripción de FSH. Sin embargo, la proteína ligadora de inhibina (InhBP) producida en los gonadotropos, al unirse con la subunidad B, permite a la inhibina unirse con mayor afinidad por los receptores tipo ActI. Por otro lado, los betaglicanos le permiten a la subunidad α de la inhibina ligarse con mayor afinidad a los receptores Act II (Risbridger *et al.*, 2001). Estas observaciones sugieren que la subunidad α , pero no la subunidad β , puede ser usada como inmunógenos para neutralizar ambas formas de inhibina.

El estudio del control de la inhibina sobre la secreción de FSH y la foliculogénesis inicialmente se hizo a partir de la administración de preparaciones de fluido folicular (FF) como fuente no purificada de inhibina en ovinos, porcinos y bovinos en estudios *in vitro* e *in vivo* (Robertson *et al.*, 1985; Forage *et al.*, 1986, de Kretser y Robertson, 1989). Posteriormente otros métodos incluyeron la síntesis de péptidos sintéticos corto de las regiones carboxilo y amino terminal del péptido

inhibina. A la par se fue desarrollando la inhibina recombinante usando vectores de expresión en los cuales se insertan fragmentos del propéptido, así como del péptido maduro de inhibina. Recientemente, se ha estado trabajando con el desarrollo de vacunas de ADN contra inhibina en los cuales se han clonado fragmentos del péptido maduro. Todos estos esfuerzos han producido resultados en mayor o menor proporción, a fin de lograr incrementar eficientemente la tasa de ovulación de manera biológica y económica.

2.4.1. Inmunización con fluido folicular purificados conteniendo inhibina.

El desarrollo folicular y el número de folículos en el ovario están controlados por las concentraciones de FSH y por factores intra-ováricos. La inhibina es una hormona que selectivamente inhibe la secreción de hormona FSH de la glándula pituitaria (Fabre *et al.* 2006; Bernard *et al.* 2001). En 1930 se tenía noción como una sustancia inhibidora no esteroidea gonadal pero la identificación se logró 50 años más tarde (Bernard, *et al.* 2001). La Inhibina fue purificada del líquido folicular bovino y porcino, encontrando dos formas que resultan del ensamble dimérico de una subunidad A (18 kDa) y una subunidades B (A y B, aproximadamente 14 kDa) (Robertson *et al.*, 1985). La Inhibina es un dímero con una de varias subunidades beta, designados A, B, C, D y E y una subunidad de Alfa única. Las isoformas predominantes, Inhibina A e Inhibina B, están compuestas por la subunidad A o B de la subunidad beta (Pangas y Woodruff, 2000).

El uso de inhibina purificada a partir de fluido folicular ha confirmado sus efectos en células de la pituitaria en cultivo (Robertson, 1985). Los estudios a partir de purificados foliculares demostraron dos mecanismos de acción de la inhibina sobre la secreción de FSH:

1. A bajas concentraciones, la inhibina suprime rápidamente la liberación y síntesis de FSH
2. A altas concentraciones, el contenido celular de FSH y LH es afectado por la degradación intracelular producto de su almacenamiento.

A partir de preparaciones no purificadas de inhibina, se ha demostrado que la inhibina deprime el estímulo de GnRH sobre la liberación de FSH y LH, lo cual se atribuye a las observaciones de que la inhibina disminuye el número de receptores de GnRH en las células de la pituitaria en cultivo (Wang *et al.*, 1991 a, b), y por tanto los receptores de GnRH in vivo, por algún mecanismo similar.

2.4.2. Péptidos sintéticos.

Los péptidos sintéticos son producidos a partir de secuencias cortas N-terminal de la subunidad α de la inhibina bovina, porcina, ovina y humana, conjugada con proteínas capaces de mejorar la respuesta inmune con muy buenas respuestas en el incremento en los niveles de FSH y la tasa ovulatoria (entre 150 y 330%) en ovejas y cabras (Wrathal *et al.*, 1992; Tannetta *et al.*, 1998; D'Alessandro *et al.*, 1999; Medan *et al.*, 2003), vacas (Glencross *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1995; Medan *et al.*, 2006), cerdas (King *et al.*, 1993), entre otros.

Se han conducido varios trabajos para evaluar su efecto sobre la tasa ovulatoria en animales domésticos. Wrathal *et al.* (1992) generaron respuesta inmune específica mediante un péptido sintético a partir de la secuencia N-terminal 1-29 de la subunidad α de inhibina bovina ($\text{b}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$), la cual fue conjugada con un derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) usando glutaraldehído como agente de acoplamiento. Con el inmunógeno preparado se realizó inmunización activa en ovejas Romney. El grupo 1 ($n=20$) fue inmunizado con 400 μg de $\text{b}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$ y el conjugado emulsificado PPD en 2 ml de adyuvante de Freud, posteriormente a los 5 y 8 semanas recibieron 200 μg del conjugado por oveja. El grupo 2 sirvió como control portador y fue inmunizado primeramente con 300 μg de PPD, y en la semana 5 y 8 recibieron 150 μg . Finalmente el grupo 3 sirvió como control no inmunizado. Tres semanas después de la segunda inmunización se sincronizó el estro con esponjas intravaginales por 9 días. Doce días después de retiradas las esponjas se evaluó la tasa de ovulación por laparoscopia. Se tomaron muestras de sangre una vez a la semana dos semanas antes de la primera inmunización y hasta el día que se realizó la laparoscopia. Adicionalmente, 5 días

posterior a la laparoscopia, se tomaron 7 ovejas inmunizadas y 7 de las control (4 PPD inmunizadas, y 3 no inmunizadas), se evaluaron las concentraciones de FSH y LH a intervalo de 2 h por 84 h. Los resultados de este trabajo se resumen a continuación.

1. Las ovejas que fueron inmunizadas con un péptido sintético correspondiente a la subunidad α N-terminal del $\text{bl}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$ producen anticuerpos que corresponden a la inhibina bovina.
2. La inmunización activa contra inhibina con un fragmento sintético produjo ovulaciones en dos tantos comparadas con las testigos.
3. Grencross *et al.* (1994) realizaron inmunización activa contra inhibina en vaquillas con un péptido sintético a partir de la secuencia N-terminal 1-29 de la subunidad α de inhibina bovina ($\text{bl}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$) conjugada a albumina.

Por otra parte, Medan *et al.* (2006) Inmunizaron vacas contra inhibina durante el ciclo estral con un péptido sintético a partir de la secuencia N-terminal 1-26 de la subunidad α de inhibina porcina ($\text{pl}\alpha(1-26)$) conjugada a albumina sérica de conejo administrada a razón de 1 mg del péptido conjugado en adyuvante de Freud como inmunización primaria y posteriormente 4 repeticiones con la mitad de la dosis a los 49, 98, 147 y 238 días posterior a la primera, con resultados interesantes. Sin embargo, su disponibilidad es limitada debido a que la respuesta es variable y deben ser sintetizados artificialmente.

2.4.3. Inhibina recombinante

Otra alternativa exitosa ha sido la generación de inhibina como proteína recombinante a través de la clonación de fragmentos cortos N-terminal o la secuencia completa del péptido maduro (165-300 aa) de la subunidad α de inhibina en vectores de expresión. Los resultados muestran incrementos en los niveles de FSH y tasa de ovulación de 135 a 300% en ovinos (Forage *et al.*, 1987; Padilla *et al.*, 2007), bovinos (Medan *et al.*, 2004) y porcinos (Brown *et al.*, 1990).

Forage *et al.* (1987) produjeron un inmunógeno a partir de la fracción de los aa 165 a 300 de la subunidad α 43 de la inhibina con una extensión amino terminal de 20 aa derivado de la proteína β -galactosidasa de *E. coli*. El inmunógeno fue conjugado con hemocianina (KLH) por el método de glutaraldehído. Se trataron cuatro grupos de ovejas, tratados en el día 1, 21 y 50 con adyuvante de Freud, y a los grupos 2 y 3 en el día 93 con 100 μ g de $b\alpha$ no conjugada o conjugada con KLH en adyuvante. Se sincronizaron estros con esponja a partir del día 105 y se retiraron el día 115. Se tomaron muestras de plasma el día 115 para determinar la respuesta a la inmunización con $b\alpha$ por ELISA. Los resultados de resumen a continuación.

1. El inmunógeno producido a partir de la fracción de la subunidad α de la inhibina bovina por métodos de DNA recombinante en *E. coli* incrementó la tasa de ovulación en un 300%.
2. La respuesta inmunogénica en términos de capacidad de ligamiento a inhibina sugieren que el epítipo presentado en la proteína $b\alpha$ recombinante es similar a la forma nativa de inhibina. La extensión amino terminal de 22 aminoácidos no perjudica la presentación de los epítopes.

En otro estudio, Medan *et al.* (2004), inmunización activa contra inhibina en vacas durante el ciclo estral a partir de la fracción de los aa 165 a 300 de la subunidad α 43 de la inhibina producida en *E. coli* por el método de DNA recombinante (Forage *et al.*, 1987). La dosis fue de 1 ml del inmunógeno (125 μ g ml⁻¹) como inmunización primaria y posteriormente 2 repeticiones en los días 9 de cada ciclo estral a partir del segundo ciclo logrando incrementar la tasa de ovulación en 250%.

La respuesta a la inmunización contra la inhibina en ratas, bovinos, porcinos, ovinos, cabras, yeguas entre otros, han logrado, incrementando significativamente los niveles de FSH y la tasa de ovulación. Debido a la naturaleza de la síntesis del péptido recombinante su forma biológica se asemeja más a la nativa, pero no

adquiere la estructura conformacional postraducciona (Mao *et al.*, 2003), lo cual limita la aplicación de la inhibina como inmunógeno.

2.5. Vacunas de ADN para inmunización contra INHA

Actualmente las vacunas de ADN son producidas como estrategias en inmunoterapia específica en tratamientos de diversas enfermedades (Bonura y Colombo, 2011; Lee *et al.*, 2011), para dirigir respuestas inmune contra componentes proteicos de agentes infecciosos (Lodmell *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2000) o péptidos como el fragmento 1-32 del péptido maduro de inhibina (Han *et al.*, 2008). Las vacunas de ADN son relativamente fáciles de producir con la capacidad de producir una fuerte respuesta inmune humoral y celular (Garmory *et al.*, 2005).

La inhibina porcina muestra alta similitud física y química con la humana, bovina y ovina (de Kretser y Robertson., 1989), lo cual hace factible su uso entre especies. Una limitante en la inducción de inmunidad contra la inhibina α , es el hecho que es muy conservada y poco inmunogénica. Para incrementar la inmunogenicidad del fragmento (165-300) de la cadena α de inhibina, se puede emplear la adición de determinantes antigénicos (epitopos) del toxoide tetánico los cuales no son tóxicos, pero inducen una alta inmunogenicidad, estimulando la activación de linfocitos Th promiscuos que ayudan la respuesta humoral antígeno específica (Valmori *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 2008).

El empleo de una vacuna de ADN que expresa la secuencia de los primeros 32 aminoácidos del péptido maduro de INHA produjo un 42% de individuos con títulos de anticuerpos contra inhibina y 39% de partos gemelares, con respecto al control (Han *et al.*, 2008), lo cual posiblemente se debió a que no se usó la secuencia completa (165-300) del péptido maduro limitando la respuesta inmune, y con ello los niveles de FSH y tasa de ovulación.

2.6. Métodos de medición de anticuerpos contra inhibina.

Inicialmente las primeras investigaciones con inhibina se llevaron a cabo con un radioinmunoensayo denominado ensayo Monash, con el cual se pretendió medir la subunidad- α ; sin embargo, se tenían reacciones cruzadas con todas las otras formas diméricas de inhibina (Phillips, 2005). Con el desarrollo de los ensayos basados en ELISA se obtuvieron resultados más precisos para diferenciar las inhibinas de las activinas y folistatinas en humanos, primates, roedores y rumiantes por lo cual el Monash cayó en desuso (Evans y Groome, 2002; Phillips, 2005). Más tarde para la medición de la inhibina A y B en ovejas se desarrolló una ELISA denominada anticuerpos Groome (Knight *et al.*, 1998; McNelly *et al.* 2002). Actualmente se usa el ELISA basado en antisueros policlonales para INHA (Kaneko *et al.*, 2002).

2.7. Método de colecta de embriones

La colección de embriones se realiza del día 6 al 7 después de la aparición del servicio de monta en ovinos, por medio de lavados de los cuernos uterinos. La colección de embriones se puede ejecutar por distintos métodos: laparotomía y laparoscopia (Pliego, 2005). Los embriones se recogen mediante “lavados sucesivos” de los cuernos uterinos.

La laparotomía involucra exteriorizar el tracto reproductivo del animal para proceder con un lavado de los cuernos uterinos y oviducto que puede ser en sentido retrógrado o anterógrado. Los embriones se recolectan mediante lavados de los cuernos uterinos. Para ello se inyecta una solución fisiológica en uno y otro extremo de los cuernos uterinos. El flujo creado por la inyección de esta solución empuja los embriones al extremo opuesto del cuerno uterino, donde se recolectan mediante un catéter. La recolección de embriones se realiza en general al sexto o séptimo día después del inicio del celo (Stockebrand, 2003).

Para llevar a cabo la transferencia mediante la ayuda de un laparoscopio, se coloca a la receptora en decúbito dorsal en una mesa con diferentes posiciones, y

se inclina con el fin de que la cabeza quede hacia abajo en un ángulo aproximado de 45 grados. De esta manera el útero queda al descubierto y por lo tanto su localización con el laparoscopio es más fácil. Antes de localizar el útero y los ovarios para su revisión, se insufla la cavidad abdominal con aire a través de una aguja de Veress, para posteriormente hacer dos incisiones en la pared abdominal, aproximadamente a 4cm de la línea media y 10 cm anteriores a la ubre. Por una de estas incisiones se inserta un trocar con una cánula de 5mm de diámetro por donde se introduce el laparoscopio y se localiza el ovario con el cuerpo lúteo mas desarrollado, y por otra cánula de 10mm de diámetro se introducen unas pinzas con las que se retrae el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. En el cuerno uterino seleccionado se hace una pequeña punción y se transfieren los embriones, previamente cargados en una punta para pipeta o en un catéter, al ser empujados a la luz uterina por medio de una jeringa insulínica. Finalmente se regresa el cuerno a la cavidad abdominal y se suturan las incisiones (Mejía, 2001).

2.8. Elección de donantes

Una hembra siempre debe ser examinada para determinar su estado de salud general y reproductiva, antes de ser considerado como donante (Stringfellow Y Siedel 2000).

La elección de donantes se considera desde el punto de vista del mejoramiento genético, basados en índices de producción y de pedigrí. Es preferible trabajar con animales muy jóvenes para reducir el intervalo generacional, pero las ovejas de edades intermedias constituyen una fuente más apropiada por la mejor calidad de los embriones recolectados. Esta selección debe realizarse observando parámetros genéticos, clínicos reproductivos, zootécnicos y sanitarios del animal.

2.9. Evaluación de embriones

Todos los embriones que serán posteriormente transferidos deben ser evaluados morfológicamente en un microscopio estereoscópico, clasificándose de acuerdo a su grado de desarrollo y calidad. De manera estricta se consideran como embriones transferibles, aquellos con un grado de desarrollo que corresponda al

día en que son recolectados y con una calidad excelente o buena y regular. Los embriones de calidad pobre o degenerados son considerados como no transferibles. Sin embargo, la transferencia de embriones aun con cierta degeneración origina el nacimiento de crías viables, por lo que de manera práctica es conveniente transferir todos los embriones que sean recolectados, poniendo más atención en el grado de desarrollo que en la calidad (Mejía, 2011).

2.10. Transferencia de embriones

La transferencia de embriones inicia como la posibilidad de utilizar, en gran escala, el potencial genético de las hembras de diferentes especies. La transferencia de embriones inicio experimentalmente en los ovinos y caprinos desde 1932, pero no es sino a partir de 1970 cuando se utiliza a nivel comercial, siendo países pioneros Inglaterra y Estados Unidos y posteriormente Australia, Nueva Zelanda, Francia, Sudáfrica y Canadá.

El principio fundamental se basa en la recolección de los embriones de una hembra “donadora” y su trasplante a las hembras “receptoras”, en las cuales se establece y desarrolla la gestación. Por tanto, los animales obtenidos por transferencia, son portadores del 50% de los genes presentes en el semen del padre.

El objetivo productivo principal deberá ser el incremento en el número de crías nacidas de hembras y machos genéticamente superiores (Mejía, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

El estudio se llevó a cabo en la posta de producción en la División Académica de Ciencias Agropecuarias, UJAT localizada en la Ranchería Huasteca 2ª sección, km 25 carretera Villahermosa, Teapa.

3.2. Animales y manejo

Se emplearon 40 ovejas de pelo (Pelibuey PB, n=20 y Black Belly BB, n=20) nulíparas de 12 meses de edad, condición corporal (CC) de 3.0 y 25 kg de peso corporal promedio, provenientes del rebaños comerciales y de la División Académica de Ciencias Agropecuarias. Las ovejas fueron mantenidas en corraletas de piso elevado, alimentadas con 1 kg de alimento comercial conteniendo 13% de proteína cruda (PC) y 2.6 Mcal kg⁻¹ de energía metabolizable (EM), pasto verde y agua a libertad.

3.3. Construcción de vacunas en pCINeo y purificación del plásmido

Se experimentó con tres construcciones de vacunas de ADN, previamente elaborada a partir del fragmento amplificado por PCR de ADN genómico usando iniciadores conteniendo los epitopos del toxoide tetánico P2 y P30, y los sitios de corte XbaI (Figura 2). El fragmento de INHA fue inicialmente clonado al vector pGEM-T y transformado en bacterias competentes *E. coli* DH-5 α , cuyo ADN fue purificado y digerido con enzima de restricción XbaI. Finalmente el fragmento de ADN liberado de cada una de las construcciones fue clonado al vector de expresión pCINeo y transformado en bacterias competentes *E. coli* DH-5 α .

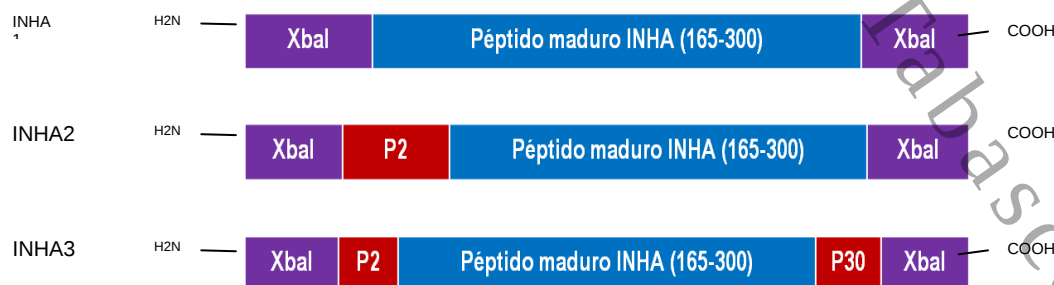


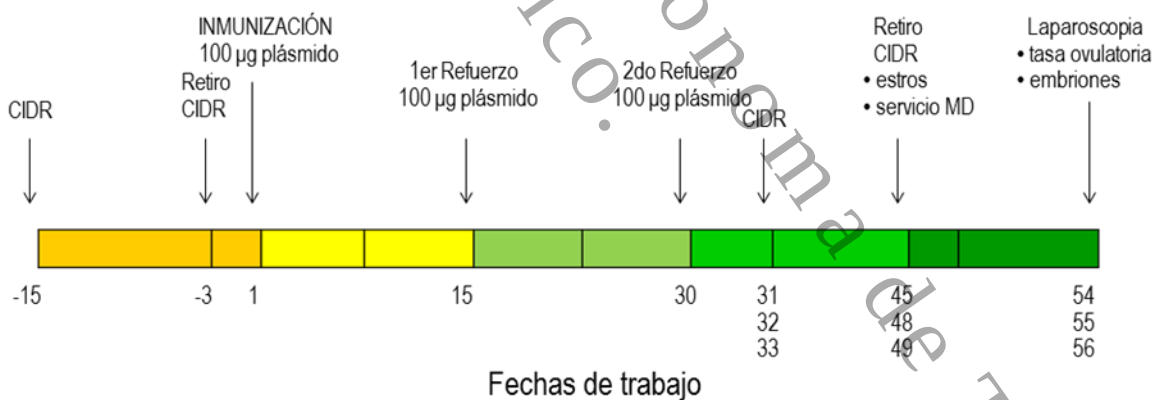
Figura 2. Esquema de construcciones de vacunas de ADN expresando la cadena α de inhibina (165-300) con los epitopos del toxoide tetánico P2 y P30.

3.4. Diseño de Tratamientos

Para asegurar que las ovejas estuvieran en actividad cíclica se introdujo un dispositivo intravaginales CIDR conteniendo 0.3 g de progesterona (Pfizer®) por 12 días (figura3). Las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro grupos, para recibir I.M. una inmunización inicial con 100 µg del plásmido pCINeo purificado de INHA1 (n=10), INHA2 (n=10), INHA3 (n=10), y 1 mL de solución buferada fosfatada (PBS) (Control, n=10). Se aplicaron dos refuerzos a intervalos de 20 días con las mismas dosis de la primera inmunización. Las ovejas se monitorearon dos veces al día para detectar estro usando un macho con mandil.

Diez días posterior al segundo refuerzo, se sincronizó el estro de las ovejas mediante dispositivo intravaginal (CIDR-G) el cual fue removido 12 días después a las 0600 h, y se aplicó I.M. a cada oveja 100 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Figura 3).

Posterior al retiro de la esponja, se monitoreo la presentación de estros en las ovejas dos veces al día (a.m. y p.m.) con un carnero fértil previamente evaluado, y se dio monta (Figura 3). Se registró la fecha y hora de inicio del celo, y de terminación del mismo.



Día	Fecha	Día	Fecha	Día	Fecha
-15	Inserto CIDR 17 de abril	15	1er Refuerzo 16 de mayo	45, 46, 47	Retiro CIDR, MD 12, 13 de junio
-3	Retirar CIDR 29 abril	30	2º Refuerzo 30 de mayo	54, 55, 56	Evaluación embriones 18, 19 y 20 de junio
1	Inmunización 2 de mayo	32, 33, 34	Inserto CIDR 31 mayo, 1 de junio		

Figura 3. Calendario de manejo reproductivo de ovejas e inmunización contra Inhibina

3.5. Determinación de anticuerpos por ELISA

A fin de cuantificar la respuesta inmune de las vacunas experimentales contra inhibina, de cada oveja en cada tratamiento se tomó una muestra de 4 mL de sangre en tubos vacutainer cada 14 días el día de la primera inmunización y los días del primer y segundo refuerzo y 14 días posterior al segundo refuerzo

Previamente para la cuantificación de anticuerpos *in vitro* se inocularon y cultivaron células de mamífero a fin de obtener el antígeno del péptico maduro de la inhibina recombinante, la cual fue posteriormente purificado mediante una columna de afinidad. La determinación de anticuerpos se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ de la UNAM mediante la prueba de ELISA doble seriada desde diluciones de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.

El procedimiento empleado se describe a continuación:

Prueba de ELISA

1. Sensibilizar una placa (Maxisorb, Nunc, No catalogo 442404) con el antígeno a probar a una dilución que va de 1:100 a 1:400 (de acuerdo a la titulación previa del antígeno) en **buffer de carbonatos 1X**, colocando 100 µL de esta dilución por pozo.
2. Dejar incubando a 4°C toda la noche.
3. Pasado el tiempo de incubación lavar la placa (300ul/pozo) por 5 minutos, 4 veces con **buffer de lavado 1X**.
4. Bloquear la placa por 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100 µL de **buffer de bloqueo**.
5. Lavar la placa (300ul/pozo) por 5 minutos, 4 veces con **buffer de lavado 1X**.
6. Diluir el suero en buffer de bloqueo (**1:10**) y colocar 100 µL/ pozo. Para esto se puede agregar a cada pozo 90 µl de **solución de bloqueo** y después 10 µl del suero problema.
7. Incubar la placa por 1 hora a 37°C.
8. Repetir el paso 2 de lavado.

9. Incubar con el 2° anticuerpo (anti-IgG de la especie adecuada) acoplado a peroxidasa (HRP) diluyendo **en buffer de bloqueo** (1:1000 hasta 1:5,000) por 1 hora a 37 °C
10. Repetir el paso 2 de lavado.
11. Colocar 100 µl/pozo de **solución reveladora** y esperar aproximadamente 5 minutos e inmediatamente parar la reacción con 50 µL a cada pozo de **solución de frenado** y leer a 590 nm en un lector de ELISA. Es posible no parar la reacción y leer a 450 nm.

La calidad del revelado se evalúa con la prueba de máxima densidad óptica (MDO), realizándolo de la siguiente manera: Se colocaron 100 microlitros de la solución reveladora en las 8 filas de la placa por duplicado. Se agregó 100 microlitros de la solución de segundo anticuerpo a una dilución de 1:1500 realizando diluciones dobles seriadas.

Soluciones y materiales para prueba de ELISA

- **Buffer de carbonatos 1X;** carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6
- **Buffer de lavado 10X;** cloruro de sodio 1.25 M, 250 mM tris-HCl pH 7.9, Tween- 20 1%
- **Buffer de bloqueo 1X;** leche descremada 2%, en Buffer de lavado 1X
- **Solución reveladora;** Preparar ácido cítrico 0.1 M pH 4.5 y citrato de sodio 0.1 M pH 4.5. Por placa se mezclan 5 mL del ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M, se agregan 200µl de una solución de 5 µg de orto-fenilen-diamina (OPD), 20 µL de peróxido de hidrógeno al 30%.
- **Solución de frenado;** ácido sulfúrico 2N
- **Vial con 5 ug de OPD** (*o-phenylendiamine dihydrochloride*). vial de 200µl por 10ml/placa.
- **2° Anticuerpo.** Anti IgG de la especie adecuada acoplado a peroxidasa.
- **Suero control positivo y suero control negativo.**

Interpretación

Se calculó la **densidad óptica de corte de positivos y negativos** que corresponde entre el 47% y 52% (**DO47 y DO52**) de unión mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{DO47} = (0.53 \times \text{DO CN}) + (0.47 \times \text{DO CP})$$

$$\text{DO52} = (0.48 \times \text{DO CN}) + (0.52 \times \text{DO CP})$$

Donde **DO CN** fue el promedio de densidades ópticas del duplicado del suero control negativo y **DO CP** fue el promedio de densidades ópticas para el duplicado del suero control positivo.

Toda muestra con valor de **DO inferior** al valor obtenido para **DO47** es considerada **negativa**. Toda muestra con **DO superior** al valor **DO52** es considerada **positiva**. Las muestras que resultaron con valor de **DO** entre **DO47** y **DO52** se consideraron **sospechosas** y para lo cual se repitió la prueba.

Anticuerpo acoplado peroxidasa anti IgG conejo Cabra SIGMA Cat. A-0545 1ml
Anti-rabbit IgG (whole molecule)- peroxidase, antibody produced in goat.

Anticuerpo acoplado a peroxidasa anti IgG Cerdo cabra Cat. Jackson Immuno Research Laboratories 114-035-003 2ml Peroxidase-conjugated affini Pure goat anti-swine IgG (H+L)

OPD (o-phenylendiamine dihydrochloride) Cat. SIGMA P1526-10G

3.6. Determinación de la tasa de ovulación, número y calidad de embriones

Para cada grupo experimental se evaluó la tasa de ovulación 7 días después al estro por laparotomía media ventral mediante el conteo del número de CL en cada ovario. Posteriormente se procedió a colectar los embriones lavando los cuernos

uterinos de acuerdo a la metodología propuesta por Jacinto *et al.*, (2011). Los embriones fueron evaluados con base a su grado de desarrollo y calidad de acuerdo al manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Siedel, 2000).

3.7. Variable a evaluar y análisis estadístico

La interpretación y conversión de lecturas de densidades ópticas para la cuantificación de niveles de anticuerpos por ELISA se realizó en una hoja de Excel y los resultados finales se presentan a través de estadística descriptiva

Las variables para evaluar la conducta estral incluyeron número y porcentaje de ovejas en estro, duración del estro y tiempo de retiro a la presentación del estro (h). Las variables relacionadas a la respuesta ovárica son la tasa de ovulación determinada a través del conteo de CL's. La calidad de embriones se evaluó a través del grado de desarrollo embrionario, calidad de los embriones y número de embriones recolectados por oveja.

Las variables de respuesta continuas fueron evaluadas mediante ANOVA bajo un modelo mixto mediante el procedimiento Mixed de SAS (SAS, 1999 V8), donde se consideraran los efectos fijos de tratamiento, raza y el efecto aleatorio oveja dentro de raza. Los valores fueron considerados estadísticamente diferentes con un $\alpha \leq 0.05$. Las variables categóricas tales como los porcentajes fueron evaluadas mediante una prueba exacta de Fisher.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de anticuerpos contra INHA

De acuerdo a las pruebas de ELISA realizadas, no se encontraron títulos de anticuerpos contra inhibina en las ovejas inoculadas con las vacunas de ADN contra inhibina con las construcciones de INHA 1 e INHA 2 cuyas lecturas fueron similares a las de las ovejas inoculadas con el vehículo solución buferada fosfatada PBS (Control), pero estos tres grupos las lecturas fueron diferentes al suero de oveja usado como control positivo (Cuadro 1). En el caso de la vacuna INHA 3 no fue posible correr los ensayos correspondientes.

Cuadro1. Títulos de anticuerpos en ovejas inmunizadas contra inhibina en diluciones dobles seriadas, utilizando como antígeno inhibina recombinante.

Tratamiento	Diluciones					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
Control positivo	0.556	0.533	0.504	0.483	0.378	0.284
Control negativo	0.092	0.094	0.084	0.073	0.067	0.056
INHA 1	0.098	0.091	0.078	0.067	0.059	0.060
INHA 2	0.097	0.083	0.073	0.065	0.058	0.058

4.2. Conducta estral

De acuerdo a los resultados obtenidos, la respuesta a la sincronización del estro fue del 100% en las ovejas del grupo control y las tratadas con las vacunas de ADN contra inhibina de los grupos INHA 1 e INHA 3, pero no en el grupo INHA 2 (9/10; Cuadro 2).

El tiempo del retiro a la presentación del estro entre las ovejas del grupo control y las tratadas con vacunas de ADN contra INHA fue similar $P=0.29$; (Cuadro 2). Sin embargo la duración del estro fue significativamente más largo ($P=0.0001$) en las ovejas del grupo INHA 3 en comparación con las ovejas de los otros grupos de INHA y las del control (Cuadro 2).

En la distribución de la presentación de estros en las ovejas evaluadas a las 48, fueron similares entre los grupos control y las de vacuna contra INHA (Cuadro 3), pero diferentes a las 24 y >48 h ($P<0.05$) entre las ovejas del grupo INHA 3 en comparación con las ovejas control y de los grupos INHA 1 y 2 (Cuadro 2). En términos generales un 46.15 % de las ovejas presentaron estro a las 24 h, un 38.46% a las 48 hrs y el 15.38% restante a >48 h.

4.3. Tasa de ovulación, desarrollo y calidad embrionaria

De las ovejas en estro, el 100% de las ovejas en todos los grupos registraron ovulaciones. Sin embargo, ninguna de las ovejas en el grupo control o tratadas con la vacuna de ADN contra INHA fueron superovuladas (Cuadro 2).

La tasa de ovulación cuantificada a través del número de CL's fue similar entre en las ovejas tratadas con las vacunas de ADN contra INHA 1, INHA 2, INHA 3 y las del grupo control, con 1.5, 1.55, 1.4 y 1.6 CL por ovejas (Cuadro 2), respectivamente.

No se observaron diferencias en cuanto al grado de desarrollo embrionario entre las ovejas tratadas con las vacunas contra INHA ($P=0.76$; Cuadro 4). La calidad de los embriones colectados de las ovejas tratadas con las vacunas de AD y control fueron similares (Cuadro 5). El grado de desarrollo de los embriones en la categoría 5 fue del 44.12%, en la 6 del 44.12% y en la 7 del 14.7%, sin diferencias estadísticas entre grupos o tratamientos.

Cuadro 2. Media $\pm$ DE del inicio y duración del estro, y tasa ovulatoria en ovejas de pelo tratadas con una vacuna de ADN contra inhibina o FSH.

Variables evaluadas	Tratamientos				P-value
	CONTROL	INHA1	INHA2	INHA3	
Número de ovejas tratadas	10	10	10	10	-
Tiempo Retiro - Estro (h)	26.70 $\pm$ 5.09	31.45 $\pm$ 5.09	26.75 $\pm$ 5.87	39.23 $\pm$ 5.09	0.29
Duración del estro (h)	27.5 $\pm$ 2.29	27.7 $\pm$ 2.29	25.94 $\pm$ 2.43	68.99* $\pm$ 2.29	0.0001
Número de ovejas en estro	10/10	10/10	9/10	10/10	
Numero de ovejas ovulando	10/10	10/10	9/10	10/10	-
Número de ovejas superovuladas	0 (10)	0 (10)	0 (10)	0 (10)	-
Número de CL's por oveja	1.60 $\pm$ 0.21	1.50 $\pm$ 0.21	1.55 $\pm$ 0.23	1.40 $\pm$ 0.21	0.92
CC (1-5)	3.0 $\pm$ 0.11	3.2 $\pm$ 0.11	2.9 $\pm$ 0.11	3.30 $\pm$ 0.11	0.07
Peso (kg)	25.5 $\pm$ 1.05	25.5 $\pm$ 1.05	26.3 $\pm$ 1.05	28.3 $\pm$ 1.05	0.23

CL's = cuerpos lúteos; CC= Condición corporal.

Cuadro 3. Distribución del estro a las 24, 48 y >48 hrs pos retiro del CIDR

Tratamiento	Horas posterior al retiro			Total
	24 h	48 h	>48 h	
INHA 1	6/10 ^a	4/10 ^a	0/10 ^a	10
INHA 2	5/9 ^a	4/9 ^a	0/9 ^a	9
INHA 3	1/10 ^b	3/10 ^a	6/10 ^b	10
Control	6/1 ^a	4/10 ^a	0/10 ^a	10
% Total	18 (46.15)	15 (38.46)	6 (15.38)	39 (100.00)

a,b Literales diferentes dentro de hileras indica diferencias estadísticas significativas. (P>0.05)

Cuadro 4. Grado de desarrollo de embriones de ovejas tratadas con vacunas de ADN contra INHA.

Tratamiento	*Grado de desarrollo			Totales
	5	6	7	
CONTROL	4	3	1	8
INHA 1	4	4	1	9
INHA 2	3	3	2	8
INHA 3	4	4	1	9
Totales (%)	15(44.12)	14 (41.17)	5 (14.70)	34 (100.00)

*5= Blastocisto temprano; 6= Blastocisto; 7= Blastocisto Expandido

Cuadro 5. Calidad de embriones de ovejas tratadas con vacunas de ADN contra INHA.

Tratamiento	*Escala de calidad				Totales
	1	2	3	4	
CONTROL	5	3	0	0	8 (23.53)
INHA 1	6	3	0	0	9 (26.47)
INHA 2	5	3			8 (23.53)
INHA 3	6	2	1		9 (26.47)
Totales (%)	22 (64.71)	11 (32.35)	1 (2.94)	0 (0.00)	34 (100.00)

*1=Embriones excelentes y buenos; 2= Embriones regulares;
3= Embriones malos; 4= Degenerados.

5. DISCUSIÓN

5.1. Determinación de anticuerpos contra INHA

Como inhibina es una hormona glicoproteica (Llitas *et al.*, 2007), producida por las gónadas que regula selectivamente la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH). Su acción en la hipófisis y el hipotálamo, reduce la secreción de los pulsos de GnRH (Llitas *et al.*, 2007) y desempeña un importante papel en la regulación intraovárica de la foliculogénesis.

No se encontraron títulos de anticuerpos contra inhibina, lo cual lleva a corroborar que no se ajustó una respuesta inmune contra la misma. Por lo tanto, estos resultados también explican la falta de efectividad de las vacunas para incrementar niveles de FSH endógenos y permitir una ovulación múltiple en las ovejas tratadas (Cuadro1).

A diferencia de los resultados encontrados objeto de éste trabajo, Wrathal *et al.* (1990) generaron respuesta inmune específica mediante un péptido sintético a partir de la secuencia N-terminal 1-29 de la subunidad α de inhibina bovina ($\text{bl}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$), la cual fue conjugada con un derivado proteico purificado de tuberculina.

Los autores señalados inmunizaron activamente ovejas Romney, un grupo ($n=20$) fue inmunizado con 400 μg de $\text{bl}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$ y el conjugado emulsificado PPD en 2 ml de adyuvante de Freud, posteriormente a los 5 y 8 semanas recibieron 200 μg del conjugado por oveja. Un segundo sirvió como control portador y fue inmunizado primeramente con 300 μg de PPD, y en la semana 5 y 8 recibieron 150 μg . Un tercer grupo sirvió como control no inmunizado. Los resultados del trabajo señalado evidenciaron producción de anticuerpos correspondientes a la subunidad α N-terminal del $\text{bl}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$ y produjo el doble de ovulaciones comparadas con las control. A diferencia de nuestros resultados se encontro que la vacuna produjo anticuerpos que corresponden a la inhibina bovina.

Por otra parte, Glencross *et al.* (1994) también realizaron inmunización activa contra inhibina en vaquillas con un péptido sintético a partir de la secuencia N-terminal 1-29 de la subunidad α de inhibina bovina ($\text{bl}\alpha(1-29)\text{-Tyr}^{30}$) conjugada a albumina y a diferencia de nuestros resultados lograron producir 22.9% de anticuerpos contra inhibina, con una tasa de ovulación de 1.58.

También Medan *et al.* (2006) inmunizaron vacas contra inhibina durante el ciclo estral con un péptido sintético a partir de la secuencia N-terminal 1-26 de la subunidad α de inhibina porcina ($\text{pl}\alpha(1-26)$) conjugada a albumina sérica de conejo administrada a razón de 1 mg del péptido conjugado en adyuvante de Freud como inmunización primaria y posteriormente 4 repeticiones con la mitad de la dosis a los 49, 98, 147 y 238 días posterior a la primera, con resultados de 13.9% de títulos de anticuerpo contra inhibina.

Han *et al.* 2008 evaluaron también una vacuna de ADN contra inhibina con base en una fracción del péptido sintético también encontró y lograron producir un 46.7% de anticuerpo contra inhibina e incrementó en 39.2% los partos gemelares.

En nuestro caso de acuerdo a las pruebas realizadas, no se encontraron títulos de anticuerpos contra inhibina en las ovejas tratadas con las vacunas ADN contra inhibina de las construcciones INHA1 e INHA 2 cuyas lecturas fueron similares con las de control (Cuadro 1). La dosis usada en nuestro estudio contrasta con las empleadas por estos autores con las dosis de 100 μg usada en nuestro estudio y con base en ello hipotetizamos que una razón de no respuesta en la producción de anticuerpos y tasa de ovulación radica en ello.

5.2. Conducta estral

La efectividad en la sincronización del estro registrado en nuestro trabajo, (cuadro 2) fue similar al reportado por Uribe-Velázquez *et al.*, (2008) usando CIDR durante un periodo de 12 días. También son similares a los reportados por Martínez *et al.* (2007) quienes reportaron un 100% en la sincronización de estros en ovejas Barbados barriga negra tratada con acetato de medroxiprogesterona y diferentes tiempos de aplicación de eCG.

La P_4 natural contenida en el CIDR es liberada y absorbida por la mucosa vaginal de manera eficiente, lo cual incrementa los niveles en el plasma en las primeras 12 horas a más de 9 ng dL^{-1} y durante el periodo de tratamiento a más de 4 ng dL^{-1} (Perez-Luna *et al.*, 2013), provocando un efecto de retroalimentación negativa sobre GnRH, LH y FSH controlando la ovulación y celo. Al momento de retiro del dispositivo los niveles de P_4 caen abruptamente quitando un efecto de retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas, provocando el reinicio de la actividad ovárica con la aparición de una nueva onda de crecimiento folicular y ovulación. Adicionalmente se ha encontrado que en ovejas tratadas con P_4 y aplicación de eCG en dosis bajas presentan estros y ovulaciones más sincronizados (Dias *et al.*, 2001; Evans, 2003; Liu *et al.*, 2007)

En cuanto al tiempo del retiro a la presentación del estro, los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con los de Martínez *et al.* (2008) quienes reportan el 84.4% de las ovejas en estro entre las 24 y 48 h después del retiro del CIDR, lo cual concuerda con los resultados encontrados en las ovejas inmunizadas contra INHA 1, INHA 2 y las control.

Sin embargo, en cuanto las ovejas inoculadas con la vacuna contra INHA 3, la duración del estro duró alrededor de 30 horas más comparadas a la de los otros grupos. La distribución de los estros a las 24 y >48 hrs también fue diferente entre los grupos evaluados siendo más tempranos y más uniformes en las ovejas de los grupos de vacuna de ADN contra INHA 1, INHA 2 y las control.

5.3. Tasa de ovulación, desarrollo y calidad de embriones

La tasa de ovulación en las ovejas inmunizadas con vacunas de ADN contra INHA 1, INHA 2, INHA 3 y control, (Cuadro 2). Estos resultados son similares a las obtenidas bajo sincronización normal del estro las cuales oscilan entre 1.4 y 2.6 según reportes de Rojas y Rodríguez (1997) en ovejas Blackbelly. En ese mismo trabajo, se encontró una relación importante de la tasa de ovulación con la CC. Donde ovejas de condición corporal de 3, registraron una TO de 2.64 ± 0.21 comparadas contra otras con mejor o peor CC.

Se ha comprobado que una CC óptima está relacionada con aporte energético satisfactorio, lo cual garantizan el suministro de nutrientes a nivel celular (Cox *et al.*, 1987), impactando el potencial reproductivo, especialmente sobre la secreción de gonadotropinas, la concentración plasmática de P₄, la función ovárica, la calidad del ovocito y del embrión (Boland *et al.*, 2000), así como la involución uterina y la tasa de concepción (Roche, 2006).

La tasa de recuperación embrionaria total promedio fue del 57.5%, pero aun se considera ligeramente por debajo de la obtenida, comparada con las reportadas en otros estudios las cuales van de 69.3 hasta 85.5% (D'Alessandro *et al.*, 2005).

Se esperaba que los resultados de las vacunas de ADN contra INHA, las tres construcciones evaluadas, produjeran resultados de ovulaciones múltiples similares a los reportados por otros autores (Medan *et al.*, 2003; Medan *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2007) en ovejas y cabras y otras especies domésticas.

Sin embargo, los resultados obtenidos al no generarse anticuerpos contra inhibina y la falta de ovulación múltiple no avalan el funcionamiento de las vacunas, lo cual posiblemente se debió a la dosis de ADN empleada, ya que según Luna-Palomera (2011) refiere que en otros estudios las dosis iniciales son de hasta 600 µg.

De acuerdo a Wheaton (1998) las vacunas tienen que ser capaces de neutralizar los efectos de la inhibina endógena para interrumpir el mecanismo de feed back negativo contra la FSH, lo cual resulta en incremento en los niveles de FSH en sangre, el número de folículos de mayor talla y por tanto de la tasa de ovulación en bovinos lo cual también concuerda con lo reportado por Lliteras *et al.* (2007). Por otra parte, Medan (2003) logró la inmunización contra INHA en cabras e indujo la superovulación, aumentó la secreción de FSH, siendo un método exógeno alternativo actual de protocolos de gonadotropina.

Actualmente se comercializa péptidos recombinantes de inhibina humana (Creative BioMart; http://www.creativebiomart.net/symbolsearch_INHA.htm) con diferentes aplicaciones en la ciencia. Por lo tanto, de lograrse producir una vacuna

de ADN contra inhibina funcional, se podría usar en protocolos de superovulación en sustitución parcial o total de la FSH exógena, y en estudios de los mecanismos involucrados en el crecimiento ovulatorio.

La clasificación embrionaria hecha de acuerdo al Manual de la IETS (Wright, 2000) permitió establecer que los embriones recolectados de las ovejas tratadas con INHA y las control, el 44.12% obtuvieron un GD (grado de desarrollo) de 5, el 41.17% con GD 6 y 14.70% GD de 7. En cuanto a la calidad de los embriones las calificaciones obtenidas en las cuatro categorías (1 a 4) no indicaron diferencias. Los resultados encontrados fueron similares en cuanto a grado de desarrollo y calidad embriones a los reportados por Pliego Palacios (2005) quien reporta un 87.3 en forma global con un porcentaje de embriones degenerados del 12.7%.

Así de acuerdo a la clasificación de Wright (2000) los embriones tratados con INHA el 64.7% obtuvieron de categoría 1, el 32.35% con categoría 2, el 2.92% en la categoría 3.

6. CONCLUSIONES

Ninguna de las construcciones o vacunas de ADN probadas lograron inducir una respuesta inmune contra inhibina de acuerdo a los títulos de anticuerpos evaluados.

La inmunización de las ovejas con las vacunas de ADN contra la inhibina con los epítomos P2 y P30 o ambos, no indujo la superovulación.

A excepción de las ovejas inmunizadas con la vacuna INHA 3, la conducta estral fue similar entre los grupos tratados.

La calidad y grado de desarrollo fue similar en ovejas tratadas con las vacunas de ADN contra INHA 1, 2, 3 y control.

7. LITERATURA CITADA

Ávila E. 2004. Tesis "Efecto del progestágeno FGA sobre la sincronización del estro y sobrevivencia embrionaria en ovejas de pelo". Universidad Autónoma de Nayarit, FMVZ. P 7, 12.

Bari F., Khalid M., Wolf B., Haresign W., Murray A. and Merrell B. 2001. The repeatability of superovulatory and response and embryo recovery in sheep. *Theriogenol.* 56:147-155.

Bernard D.J., Chapman S.C., Woodruff T.K. 2001. Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent ProgHorm Res.* 56:417-50.

Benyei B., Komlosi I., Pecsí A., Pollott G, Marcos CH, *et al.* 2006. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Anim Reprod Sci.* 93:268-279.

Bó, G. A., Chesta, P. M., Carballo. G. D. y Mapletoft. R. J. 2007. Memoria: VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Nuevas alternativas para la superovulación de donantes de embriones. Argentina. 181- 96 P.

Boland, M.P., P. Lonergan and D. O'Callaghan. 2000. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenol.* 55(6): 1323–1340

Bolivar PA, Maldonado-Estrada JG. 2008. Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. *RevColombCiencPecu.* 21: 351-364.

Bonura A., Colombo P. 2011. Novel strategies for the development of a vaccine for Parietaria allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 24 (2) :297-304.

Brown RW, Hungerford JW, Greenwood PE, Bloor RJ, Evans DF, Tsonis CG and Forage RG. 1990. Immunization against recombinant bovine inhibin α – subunit caused increased ovulation rates in gilts. J. Reprod. Fertil. 90: 199-205.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. Endocr Rev. 23: 787–823.

Cox, N.M., Stuart, M.J., Althen, T.G., Bennet, W.A. y Miller, H.W. (1987) J. Anim. Sci. 64: 507-516.

D'Alessandro A., G. Martemucci and N. Iaffaldano. 1999. Active immunization with a synthetic fragment of pig inhibin α -subunit increases ovulation rate and embryo production in superovulated ewes but season affects its efficiency. J. Reprod. Fertil. 115:185-191.

D'Alessandro AG, Martemucci G and Taibi L. 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. Theriogenol. 63: 1764-1774.

Dias, F.E.F.; Lopes, E.S.; Villaroel, A.B.S.; Rondina, D.; Lima-Verde, J.B.; Paula, N.R.O.; Freitas, V.J.F. 2001. Estrus synchronization, ovulation induction and fertility in hairless ewes treated with equine chorionic gonadotrophin. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 53: 618-623.

deKretser D.M, M.P. Hedger, K.L. Loveland and D.J. Phillips. 2002. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. Hum.Reprod. Update, 8 (6): 529-541.

deKretser D.M. and D.M. Robertson. 1989. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. Biol. Reprod. 40:33-47.

Evans, A.C.O. 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 289-306.

Evans LW and Groome NP. 2002. Development of immunoassays for inhibin, activin and follistatin. In: Muttukrishna S, Ledger W, editors. *Inhibin, activin and follistatin in human reproductive physiology*. Imperial College Press. p. 11–60.

Fabre S, A. Pierre, P. Mulsant, L. Bodin, E. D. Pasquale, L. Persani, P. Monget and D. Monniaux. 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*.

Forcada F, Ait Amer-Meziane M, Abecia JA; Maurel MC, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Asenjo B, Vázquez MI, Casao A. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenol.* 75 (4): 769-76.

Forage, R.G., Ring, J.M., Brown, R.W., McInerney, B.V., Cobon, G.S., Gregson, R.P., Robertson, D.M., Morgan, F.J., Hearn, M.T.W., Findlay, J.K., Wettenhall, R.E.H., Burger, H.G. & de Kretser, D.M. 1986. Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 83: 3091-3095.

Forage, R.G., Brown, R.W., Oliver, K.J., Atrache, B.T., Devine, P.L., Hudson, G.C., Goss, N.H., Bertram, K.C., Tolstoshev, P., Robertson, D.M., de Kretser, D.M., Doughton, B., Burger, H.G., & Findlay, J.K. 1987. Immunization against and inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep. *J. Endocr.* 114: R1-R4

Frandsen R.D., 1995. *Anatomía y Fisiología de los animales domésticos: Ciclo estral*. Ed. 5. Mexico. P 423.

Garmory HS, perkins SD, Phillpotts RJ, Titball RW. 2005. DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliver Rev.* 57: 1343-1361.

Garzón N, Urrego R, Giraldo C.A. 2007. Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* Volumen 2. Número 2. 68-77 P.

Glencross, R.G., Bleach, E.C., Wood, S.C., Knight, P.G. 1994. Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 100:599-605.

Han L., D.G. Mao, D.K. Zhang, A.X. Liang, M. Fang, Muhammad Moaeen-ud-Din, L.G. Yang. 2008. Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin α (1-32) fragment for improving the fertility in rats and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 109:251-265.

Jacinto H.J.C, Núñez S.J. y Mejía V.O 2011. Memorias Curso Teórico-Práctico. Transferencias de embriones en cabras y ovejas. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agropastoril (CEIEPASP, FMVZ-UNAM). Chapa de Mota Edo. De México.

Kaneko H., Noguchi J., Kikuchi K., Todoroki J., Hasegawa Y. 2002. Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biol. Reprod.* 67:38–45.

Kim S., Choi Y., Spencer E.T., Bazer F.W. 2003. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reprod. Biol. and Endocrinol.* 1:58.

King B.F., J.H. Britt, K.L. Esbenshade, W.L. Flowers, L.A. Sesti. T.L. Martin and J.J. 1993. Ovulatory and endocrine responses after active immunization of gilts against a synthetic fragment of bovine inhibin. J Anim Sci 71:975-982.

Knight P.G. 1996. Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. Front. Neuroendocrin. 17:476-509.

Lee IH, Park JB, Cheong M, Choi YS, Park D, Sin JI. 2011. Antitumor Therapeutic and Antimetastatic Activity of Electroporation-Delivered Human Papillomavirus 16 E7 DNA Vaccines: A Possible Mechanism for Enhanced Tumor Control. DNA Cell Biol. In Press

Llitas E.R., Denis R., Chong M., Bernal A., y Fuentes D. 2007 Inhibina: Una alternativa para mejorar los resultados del tratamiento superovulatorio. Comunicación. Ciencia y Tecnología Ganadera Vol. 1 No. 3 p. 111-114.

Liu X., Dai Q., Hart E.J., Barrett D.M.W., Rawlings N.C., Pierson R.A., Bartlewski P.M. 2007. Ultrasonographic characteristics of ovulatory follicles and associated endocrine changes in cyclic ewes treated with medroxyprogesterone acetate (MAP)-releasing intravaginal and equine chorionic gonadotropin (eCG). Reprod. Dom. Anim. 42:393-401.

Lodmell DL, NB. Ray, J.T Ulrich, LC. Ewalt. 2000. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL®). Vaccine 18:1059-1066.

López S. A., González de B. J., Santiago M. J. 2002. Pequeños rumiantes. Publicación de la sociedad española de ovinotecnia y caprinotecnia: Dinámica folicular en relación a los sistemas tradicionales de control de ciclo sexual. Departamento Reproducción Animal. INIA. Madrid, España. Volumen 3. Numero 2. P. 18-23.

Luna Palomera, C. 2011. Tópicos selectos en producción ovina. Aplicación de biotecnologías moleculares en la reproducción animal. Pp. 95-108.

Mao D.G., Yang, L.G., Ye R., and Jiang X.P. 2003. Effect of inhibin α (1-32) gene immunization on the follicular development and reproductive hormone in rats. Agric. Sci. China. 2: 337-343.

Martínez Tinajero J.J., F. Izaguirre Flores, L. Sánchez Orozco, C.G. García Castillo, G. Martínez Priego y G. Torres Hernández. 2007. Comportamiento reproductivo de ovejas barbados barriga negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. Rev. Cient. 17(1): 47-52.

Martínez. T.JJ, MT Sánchez Torres-Esqueda, G Torres-Hernández, JG Herrera-Haro, L. Bucio-Alanís, R Rojo-Rubio, J Hernández-Martínez. 2008. "Comportamiento reproductivo de ovejas F1 (damara x merino) Sincronizadas con CIDR y dos tiempos de aplicación de GnRH" 24(3):175-182.

Mata F. 2010. Tesis "Inducción de estros y tasa de gestación en ovejas de pelo tratadas con acetato de melengestol (MGA)": Fase folicular. Universidad michoacana de san Nicolás Hidalgo, FMVZ. P. 6-7.

Mayo. K. E, Cerelli. G. M, Spiess.J, Rivier. J, Rosenfeld. M.G, Evans. R.M. and Vale W. 1986. Inhibin A-subunit cDNAs from porcine ovary and human placenta. 83(16): 5849–5853.

McCracken, John A., Edward E., Custer, and Justin C. Lamsa., 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. Physiol. Rev. 79, 263–323.

McNeilly AS, Souza CJH, Baird DT, Swanston IA, McVerry J, Crawford J. 2002. Production of inhibin A not B in rams: changes in plasma inhibin A during testis growth, and expression of inhibin/activin subunit mRNA and protein in adult testis. *Reproduction*. 123:827–35.

Medan, M.S., Watanabe, G., Sasaki, K., Nagura, Y., Sakaime, H., Fujita, M., Sharawy, S., Taya, K., 2003. Ovarian and hormonal response of female goats to active immunization against inhibin. *J. Endocrinol.* 177, 287–294.

Medan, M.S., Akagi, S., Kaneko, H., Watanabe, G., Tsonis, C.G., Taya, K., 2004. Effects of reimmunization of heifers against inhibin on hormonal profiles and ovulation rate. *Reproduction* 128, 475-482.

Medan, M.S., Takedom, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Yazawa, S., Watanabe, G., Taya, K., 2006. The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous in cows. *J. Reprod. Dev.* 52: 107–113.

Mejia O.V. 2001. Transferencia de embriones en ovejas y cabras. CEIEPASEP, FMVZ-UNAM. 11 Y 19 P.

Morris DG, McDermott MG, Diskin MG, Morrison CA, Swift PJ and Sreenan JM. 1995. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin α -subunit on ovulation rate and twin-calving rate in heifers. *J. Reprod. Fert.* 97: 255–261.

Ortega, J.C. 2006. Tesis “Comparación de dos métodos de sincronización del estro en ovinos de pelo”. Universidad Autónoma de Chihuahua, FZ. P 11.

Padilla, G., Knight, P.G., Holtz, W. 2007. Superovulation and embryo collection in nulliparous boer goat does immunized against a recombinant ovine α - subunit inhibin. Small. Ruminat. Res. 74:159-164.

Pangas SA and Woodruff TK. 2000. Activin signal transduction pathways. Trends in Endocrinol. Metabol 11 309-314.

Pérez. L. E. 2010. Tesis "Uso del dispositivo CIDR reciclado. Efecto de su esterilización mediante autoclave en los niveles de progesterona liberados en cabras sometidas a tratamientos cortos" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, FMVZ.

Pérez. L.E, Álvarez R. E.L., Herrera C.J. 2013. Progesterona plasmática en cabras tratadas con dispositivos CIDR reciclados. En:"La contribución del sector pecuario a la seguridad alimentaria en México". XL Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C. IX Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico. Pp. 606-610.

Perrin P., Y. Jacob, A. Aguilar-Setién, E. Loza-Rubio, C. Jallet, E. Desmézires, M. Aubert, F. Cliquet, N. Tordo. 2000. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus Vaccine 18: 479-486.

Phillips D.J. 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. Domestic Animal Endocrinology 28:1-16

Pliego Palacios G. 2005. Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos Pelibuey. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana.

Risbridger G.P., J.F. Schmitt, and D.M. Robertson. 2001. Activins and Inhibins in Endocrine and Other Tumors. Endocrine Reviews 22(6): 836-858

Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MT, Burger HG, Wettenhall RE, de Kretser DM. 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *BiochemBiophys Res Commun*.126(1):220-6.

Roche, J.F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 96(3-4): 282–296.

Rojas R O, Rodriguez R O L., 1997. Tasa ovulatoria y presencia de foliculos despues del estro en ovejas blackbelly. *Tae, Peeu, Max*, Vol 35, No, 1

Ruvuna F, Taylor JF, Walter JP, Turner JW, Thallman RM. 1992. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: II. Economic evaluation of steer production. *J AnimSci*.70(4):1084-90.

Sasaki K., M.S. Medan, G. Watanabe, S. Sharawy and K. Taya. 2006. Immunization of goat against inhibin increased follicular development and ovulation rate. *J. Reprod. Dev.* 52: 543-550.

Stockebrand C. E., 2003. Memoria: “Desarrollo de una técnica asistida por laparoscopia para la recolección de embriones en ovejas”. Valdivia – Chile. P. 6.

Stringfellow D.A. y Siedel S.M. 2000. Procedimientos sanitarios generales y consideraciones sobre el bienestar asociados con la producción in vivo de embriones. En: *Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones*. Madrid, Spain.

Tannetta DS, Feist SA, Bleach ECL, Groom NP, Evans LW and Knight PG. 1998. Effects of active immunization of sheep against an amino terminal peptide of the inhibin ac subunit on intrafollicular levels of activin A, inhibin A and follistatin. *J Endocrinol.* 157:157-168.

Uribe Velásquez L.F, Correa. O. Osorio.J.H. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. Biosalud, 8: 117 – 131.

Valmori D, Pessi A, Bianchi E, Corradin G. 1992. Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. J Immunol 1992. 149:717–721.

Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA 1991 Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. Cell 67:797–805.

Webb R, Woad KJ, Armstrong DG. 2002. Domestic Animal Endocrinology 23: 277-285.

Williams B.B, M. Wall, R.Y. Miao, B. Williams, I. Bertoncello, M.H. Kershaw, T. Mantamadiotis, M. Haber, M.D. Norris, A. Gautam, P.K. Darcy and R.G. Ramsay. 2008. Induction of T cell-mediated immunity using a c-Myb DNA vaccine in a mouse model of colon cancer. Cancer Immunol Immunother 57:1635-1645.

Wrathal JHM, McLeod BJ, Glencross RG and Knight PG. 1992. Effects of active immunization against a synthetic peptide sequence of the inhibin α subunit on plasma gonadotrophin concentrations, ovulation rate and lambing rate in ewes J. Reprod. Fert. 95:17.

Wright J, Andrzej B, Brock K. Evans B, Hare W. Humblot P, Mapletoft R, Le Guenne B, Nelson R. 2000. Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones. Savory, Ill: International Embryo Transfer Society.

Respuesta inmune, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly tratadas con vacunas de ADN contra inhibina

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.seoc.eu Internet	305 palabras — 3%
2	docplayer.es Internet	185 palabras — 2%
3	up-rid.up.ac.pa Internet	93 palabras — 1%
4	www.vetzoo.umich.mx Internet	71 palabras — 1%
5	repositorio.umsa.bo Internet	64 palabras — 1%
6	www.scielo.org.mx Internet	54 palabras — 1%
7	repositorio.una.ac.cr Internet	50 palabras — 1%
8	www.researchgate.net Internet	50 palabras — 1%
9	Manrique Quispe, Yan Pierr. "Evaluación de dos protocolos de sincronización de celo con	29 palabras — < 1%

progesterona en borregas inseminadas con semen
congelado.", Universidad Nacional del Altiplano de Puno (Peru)

ProQuest

10

1library.co

Internet

22 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.