



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**INFLUENCIA DE LA HARINA Y ACEITE DE PESCADO EN LAS
VARIABLES REPRODUCTIVAS, CARACTERÍSTICAS
EMBRIONARIAS Y PERFIL HORMONAL DE OVEJAS**

RAFAEL NIETO AQUINO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

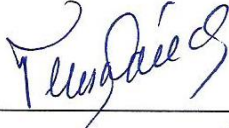
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

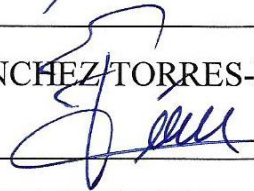
La presente tesis, titulada: **INFLUENCIA DE LA HARINA Y ACEITE DE PESCADO EN LAS VARIABLES REPRODUCTIVAS, CARACTERÍSTICAS EMBRIONARIAS Y PERFIL HORMONAL DE OVEJAS**, realizada por el alumno: **Rafael Nieto Aquino**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

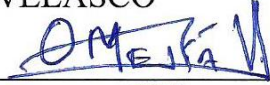
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 


DRA. MA. TERESA SÁNCHEZ TORRES-ESQUEDA

ASESOR: 

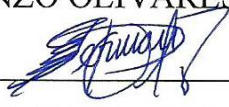
DR. JOSÉ LUIS FIGUEROA VELASCO

ASESOR: 

DR. V. OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA

ASESOR: 

DR. LORENZO OLIVARES REYNA

ASESOR: 

DR. J. JESÚS GERMAN PERALTA ORTÍZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2014.

INFLUENCIA DE LA HARINA Y ACEITE DE PESCADO EN LAS VARIABLES REPRODUCTIVAS, CARACTERÍSTICAS EMBRIONARIAS Y PERFIL HORMONAL DE OVEJAS

Rafael Nieto Aquino, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

La adición de grasa en la dieta está relacionada con alteraciones en los procesos reproductivos de rumiantes, particularmente en el desarrollo folicular, tasa ovulatoria y secreción hormonal. Los tratamientos en ambos experimentos fueron: el grupo HAP adicionado con harina y aceite de pescado (4 y 5 % de MS) y, el grupo TES sin la adición de estos ingredientes. Se realizaron dos experimentos: en el experimento 1, se evaluó el efecto de un período corto de alimentación (15 d) utilizando una dieta que contenía aceite y harina de pescado como fuente de Ω -3, en las variables reproductivas: presentación e inicio de estro, gestación y prolificidad en ovejas primíparas inseminadas por laparoscopia (IAL). En el experimento 2, se evaluaron las mismas dietas pero en un periodo prolongado (45 d), y se determinó su efecto en la respuesta ovulatoria, desarrollo embrionario y tasa de gestación posterior a la transferencia, además del perfil de progesterona (P_4) e insulina (INS) en suero en ambos experimentos. En el experimento 1 se presentaron diferencias en el inicio del estro ($P < 0.05$; TES: 35.1 ± 2.1 ; HAP 41.0 ± 1.8 h) y no se encontraron diferencias en las concentraciones promedio de P_4 e INS en suero, por lo que la alimentación con HAP no influyó en el porcentaje de gestación, pero sí en el índice de prolificidad ($P < 0.05$; HAP: 1.63; TES: 1.25). En el experimento 2, no se encontró efecto por la harina y aceite de pescado en las estructuras y el desarrollo embrionario, sin embargo, se encontró una mayor tasa de gestación en el grupo HAP comparada al grupo TES (53.6 vs 31.5 %). En ovejas donadoras y receptoras no se encontraron diferencias entre tratamientos por efecto de la adición de la harina y aceite de pescado en las concentraciones promedio de P_4 en suero; sin embargo, las concentraciones de INS en suero presentaron diferencias ($P < 0.05$; HAP: 0.12 ± 0.02 ; TES: 0.13 ± 0.03 ng mL⁻¹). Se concluye que la adición de harina y aceite de pescado durante un periodo corto en un programa de IAL modifica el inicio del estro y mejora la prolificidad, no obstante, aunque el uso de estos ingredientes en un periodo largo en un programa de superovulación y transferencia de embriones no mejora la calidad embrionaria, pero sí influye sobre la tasa de gestación.

Palabras clave: ovejas, laparoscopia, embriones, progesterona, insulina.

INFLUENCE OF FISH MEAL AND OIL IN THE REPRODUCTIVE VARIABLES, EMBRYONIC CHARACTERISTICS AND HORMONAL PROFILE OF EWES

Rafael Nieto Aquino, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014.

The addition of fat in the diet is related to alterations in the reproductive processes of ruminants, particularly in follicular development, ovulation rate and hormonal secretion. The experimental treatments in both experiments were: the group fed a diet supplemented with fish meal and oil, FMO (4 and 0.8 %, DM), and a control group with no supplementation, CON. Two experiments were conducted: In experiment 1, the effect of a short period (15 d) of supplementation was assessed using a diet containing fish meal and oil as a source of Ω -3, in reproductive variables (estrus onset, pregnancy percentage and prolificacy rate) of virgin ewes artificially inseminated by laparoscopy (AIL). In Experiment 2, the same diets were evaluated over a long period (45 d), and its effect were determined in the ovulatory response, embryonic development and pregnancy rate after embryo transfer; in addition progesterone (P_4) and insulin (INS) profile in serum were determined in both experiments. In the experiment 1, the time of estrus onset was different among groups ($P < 0.05$; CON: 35.1 ± 2.1 ; FMO: 41.0 ± 1.8 h), and no differences were found in average P_4 or INS concentrations in serum, therefore, adding fish meal and oil to the diet did not affect pregnancy rate, but it did affect the prolificacy rate ($P < 0.05$; FMO: 1.63; CON: 1.25). In the experiment 2, there was no effect of meal and fish oil in the structures and embryonic development, however, a higher pregnancy rate was found in the FMO group compared to the CON group (53.6 vs 31.5%). In donor and recipient ewes no differences were found between treatments, due to the addition of fish meal and oil in mean serum P_4 concentrations; however, concentrations of serum INS were different ($P < 0.05$; FMO: 0.12 ± 0.02 ; CON: 0.13 ± 0.03 ng mL^{-1}). It is concluded that the addition of fish meal and oil for a short period in a program of AIL modifies the onset of estrus and improves prolificacy, however, although the use of these ingredients for a long period in a superovulation and embryo transfer program does not improve embryo quality, but influences the pregnancy rate.

Keywords: sheep, laparoscopy, embryo, progesterone, insulin.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

Dios por permitirme vivir esta hermosa experiencia de la cual no me arrepiento.

A mis padres: Praxedis Aquino Hernández y Julio Nieto Herver, quienes siempre son un gran ejemplo de vida para mí, por su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos: Argelia, Elvia Luz y Julio Cesar, de quienes siempre aprendí.

A mis sobrinos: Julio, Isabella, Alondra, Yolia, Jesús, Valente y Crisanto, por su cariño y a quienes espero servirles de ejemplo.

A mis amigos, que en esta trevesia formaron parte de mi formación al Dr. Pánfilo Saldaña Campos, Dra. Teresa Sánchez Torres Esqueda, a los MVZ, Jose Luis Cordero y Diana Portacarrero, Ariadna Cordero, Dr. Vicente Zamora, MC. Fidel Torres y al Sr. Miguel Salinas Romero y familia.

Pero muy en especial a Rosalinda Gonzáles Santos, quien sin condición me brindo su apoyo, paciencia y amor, y me ha dado lo mas hermoso de mi vida, a mi hijo Rafael Alejandro Nieto Gonzáles, quien siempre será la razón de mi vivir.

Y a todas esas personas que me ayudaron a salir adelante, muchas gracias.

Rafael Nieto Aquino

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento en mi formación profesional.

A la Dra. Ma. Teresa Sánchez Torres Esqueda, por apoyarme en mis investigaciones, por creer en mí, y permitirme desarrollarme profesionalmente.

Al Dr. Pánfilo Saldaña Campos, por iniciarme en este mundo de la ciencia.

Al MVZ. José Luis Cordero Mora por apoyarme desde mi llegada al Colegio, por siempre darme un buen consejo.

Al Dr. José Luis Figueroa Velasco, por brindarme su amistad y colaboración en la investigación.

Al Dr. Octavio Mejía Villanueva, de quien siempre he aprendido, y por su colaboración en los diversos trabajos de investigación.

Al Dr. Lorenzo Olivares Reyna, por su constante colaboración y apoyo incondicional.

Al Dr. Jesús Peralta Oríz y al Dr. Pedro Molina Mendoza, quienes además de ayudarme siempre me brindaron un buen consejo.

Al Biólogo Mario Cardenas León, por su colaboración en el análisis de las hormonas.

A mis amigos, David Chan, Coyotl, Vicente, Fidel, Remedios, David Hernández, Sergio, Antonio Bata, Miguel Romero, y todos con los que compartí algún momento en mi formación.

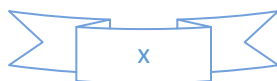
Muchas gracias.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2	Planteamiento del problema.....	3
3	Objetivos.....	4
3.1.1	General.....	4
3.1.2	Específicos.....	4
4	Hipótesis	5
5	REVISIÓN DE LITERATURA	6
5.1	Principales aspectos en la fisiología reproductiva de la oveja	6
5.1.1	Pubertad	6
5.1.2	Ciclo estral	6
5.1.3	Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	7
5.1.4	Hormona luteinizante (LH).....	8
5.1.5	Hormona folículo estimulante (FSH).....	9
5.1.6	Progesterona (P ₄).....	10
5.1.7	Estradiol (E ₂).....	11
5.1.8	Crecimiento y desarrollo folicular	12
5.1.9	Dinámica folicular.....	15
5.1.10	Estacionalidad.....	16
5.2	Aspectos nutricionales y metabólicos y su influencia en los procesos reproductivos	18
5.2.1	Condición corporal.....	18
5.2.2	Estado nutricional de la hembra.....	19
5.2.3	Energía y proteína en respuesta del perfil endocrino y eficiencia reproductiva	20
5.3	Lípidos en la alimentación de rumiantes.....	22
5.3.1	Grasa de sobrepeso.....	24
5.3.2	Fuentes y tipos de grasas y sus efectos en la reproducción de rumiantes	25

5.4	Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPs) y síntesis de prostaglandinas	27
5.4.1	AGPs en la regulación de la síntesis de prostaglandinas $F_{2\alpha}$	29
5.4.2	Prostaglandinas $F_{2\alpha}$ y reconocimiento materno de la preñez	30
5.4.3	Influencia de los AGPs en la respuesta ovárica y embrionaria.....	32
5.4.4	Efecto de los AGP sobre el desarrollo del ovocito.....	34
5.4.5	Uso de AGP en la calidad embrionaria y la criopreservación.....	36
5.4.6	AGP en la espermatogénesis y características seminales.....	37
5.4.7	AGP y la capacidad del semen a la criopreservación.....	40
5.5	Hormonas metabólicas	41
5.5.1	Leptina	41
5.5.2	Insulina.....	43
5.5.3	Efecto de los IGF en los procesos reproductivos	46
5.6	Sincronización del ciclo estral	47
5.6.1	Sincronización del estro con progestágenos	48
5.6.2	Sincronización del estro con prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$).....	50
5.6.3	Combinación de fármacos hormonales en el manejo del ciclo estral de la oveja	52
6	Literatura citada	54
7	CAPITULO I. INFLUENCIA DE HARINA Y ACEITE DE PESCADO EN EL PERFIL HORMONAL Y VARIABLES REPRODUCTIVAS DE OVEJAS INSEMINADAS MEDIANTE LAPAROSCOPIA	78
7.1	Resumen.....	78
7.2	Introducción	79
7.3	Materiales y métodos	80
7.4	Resultados	84
7.5	Discusión.....	87
7.6	Conclusión	90

7.7	Literatura citada	94
8	CAPITULO II. RESPUESTA OVULATORIA, DESARROLLO EMBRIONARIO Y TASA DE GESTACIÓN EN OVEJAS ADICIONADAS CON HARINA Y ACEITE DE PESCADO.....	99
8.1	Resumen.....	99
8.2	Introducción	100
8.3	Materiales y métodos	102
8.4	Resultados	107
8.5	Discusión.....	112
8.6	Conclusión	116
8.7	Literatura citada	120
9	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	123
9.1	Conclusiones	123
9.2	Recomendaciones	124
10	ANEXOS	125



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Contenido de nutrientes en las dietas experimentales adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), en ovejas inseminadas mediante laparoscopia.....	91
Cuadro 2.	Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas experimentales adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), en ovejas inseminadas por laparoscopia.....	92
Cuadro 3.	Respuesta de las variables reproductivas en ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado e inseminadas mediante laparoscopia.....	93
Cuadro 4.	Contenido de ingredientes y nutrientes de las dietas experimentales, harina y aceite de pescado (HAP) y testigo (TES), en ovejas superovuladas.....	117
Cuadro 5.	Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas experimentales adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), en ovejas superovuladas.....	118
Cuadro 6	Respuesta de las variables reproductivas y características embrionarias en ovejas suplementadas con harina y aceite de pescado.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática que ilustra la generación de prostaglandinas (PGs) de las series 1, 2 y 3 referente a los tipos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) que conforman la dieta	28
Figura 2	Representación esquemática del metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) de la dieta (Ω 3 y 6) en la regulación de la síntesis de prostaglandinas $\text{PGF}_{2\alpha}$	29
Figura 3	Concentración de progesterona durante la fase lútea sincronizada de ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES).	85
Figura 4	Concentración de insulina en ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), inseminadas mediante laparoscopia.	86
Figura 5	Concentración promedio de progesterona en las ovejas donadoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación	108
Figura 6	Concentración promedio de progesterona en las ovejas receptoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación.	109
Figura 7	Concentración promedio de insulina en las ovejas donadoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación.	110
Figura 8	Concentración promedio de insulina en las ovejas receptoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación	111

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas, poseen más de un doble enlace en la cadena y se clasifican químicamente en omega-3 y 6 (Ω -3 y 6), por la posición en que se ubica el primer doble enlace relacionado al metilo terminal.

Estos AGP se consideran esenciales para el organismo debido a que no los puede sintetizar, por lo tanto, son tomados de los alimentos: el AGP Ω -6 más abundante es el ácido linoleico (AL) y se encuentra en aceites de maíz, cártamo y girasol; por otra parte, el principal AGP Ω -3 es el ácido alfa-linolénico (AAL) presente en los vegetales y pastos verdes (Lehninger *et al.*, 1993).

El uso de AGP en la alimentación de rumiantes presenta mejoras en los procesos reproductivos, por que dichos procesos están asociados con la disponibilidad de energía (Funston, 2004); sin embargo, el nivel de inclusión de grasas en la dieta ha sido limitado por el efecto negativo de la fermentación en el rumen (Hess *et al.*, 2008), aunque se menciona que los ácidos grasos de cadena larga pueden escapar a la biohidrogenación ruminal (Ashes *et al.*, 1992).

Investigaciones recientes muestran que los AGP Ω -3 pueden influir de forma positiva en el crecimiento del folículo ovulatorio, formación del cuerpo lúteo, desarrollo embrionario, actividad uterina, componentes de membrana celular, síntesis de esteroides y prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$), además de la maduración cerebral del feto (Wathes *et al.*, 2007; Childs *et al.*, 2008; Zachut *et al.*, 2008).

Por ejemplo, la suplementación con harina de pescado (enriquecida en n-3) a vacas lecheras disminuye la concentración de 13-14 dihidro-15 keto-prostaglandina posterior a la inyección de

oxitocina (Mattos *et al.*, 2002), de igual forma, se ha observado que estos AGP Ω -3 alteran la biosíntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células endometriales de bovino cultivadas *in vitro* (Mattos *et al.*, 2003).

Mattos *et al.* (2000) indican que las grasas pueden influir positivamente en la reproducción por alteraciones en la síntesis de hormonas esteroideas y prostaglandinas. Mencionan que los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolenico, eicosapentanoico y decosaexanoico) son capaces de inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la disminución de su precursor (el ácido araquidónico) a través de acciones enzimáticas, por lo que sugieren debe existir una alimentación estratégica vigilando el perfil de ácidos grasos en la dieta, de tal forma que se pueda disminuir la síntesis de prostaglandinas durante los primeros días de gestación y de esta manera reducir la mortalidad embrionaria.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de harina y aceite de pescado como fuente de AGP Ω -3 en el inicio y duración del estro, tasa de gestación y prolificidad en ovejas primaras inseminadas por laparoscopia, y sobre la respuesta ovulatoria y características embrionarias en ovejas superovuladas, además del perfil hormonal de progesterona (P_4) e insulina (INS).

2 Planteamiento del problema

El crecimiento progresivo de la población humana, ha sido contrario a la producción de alimentos, obligando al hombre a buscar nuevas y mejores técnicas de producción agropecuaria, para satisfacer sus necesidades nutricionales (Cuellar *et al.*, 2005).

La ovinocultura en México es una de las actividades que actualmente ha despertado el interés en los ganaderos dentro del sector pecuario, en primera instancia por la gran demanda de carne en el mercado (85, 965. 2 t) y segundo por la baja producción de este producto a nivel nacional (46, 299. 2 t). No obstante, los modelos productivos que prevalecen en nuestro país, en la mayoría de los casos son rebaños con índices de producción deficientes y con poco interés de los productores en constituir una empresa económicamente redituable debido a que las personas realizan esta actividad por tradición para el autoconsumo, como un medio de ahorro que les permite enfrentar compromisos sociales y de desarrollo familiar. Además que no se toman en cuenta aspectos generales como la nutrición, estado fisiológico (gestación, lactancia, postparto), estacionalidad y sanidad de los animales antes de someterlos a un programa reproductivo (Arteaga, 2003), esto origina un menor número de corderos destetados por oveja al año y favorece a la importación de ganado ovino, principalmente de países como Nueva Zelanda, Australia, E. U., Canadá y Chile, con la finalidad de cubrir el déficit (39, 736 t) de la demanda existente (SAGARPA, 2012).

Sin embargo, la demanda de ovinos de mejor calidad cada vez es mayor, por lo que los productores se ven en la necesidad de buscar mejores pie de cría y recurren a tecnologías o técnicas de mejoramiento genético en la reproducción asistida para incrementar su productividad y rendimiento en sus animales.

3 Objetivos

3.1.1 General

Evaluar el efecto de harina y aceite de pescado como fuente de AGP n-3 en el inicio y duración del estro, tasa de gestación y prolificidad en ovejas primíparas inseminadas por laparoscopia, y en la respuesta ovulatoria y características embrionarias en ovejas superovuladas, además del perfil hormonal de progesterona (P_4) e insulina (INS).

3.1.2 Específicos

- Determinar inicio y duración del estro, en respuesta a los tratamientos hormonales.
- Evaluar la tasa de gestación posterior a la IAL.
- Evaluar el índice de prolificidad.
- Evaluar la respuesta ovulatoria.
- Determinar la calidad embrionaria.
- Evaluar la tasa de gestación posterior a la transferencia de embriones.
- Determinar la concentración hormonal en suero de P_4 e INS.

4 Hipótesis

La adición de harina y aceite de pescado como fuente de Ω -3 durante un periodo corto mejorará la presentación del estro, tasa de gestación y prolificidad en ovejas inseminadas por laparoscopia.

La adición de harina y aceite de pescado como fuente de Ω -3 durante un periodo largo de alimentación (45 d) en ovejas superovuladas mejorará la respuesta ovulatoria y las características embrionarias de los embriones recuperados. La adición de harina y aceite de pescado como fuente de Ω -3 durante un periodo largo en ovejas receptoras de embriones incrementará la tasa de gestación y el índice de prolificidad.

La adición de harina y aceite de pescado en la dieta modificará las concentraciones de P_4 e INS.

5 REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Principales aspectos en la fisiología reproductiva de la oveja

5.1.1 Pubertad

Es la etapa fisiológica en la cual la hembra presenta su primer estro, libera gametos viables y es capaz de reproducirse; no obstante, es recomendable que la oveja alcance su madurez sexual para evitar el desgaste metabólico ocasionado por mantener la gestación y la lactancia (Galina y Valencia, 2008).

La edad y el peso corporal son las principales características que limitan el inicio a la pubertad, esto ha sido observado en diversas investigaciones donde se muestra que las ovejas deben alcanzar aproximadamente el 60% de su peso adulto durante los primeros siete a nueve meses de vida para poder reproducirse, sin embargo, existe cierta variabilidad en el tiempo en que se presenta la pubertad, dicho efecto es influenciado por las diferentes razas de ovejas, el tipo de alimentación y la época de nacimiento (Foster *et al.*, 1985; Quirke *et al.*, 1985a; Suttie *et al.*, 1991; Zavala *et al.*, 2005; Camacho *et al.*, 2008).

5.1.2 Ciclo estral

El ciclo estral se define como el intervalo entre dos estros y se caracteriza por cambios fisiológicos que van desde la foliculogénesis, la ovulación, la formación de cuerpos lúteos y la posible fecundación de gametos, hasta cambios en el comportamiento de la hembra, los cuales son regulados por procesos endocrinos (Bearden y Fuquay, 1982; Hafez y Hafez, 2002a).

En la oveja el ciclo estral tiene una duración promedio de 16 a 17 días, presentando diferencias entre razas, etapa de la época reproductiva (anestro) y efectos ambientales (McKenzie y Phillips, 1931; Wiggins *et al.*, 1970; Navarro y Torres, 1984).

El ciclo estral presenta dos fases, una fase folicular y una fase lútea. Durante la fase folicular se lleva a cabo el reclutamiento de folículos y dura de 2 a 3 días, esta fase se caracteriza por la presentación del estro el cual tiene una duración aproximada de 36 horas y la ovulación que en el caso de la oveja, es de tipo espontánea y ocurre en el último tercio del estro. La presentación de la ovulación determina el inicio de la fase lútea, durante esta fase el cuerpo lúteo es la principal estructura ovárica que se desarrolla y su función es la de secretar progesterona (P_4) para mantener una posible gestación, la fase lútea normalmente dura entre 12 y 14 días, sin embargo, este tiempo se puede ver afectado por la secreción temprana de prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$), las cuales causan la lisis o regresión del cuerpo lúteo y, en consecuencia, la presencia del estro y el inicio de un nuevo ciclo estral (Frandsen, 1988).

5.1.3 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La GnRH es una hormona constituida por 10 aminoácidos y presenta un peso molecular de 1183 Da (Hafez y Hafez, 2002b), es secretada en el hipotálamo por células del área preóptica (APO) y área ventromedial (AVM), de donde es transportada a la eminencia media (EM) para ser liberada al sistema portal hipofisario y causar la liberación de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en la adenohipófisis (Prieto y Velázquez, 2002).

La secreción de la GnRH es de forma pulsátil, la frecuencia y la amplitud de sus pulsos varía dependiendo de la edad, la fase del ciclo estral e incluso por el estado nutricional en que se encuentre el animal (Schillo, 1992), cada pulso de GnRH es seguido por otro de LH, estableciendo una correlación entre estas hormonas, la cual incrementa durante el pico preovulatorio, sin embargo, posterior a este evento la GnRH se continúa secretando con una menor frecuencia en sus pulsos, dicho comportamiento ha sido relacionado con la conducta del estro mostrada por la hembra seguida de la ovulación (Evans *et al.*, 1994).

El mecanismo regulador en la secreción de GnRH es mediado por cambios propios en la secreción de hormonas ováricas, como es el caso del estradiol y la progesterona, las cuales actúan retroalimentando de una forma positiva (estimula) o negativa (inhibe) la secreción de gonadotropinas, no obstante, se estima que estos procesos no son regulados directamente por estas hormonas, ya que no poseen receptores en las áreas de las células secretoras de GnRH, lo que sugiere la participación de neurotransmisores como la dopamina, ácido gama amino butírico (GABA) y los péptidos opioides endógenos (POEs) como intermediarios en la regulación de este mecanismo neurosecretor (Arroyo *et al.*, 2006).

5.1.4 Hormona luteinizante (LH)

La LH es una hormona clasificada dentro del grupo de las glucoproteicas y es secretada por la adenohipófisis, se encuentra constituida por 216 aminoácidos y su peso molecular oscila entre los 26000 y 30000 Da, con una vida media de 30 minutos y conformada con dos subunidades una α y otra β (Landefeld *et al.*, 1983; McDonald, 1991a).

El patrón secretor de LH es regulado por la concentración en sangre de progesterona y estradiol a través de mecanismos de retroalimentación (positiva o negativa) sobre las neuronas liberadoras de gonadotropinas en el hipotálamo. Esto se ha demostrado con animales ovariectomizados, puesto que estos animales al estar carentes de estas hormonas esteroideas, no pueden regular la secreción de LH, sin embargo, al administrar algún dispositivo de progesterona o estradiol la frecuencia de los pulsos de LH regresa a su normalidad (Roche *et al.*, 1974; Karsch *et al.*, 1980; Goodman *et al.*, 1982).

La LH actúa directamente sobre el folículo ovárico estimulando su desarrollo hacia la maduración, es por esta razón que la frecuencia de sus pulsos incrementan durante la fase folicular formando un pico antes de la ovulación precedido de un incremento de estradiol; dichos

pulsos alcanzan una frecuencia de un pulso cada 30 minutos al momento del pico preovulatorio, el cual tiene una duración aproximada de 12 a 24 horas y una concentración que va de 30 hasta 180 ng mL⁻¹. Contrariamente a este comportamiento, se ha observado que la frecuencia de los pulsos de LH durante la fase lútea disminuye, lo que se le atribuye al efecto de la progesterona, por ser capaz de inhibir la secreción de gonadotropinas (Karsch, 1984; Karsch *et al.*, 1997; Caraty y Skinner, 1999).

5.1.5 Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH al igual que la LH es una hormona glucoproteica, secretada por la hipófisis anterior; presenta un peso molecular de 32000 Da, con una vida media de 2 a 4 horas. Su estructura consta de dos subunidades (α y β), actúa directamente sobre las células de la granulosa del folículo ovárico estimulando la mitosis de éstas y la producción de estrógenos (E₂) necesarios en el crecimiento y desarrollo del folículo ovulatorio (McDonald, 1991b; Recabarren *et al.*, 2006).

La secreción de FSH se incrementa durante el crecimiento de los folículos en cada oleada folicular mediante la acción de las activinas, proteínas presentes en el líquido folicular (Shafiee-Kermani *et al.*, 2007), no obstante, existen otras proteínas como las inhibinas y folistatinas encargadas de regular la secreción de FSH, las cuales actúan como señales químicas retroalimentando de forma negativa sobre la hipófisis anterior, manteniendo el número de ovulaciones específico para cada especie. Sin embargo, esta inhibición en FSH no altera la secreción de LH por lo que el folículo puede continuar su crecimiento hasta la ovulación (Findlay, 1993; Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007).

5.1.6 Progesterona (P₄)

La P₄ es una hormona de tipo esteroidal, constituida por una cadena de 21 carbonos y secretada por el cuerpo lúteo, la placenta y la glándula suprarrenal, se sintetiza a partir del colesterol mediante acciones enzimáticas, partiendo de la conversión del colesterol a pregnenolona a través de la separación de la cadena lateral del colesterol mediante el complejo enzimático citocromo P-450 (P450_{scc}) en el interior de la mitocondria y, posteriormente, esta pregnenolona termina su biosíntesis en P₄ por la enzima 3β-hidroxisteroide deshidrogenasa/ Δ5 - Δ4 isomerasa (3β-HSD) en el retículo endoplásmico liso (Smith *et al.*, 1994; Niswender, 2002).

La función principal de la P₄ es preparar al endometrio para la implantación de embrión y mantener la posible gestación, para ello la P₄ inhibe movimientos en el miometrio e inactiva la actividad estral disminuyendo la secreción pulsátil de GnRH y LH, debido a estos procesos se considera a la P₄ como un regulador de la actividad reproductiva de la hembra y, es por esta razón que se utilizan sus análogos (progestágenos) en la sincronización del estros (Moss *et al.*, 1981; Caraty y Skinner, 1999; Uribe-Velásquez *et al.*, 2008). No obstante, se estima que una corta o larga duración de la fase lútea sincronizada puede ocasionar una elevación temprana de LH, originando un inadecuado desarrollo folicular y, en consecuencia, un mal desarrollo del cuerpo lúteo (Skinner *et al.*, 2000).

Las concentraciones de P₄ en sangre en la hembra ovina varían dependiendo de la fase del ciclo estral, durante la fase folicular sus concentraciones son casi indetectables y oscilan por debajo de 1 ng mL⁻¹, pero en la fase lútea alcanza valores que superan los 4 ng mL⁻¹ los cuales declinan cerca de los días 10 y 12 por acción de las prostaglandinas, que ocasionan la lisis del cuerpo lúteo, en caso de no existir una gestación (Nett *et al.*, 1976; Murdoch *et al.*, 1986; Molina *et al.*, 2005).

El mecanismo mediante el cual la P_4 inhibe la secreción de GnRH y LH aún no está determinado en su totalidad, debido a que esta hormona no posee receptores sobre las neuronas secretoras de GnRH (Arroyo *et al.*, 2006). Investigaciones en esta última década, muestran la participación del neurotransmisor ácido gama amino butírico (GABA) como el principal intermediario en la inhibición de la P_4 a los pulsos de GnRH, ya que durante la inhibición de LH se correlacionó un incremento en GABA sobre el área preóptica, no obstante, son necesarias mas investigaciones para esclarecer esta compleja red neural que regula el ciclo estral de la hembra (Robinson y Kendrick, 1992; Han *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Sullivan y Moenter, 2005).

5.1.7 Estradiol (E_2)

El E_2 es el principal estrógeno producido en las células de la granulosa del folículo ovárico a partir de andrógenos generados por células de la teca interna; se considera esencial en el comportamiento sexual mostrado por la hembra durante el estro, no obstante, se menciona que es necesaria la presencia de P_4 para una total expresión de E_2 ; es por esta razón que el E_2 alcanza una mayor concentración (21.1 pg mL^{-1}) al momento del pico preovulatorio, aunque se reportan pequeños incrementos a mitad de la fase lútea, los cuales comúnmente se relacionan con oleadas foliculares (Pant *et al.*, 1977; Caraty y Skinner, 1999).

El mecanismo endocrino que regula la acción del E_2 sobre la actividad reproductiva puede ser tanto positivo como negativo. El primero se da durante la estación reproductiva en donde la reducción en la concentración de P_4 aumenta la frecuencia en pulsos de LH, estimulando la síntesis de E_2 en los folículos que se encuentran en crecimiento, este incremento de E_2 retroalimenta de forma positiva sobre el hipotálamo medio basal (HMB), específicamente sobre núcleo ventromedial (NVM) generando una mayor descarga en la dupla GnRH/LH originando el

pico preovulatorio y la ovulación (Goodman, 1996; Caraty *et al.*, 1998; Wintermantel *et al.*, 2006).

El efecto negativo de E₂ sobre la secreción de gonadotropinas, ocurre en el periodo de anestro estacional y se menciona que el sistema dopaminérgico del núcleo A15 en el área retroquiasmática del hipotálamo es el encargado de regular dicho efecto, aunque no se han encontrado receptores para estradiol en esta área, se sugiere que podrían existir conexiones interneurales que regulen este proceso, así mismo, se estima que el E₂ puede actuar a nivel pituitaria en la inhibición de los pulsos de LH (Nett *et al.*, 1990; Skinner y Herbison, 1997; Goodman *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 2003).

5.1.8 Crecimiento y desarrollo folicular

La oveja al igual que las demás hembras domésticas nacen con una reserva determinada de ovocitos, los cuales representan una fuente de vida para perpetuar su especie; estos ovocitos interrumpen su crecimiento manteniéndose latentes en la fase de diploteno de la profase I en la meiosis hasta la pubertad para un posterior desarrollo completo, se caracterizan por presentar una capa plana de células formando una estructura en el ovario comúnmente denominada folículo primordial, en el caso de la oveja se han llegado a observar de 120 000 a 230 000, pero se estima que solo 250 y 1500 de estos folículos llegarán a iniciar su desarrollo y el resto de ellos sufrirán atresia por lo que no serán ovulados (Smeaton y Robertson, 1971; Baird, 1983).

El primer indicio del crecimiento folicular es el aumento de tamaño del ovocito seguido de la proliferación de células de granulosa a forma cuboidal llamado folículo primario, el incremento en número de capas de células de granulosa comienza a diferenciar las células de la teca transformando el folículo primario en folículo secundario; posteriormente, el folículo terciario continua con el crecimiento de las células de la granulosa formando un espacio

denominado antro folicular y por último tenemos al folículo preovulatorio o también llamado folículo de Graff en donde las células foliculares aumentan su tamaño y el antro se llena de líquido folicular colocando al ovocito hacia un costado y aumentando la presión en el folículo antes de la ovulación (Fortune, 1994; Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007).

El desarrollo de un folículo primordial hasta un folículo ovulatorio está regulado por una serie de procesos paracrinos y endocrinos dentro del ovario que incluyen la participación de gonadotropinas (FSH y LH), inhibinas, activinas, folistatinas, esteroides y factores de crecimiento (Martin *et al.*, 1991).

Referente a la foliculogénesis, en el desarrollo folicular se distinguen tres fases características de los folículos: reclutamiento, selección y dominancia, durante estas fases los folículos se vuelven más sensibles a las gonadotropinas principalmente en la fase de reclutamiento, en el caso de oveja los folículos empiezan esta fase cuando tienen un tamaño >2mm de diámetro, ocurre la transición de folículo primordial a primario, coincidiendo con la luteólisis en un tiempo aproximado de 72 h antes de la ovulación (López *et al.*, 1993; Armstrong y Webb, 1997). En estos folículos primarios se estima la participación del factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogénica del hueso (BMP15), que conforman a los 35 miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante $-\beta$, los cuales son requeridos para el crecimiento folicular; el GDF9 se considera esencial en el desarrollo folicular, ya que ratones carentes del gen que codifica esta proteína presentan alteraciones tempranas en el crecimiento folicular, y, por consecuencia, infertilidad (Juengel *et al.*, 2004) de igual forma, mutaciones en el gen que codifica la BMP15 ocasiona el mismo patrón de comportamiento en alteraciones foliculares en ovejas (Hanrahan *et al.*, 2004).

En la oveja se estima que la selección de folículos ocurre durante la fase folicular, en este caso se presentan folículos secundarios y terciarios (2 - 4 mm), característicos por tener las capas de granulosa y de la teca bien definidas con un antro folicular, además, estos folículos ya pueden secretar estradiol, inhibina y folistatina las cuales son necesarias para inhibir la secreción de FSH y de esta manera controlar el número de folículos que se desarrollaran hacia la ovulación (Souza *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 2004).

La dominancia es la fase en donde el o los folículos de mayor tamaño (5 – 6 mm), dependiendo de la especie, crecen constantemente y el resto de folículos subordinados sufren atresia (Rosales y Guzmán, 2008). Durante este proceso, el folículo dominante presenta una relación importante con los factores de crecimiento más comunes, entre los que se encuentran el factor de crecimiento parecido a la insulina o IGFs (Eckery *et al.*, 1997; Khamsi y Roberge, 2001), que están constituidos por dos ligandos los IGF-I y II, dos tipos de receptores específicos el 1 y 2, además de 6 proteínas acarreadoras (IGFBP's) encargadas de proporcionarles la bioactividad, siendo la IGFBP –3 la más abundante en sangre y en fluido folicular (Blat *et al.*, 1994).

Los IGFs estimulan la proliferación y diferenciación de células de la granulosa y de la teca, modulando la acción de las gonadotropinas a nivel celular, interactuando con la FSH para promover la producción de estradiol, esta actividad es mediada por las proteasas (PAPP-A pregnancy associated plasma protein -A) en el fluido celular, la cual se ha encontrado tanto en bovinos, ovinos, cerdos, así como en humanos (Lawrance *et al.*, 1999), el incremento en FSH induce la adquisición de estas proteasas que se encargan de degradar a la IGFBP intrafolicular para lograr la liberación de los IGF y posteriormente sinergizar con la FSH logrando un incremento en E₂, el cual a su vez, retroalimenta de forma negativa a la secreción de FSH

evitando con esto la presencia de otros folículos con PAPP-A, por lo que es una característica en folículos seleccionados para ejercer dominancia durante la próxima ovulación (Conover *et al.*, 2001).

5.1.9 Dinámica folicular

Al crecimiento continuo y regresión de los folículos antrales que conllevan hacia el desarrollo de un folículo preovulatorio se le conoce como oleadas foliculares; los estudios referentes a los cambios que presenta el ovario durante el ciclo estral, se realizaban a través de procesos quirúrgicos o de material de frigoríficos, sin embargo, la información contenía muchas contradicciones, lo que llevó a desarrollar tecnología propicia para estos trabajos, siendo la ultrasonografía la herramienta más útil; sus primeras aplicaciones fueron en bovinos gracias a la fácil manipulación del aparato reproductor de la hembra, no obstante, esta era una limitante en el caso de ovinos (Ginther *et al.*, 1989).

Recientemente la ultrasonografía realizó mejoras en sus equipos, desarrollando transductores transrectales más delgados que facilitó el estudio de la fisiología ovárica en los pequeños rumiantes, observándose de dos a tres oleadas foliculares e incluso hasta cuatro en las ovejas, las cuales emergen durante los días 0, 6 y 11 de su ciclo estral (Ravindra *et al.*, 1994; Viñoles *et al.*, 2002).

Las principales características observadas durante oleadas foliculares son:

- ❖ El folículo mayor de la oleada uno se presenta más grande que el folículo mayor de la oleada dos.
- ❖ La tasa de crecimiento desde el día de la emergencia (2 - 3 mm) hasta el día de máximo diámetro es de aproximadamente 1 mm/día.

- ❖ En promedio de 1.2 a 1.5 folículos alcanzan 5 mm de diámetro en cada oleada, aunque esto varía en relación a la raza estudiada.
- ❖ El intervalo entre la primera y segunda oleada es más largo que el de la segunda y tercera oleada (Noel *et al.*, 1993; Rubianes, 2000).

Por otra parte, existe evidencia de que las concentraciones séricas de FSH están asociadas con cada oleada folicular, seguido de un descenso por efecto negativo del estradiol secretado por el folículo dominante de la oleada, resultados similares se muestran también en el anestro, aunque las concentraciones de estradiol e inhibina presentan resultados contradictorios, lo que sugiere que estos folículos no ejercen una dominancia funcional durante este periodo (Bartlewski *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2001).

Actualmente el estudio de la dinámica folicular ha permitido un mejor manejo sobre la actividad reproductiva de la oveja, estableciendo nuevos programas de sincronización de estros aplicando el modelo de una oleada folicular, a través de alimentaciones estratégicas con dietas altas en proteína y energía, en donde se ha observado que el estado metabólico influye de manera directa sobre el crecimiento folicular y que ovejas con condición corporal de 4 (escala 1 – 5) presentan tres oleadas foliculares comparado con ovejas en baja condición (Viñoles *et al.*, 2002; Viñoles *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2007).

5.1.10 Estacionalidad

La oveja se caracteriza por ser un animal poliestrico estacional, es decir, presenta estros durante una estación del año regida bajo un fotoperiodo decreciente (menos horas luz), principalmente en aquellas razas que viven cerca de los polos en donde la variación de horas luz es mayor (Chemineau *et al.*, 1992). Aunque existen razas como la Blackbelly y Pelibuey de

climas tropicales que por su ubicación geográfica cerca del Ecuador presentan ciclicidad prácticamente durante todo el año (Cerna *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004).

La estacionalidad proporciona a la hembra una valoración del tiempo en el cual existan las condiciones propicias en temperatura ambiental y alimento para poder reproducirse, por lo tanto, también se considera determinante en el inicio de la pubertad, ya que ovejas nacidas fuera de la estación reproductiva difícilmente se reproducirán en ese año, sino que será hasta el año siguiente (Ebling y Foster, 1988; Foster *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1991; Herbosa *et al.*, 1994).

El mecanismo que le permite a la oveja detectar la estación reproductiva es a través de la secreción de melatonina, hormona secretada durante la oscuridad por la glándula pineal, de tal forma, que la oveja puede identificar el paso de las estaciones como un reloj endógeno e indicarle el momento apto para iniciar su reproducción (Malpaux *et al.*, 1989; Skinner y Malpaux, 1999).

La función endocrina de la melatonina consiste en un control de la liberación de GnRH, cambiando la sensibilidad hipotalámica a los estrógenos; sin embargo, se estima que la melatonina no actúa por si sola en este proceso, ya que no posee receptores sobre las células liberadoras de gonadotropinas, sino que este proceso es mediado por la acción de la dopamina, un neurotransmisor encargado de aumentar el efecto inhibitorio del estradiol durante el anestro estacional (Malpaux *et al.*, 1999; Arroyo *et al.*, 2006). En la oveja la melatonina reduce la producción de dopamina, mediante la acción enzimática, inhibiendo la tirosina hidroxilasa, de tal forma que se inicia la actividad reproductiva; esto ha sido demostrado en investigaciones en donde la aplicación de neurotoxinas (6 – hidroxidopamina) y antagonistas (pimozide)

dopaminérgicos ocasionan un aumento en la secreción pulsátil de LH durante el anestro (Thiéry *et al.*, 1989; Havern *et al.*, 1991).

5.2 Aspectos nutricionales y metabólicos y su influencia en los procesos reproductivos

5.2.1 Condición corporal

La condición corporal se refiere a la cantidad de grasa acumulada en el cuerpo relacionada con su masa muscular, esto representa para el animal un estado de bienestar y confort que le indican la etapa apta para iniciar su reproducción, no obstante, en la mayoría de los casos este aspecto no es tomado en cuenta durante los programas reproductivos y, por lo tanto, repercute en la fertilidad de la hembra (Manzano *et al.*, 1999).

La escala utilizada para clasificación de la condición corporal en ovinos es de 1 a 5 (1 = emaciada, 5 = obesa), la técnica para aplicar esta escala consiste en hacer presión con las manos sobre las apófisis espinosas de las vértebras lumbares y determinar la profundidad del músculo longissimus (Russel *et al.*, 1969), sin embargo, esta medición parece ser un poco confiable debido a que es subjetiva; actualmente el uso de equipos más sofisticados como el ultrasonido nos permite ser más precisos en la medición, aunque se requiere de una persona especializada en el manejo del equipo, así como del conocimiento acerca de las áreas y promedios de las mediciones (McLaren *et al.*, 1991).

Diversos estudios se han realizado en ovinos para determinar el lugar específico que represente una mayor relación con la grasa dorsal, la mayoría concluyen que la mejor área para esta medición es entre la doceava y treceava costilla (Edwards *et al.*, 1989; Hamlin *et al.*, 1995). Por su parte Greiner *et al.* (2003), mencionan que mediciones en esta área tienen una correlación de 0.66 a 0.69 con las mediciones realizadas en la canal, en tanto que Silva *et al.* (2005), encontraron que las mediciones de grasa dorsal van de 2.98 a 3.55 mm, con una correlación de

0.9 ($P < 0.01$), dichos resultados presentan semejanza con los encontrados por McLaren *et al.* (1991) en corderos en crecimiento.

La reserva corporal constituye un buen estado nutricional y por ende metabólico del animal, ya que ovejas con una buena condición (3 – 4) muestran incrementos en dinámica folicular (3 a 4 oleadas), tasa ovulatoria y fertilidad (Scaramuzzi y Radford, 1983; Quirke *et al.*, 1985b; Viñoles *et al.*, 2002). En contraste, cuando las hembras presentan pérdida de peso, lo cual comúnmente ocurre durante el periodo postparto, disminuye su actividad folicular incrementando el intervalo entre partos, además de causar variaciones en la secreción hormonal de gonadotropinas (Rutter y Randel, 1984; Lalman *et al.*, 1997; Meikle *et al.*, 2004), aunque se menciona que también en el preparto un desbalance corporal ocasiona cambios en el desarrollo fetal (DeRouen *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2001; Osgerby *et al.*, 2003).

5.2.2 Estado nutricional de la hembra

La nutrición constituye un elemento esencial en la eficiencia reproductiva de la hembra, debido a que la reproducción es una de las actividades fisiológicas que el animal realiza después de asegurar su mantenimiento y producción (leche, carne, lana). El aporte de nutrientes como proteína y energía son necesarios para realizar procesos que van desde la foliculogénesis hasta la gestación y lactancia, así como la secreción de hormonas que regulan estos procesos (Robinson *et al.*, 2006).

Por el contrario, un estado de desnutrición afecta de forma negativa sobre el eje hipotálamo – hipófisis – gonadal en la secreción de hormonas como estradiol, progesterona y luteinizante (Dunn y Moss, 1992; Boland *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2002; Wade y Jones, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Renquist *et al.*, 2008). Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que la falta de nutrientes afecta de manera directa sobre la calidad del oocito, desarrollo del embrión

y gestación (Peura *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2003; Abecia *et al.*, 2006; Borowczyk *et al.*, 2006), sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la nutrición afecta a la reproducción aún no están bien determinados, aunque se estima que el tipo de dieta (energética o proteica) y la conformación de sus ingredientes utilizada en la alimentación de los animales ocasionan estos cambios en la concentración hormonal, repercutiendo de manera directa sobre la fertilidad de la hembra (Boland *et al.*, 2000; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

5.2.3 Energía y proteína en respuesta del perfil endocrino y eficiencia reproductiva

La implementación de dietas energéticas y proteicas han sido utilizadas para buscar mejoras en los aspectos productivos y reproductivos de la hembra (Armstrong *et al.*, 2001). La proteína se requiere en los animales porque aporta aminoácidos esenciales, por lo tanto, su calidad depende del perfil de estos aminoácidos además de su digestibilidad; sus requerimientos en la hembra dependen del estado fisiológico (gestación y lactancia) y nivel de producción en que esta se encuentre (Cannas *et al.*, 1998).

El consumo de dietas altas en proteína se relaciona con una disminución en la fertilidad de la hembra (Adams *et al.*, 1994; McNeill *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2000): Canfield *et al.* (1990) utilizaron diferentes niveles de proteína (16 y 19%) en la alimentación de vacas, durante 20 d después del primer servicio, encontrando que las hembras alimentadas con un alto nivel de proteína presentan un menor porcentaje de gestación en comparación con hembras con un nivel bajo de proteína (31 vs 48%), se sugiere que este comportamiento se debe a alteraciones en el útero por acciones del nitrógeno de urea en plasma (PUN); esto fue comprobado por Rhoads *et al.* (2004), monitoreando los cambios que presenta el útero durante la infusión de urea (0.01 g urea/h por kg de peso vivo) encontrando que el PUN puede ejercer un efecto directo en el ambiente uterino por una disminución en el pH de 7.08 ± 0.07 a 6.88 ± 0.08 , lo que a su vez

repercute sobre la motilidad y supervivencia del espermatozoide en su recorrido por el útero hacia la fecundación, resultados similares muestran Ocon y Hansen (2003) durante la maduración y el desarrollo de oocitos en diferentes medios de urea. Así mismo, se menciona que el incremento en proteína está relacionado con aumentos de amoníaco en plasma, lo cual se considera tóxico no solo para la hembra sino también para el embrión en caso de gestación (Kaur y Arora, 1995).

En lo que respecta a la energía esta puede ser tomada de diversas fuentes (animal y vegetal) para la elaboración de dietas, sin embargo, esto origina una mayor diversidad en los resultados relacionados con los aspectos reproductivos. La deficiencia de energía retrasa el inicio de la pubertad y altera el ciclo estral de la hembra, reduce el porcentaje de ovulación, modifica la secreción de GnRH, P₄, E₂ y la frecuencia en los pulsos de LH (Spitzer *et al.*, 1978; Schillo, 1992; Schneider, 2004).

Kurz *et al.* (1990), observaron en vaquillas ovariectomizadas con implantes de estradiol que al reducir el nivel de energía en la dieta se inhibe la secreción de LH, pero cuando la energía se incrementa el mecanismo hipotálamo – hipófisis se restablece rápidamente, postulando que la energía regula la secreción de LH vía E₂, sin embargo, también existe una pequeña disminución en LH en ausencia del E₂, lo que lleva a pensar que existe una relación con el nivel de energía y la secreción de gonadotropinas. Estos resultados son contrarios a los encontrados por McShane y Keisler (1991), quienes mencionan que el nivel de alimentación no influyó sobre las concentraciones séricas de LH y FSH en respuesta a la infusión de estradiol en corderos, concluyendo que posiblemente la desnutrición a nivel ovario no sea una limitante de la mayoría de los factores que intervienen en el deterioro de la función reproductiva.

Por otra parte, O'Callaghan *et al.* (2000), evaluaron la alimentación en ovejas con 0.5, 1 y 2 veces los requerimientos de energía para su mantenimiento (M) sobre las características morfológicas del oocito, fluido folicular y concentración hormonal, encontrando que el número de folículos > 3 mm fue mayor en ovejas alimentadas con 2 M, pero, entre las ovejas alimentadas con 1 y 0.5 M no existieron diferencias. Respecto a la concentración de P₄ en el fluido folicular se observó que fue mayor en ovejas alimentadas con 0.5 M, comparada con la concentración presente en ovejas de los grupos que recibieron 1 y 2 M, dicho efecto posiblemente se debe a un incremento en el catabolismo de la P₄ tras el aumento en el nivel de alimentación, así mismo, no se presentó ningún cambio en la morfología del oocito. Banchemo *et al.* (2004), mencionan que dietas altas en energía suministradas durante las ultimas semanas de gestación traen consigo mejoras en la producción de calostro para los corderos, en particular para las ovejas con mellizos.

5.3 Lípidos en la alimentación de rumiantes

Los lípidos se consideran una excelente fuente de energía, accesibles y de bajo costo para la dieta; normalmente se encuentran en los forrajes en forma de ácidos grasos poliinsaturados esterificados como galactosilglicéridos; los cuales rara vez supera el 1.5 % de la materia seca en la dieta; aunque el contenido de ácidos grasos presente en cereales, semillas oleaginosas y grasas libres es variable, más elevado y en forma de triglicéridos (Plascencia *et al.*, 2005).

A diferencia de las demás especies animales el metabolismo de los lípidos en los rumiantes requiere de procesos como la hidrólisis y la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados libres (18:2 y 18:3) en el rumen. El primer proceso consiste en separar a las grasas en sus compuestos estructurales para su absorción (ácidos grasos y glicerol) mediante la acción de esterases unidas a las membranas microbianas y lipasas bacterianas presentes en el líquido

ruminal, gran parte de este fermentado forma ácidos grasos volátiles (AGV), en especial el propiónico, por medio de una glicerol-cinasa microbiana, sin embargo, existen grasas que permanecen intactas hasta el intestino delgado, las cuales son hidrolizadas por efectos de enzimas pancreáticas y biliares. Los ácidos grasos de cadena corta (AGV) de dos y seis carbonos son empleados por la microbiota o absorbidos a través de la pared del retículo-rumen, para posteriormente ser metabolizados en hígado o algún otro tejido en la síntesis de glucosa, grasa o cuerpos cetónicos, dependiendo del ácido de cadena corta que se trate, etapa productiva fisiológica y condición nutricional del animal. Así mismo, se menciona que la velocidad de hidrólisis ruminal está directamente relacionada con el grado de insaturación de las grasas, por lo tanto, los aceites son hidrolizados más rápidamente que las grasas de origen animal (Palmquist, 1991; Chilliard, 1993).

La hidrogenación, se basa en fijar hidrógeno sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados convirtiéndolos en saturados y reduciendo los principales centros reactivos al eliminar estos dobles enlaces; dicho proceso es regulado en mayor parte por los protozoos, debido a que han demostrado ser más activos durante la hidrogenación; es por esta razón que los ácidos grasos que conforman el tejido adiposo en los rumiantes presenta mayor cantidad de moléculas saturadas, en relación a las que contienen los alimentos que ingieren, lo que se atribuye al proceso de hidrogenación microbiana. De igual forma, se ha observado que la hidrogenación es más rápida en los ácidos grasos libres que en los esterificados, implicando la participación de esteresas y lipasas; por lo que la velocidad de hidrogenación representa un factor limitativo en el uso excesivo de grasas y efectos que provocan estos a nivel ruminal (Wu y Palmquist, 1991).

En general, la capacidad que poseen los microorganismos del rumen para digerir los lípidos es muy limitada, ocasionan una fermentación lenta de los carbohidratos y se reduce la ingestión de alimentos, esto a la larga trae como consecuencia la pérdida de peso y el desbalance metabólico del animal, lo que repercute a su vez de manera directa sobre los aspectos reproductivos, es por esta razón que se recomienda un nivel de grasa en la dieta no mayor al 6 % para no intervenir en estos procesos fisiológicos (Hess *et al.*, 2008).

5.3.1 Grasa de sobrepaso

La grasa de sobrepaso o también llamado grasa protegida fue desarrollada con la finalidad de reducir los problemas que se presentaban en la fermentación ruminal con las grasas naturales; este método de protección a las grasas le permitió mantener condiciones de pH habituales en el rumen, pasar a través de él y ser liberado en el medio ácido del abomaso para una absorción directa en el intestino (Monroy, 1999).

El uso de este tipo de grasas protegidas en la alimentación de rumiantes sugirió incrementar su nivel de inclusión hasta el 9 % en la dieta, aunque algunos investigadores mencionan haber utilizado cerca del 15 % en la alimentación en sus animales de engorda, sin embargo, se recomienda no sobrepasar los niveles básicos de inclusión debido a que se han reportado alteraciones en el consumo de materia seca (Bayourte *et al.*, 1993; Scott y Ashes, 1993).

Actualmente existe una diversidad de grasas protegidas tanto de origen animal como vegetal, no obstante, se menciona que los jabones cálcicos de ácidos grasos de aceite de palma (resultado de la combinación de ácidos grasos y calcio unidos mediante un enlace químico para formar una sal), representan una fuente confiable de grasa de sobrepaso para la elaboración de dietas en rumiantes, pues se caracterizan por ser insolubles y resistentes al ataque microbiano, no

recubren la fibra ni alteran la acción de los microorganismos en rumen, sin embargo, tienen el mismo objetivo que las demás grasas protegidas, incrementar la densidad energética sin producir alteraciones en el medio ruminal (Kowalski, 1997; Monroy, 1999).

5.3.2 Fuentes y tipos de grasas y sus efectos en la reproducción de rumiantes

El uso de grasas en la alimentación de rumiantes fue utilizada en primera instancia para mejorar las características de la leche y ayudar a la hembra en su desgaste metabólico (Palmquist y Moser, 1981; Khorasani y Kennelly, 1998; Harvatine y Allen, 2006), sin embargo, algunas variables reproductivas (presencia del estro, intervalo entre partos, porcentaje de gestación, prolificidad y perfil endocrino) mostraban variaciones en sus resultados, lo que despertó el interés de los investigadores por explicar el efecto que ejercían las grasas en estas variables reproductivas, no obstante, la diversidad de grasas existentes ampliaba el panorama de investigación.

En un estudio realizado por Lammoglia *et al.* (1997) evaluaron el efecto de una dieta con 5.2 % de grasa (salvado de arroz) comparada con una testigo (3.71 % grasa, sin salvado de arroz) en vacas Brahaman, durante su ciclo estral, encontraron que las vacas tratadas con 5.2 % de grasa en la dieta presentaban una mayor concentración de E_2 en el primer ciclo estral y de P_4 en el segundo ciclo estral en contraste a las vacas testigo.

Thomas *et al.* (1997) trabajaron con dietas en base a la diferente composición de sus ácidos grasos (saturados=ST, poliinsaturados=PU y altamente poliinsaturados=HPU) comparada con una dieta testigo (sin grasa), para evaluar el efecto de los ácidos grasos en el crecimiento folicular en vacas (F1: Brahaman x Hereford), encontraron un incremento en colesterol en todas las vacas suplementadas con grasa comparadas con las vacas testigo, además de un mayor número de folículos de tamaño mediano (4 a 9.9 mm) en el grupo de vacas con dieta basada en

ácidos grasos PU, comparado con los grupos que recibieron ácidos grasos ST y HPU, durante los días 5 al 9 del ciclo estral, por lo tanto, sugieren que existe un efecto de los ácidos grasos PU sobre el crecimiento folicular. Resultados similares muestran Robinson *et al.* (2002) cuando alimentaron a vacas con dietas en base a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), encontrando que las dietas suplementadas con PUFA reducen la concentración de P₄ durante la fase lútea temprana, lo que origina el incremento en folículos de tamaño mediano (5 a 10 mm).

Mattos *et al.* (2000) indican que las grasas pueden influir positivamente en la reproducción por alteraciones en la síntesis de hormonas esteroideas y prostaglandinas. Mencionan que los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolenico, eicosapentanoico y decosaexanoico) son capaces de inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la disminución de su precursor (el ácido araquidónico) a través de acciones enzimáticas, por lo que sugieren debe existir una alimentación estratégica vigilando el perfil de ácidos grasos en la dieta, de tal forma que se pueda disminuir la síntesis de prostaglandinas durante los primeros días de gestación y de esta manera reducir la mortalidad embrionaria.

Referente al uso de grasas protegidas o de sobrepaso (bypass fat) Espinoza *et al.* (1997) encontraron que su adición al 2.5 y 5 % de la dieta de ovejas Pelibuey incrementa las concentraciones en sangre de colesterol, lipoproteínas de alta densidad, además de progesterona, no obstante, la concentración de insulina disminuye conforme aumenta el nivel de grasa protegida. Resultados similares encontraron Choi *et al.* (2000) cuando utilizaron 30, 60 y 90 g de grasa protegida por kg de alimento en vacas, reportando que el incremento de grasa en la dieta reduce las concentraciones de insulina y además disminuye el consumo de materia seca, por lo tanto, sugiere que el bajo consumo de carbohidratos estructurales ocasiona una disminución en el

porcentaje molar de propionato (un potente liberador de insulina) lo cual posiblemente explica el decremento encontrado en las concentraciones de insulina (Choi y Palmquist, 1996).

5.4 Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPs) y síntesis de prostaglandinas

Los AGPs de 20 carbonos son los precursores de eicosanoides, un grupo de moléculas de carácter lipídico dentro de los cuales se incluyen a las prostaglandinas (PGs), además de tromboxanos y leucotrienos. Estas PGs son sintetizadas y liberadas en diferentes tejidos y órganos del cuerpo como la glándula mamaria, tejido adiposo, testículos, útero, cerebro y placenta, mediante un mecanismo autócrino y son metabolizadas en pulmones, hígado y riñón. Actualmente se conocen 3 series de PGs: las series 1 y 2 de PGs que se derivan de los AGPs Ω -6, teniendo como principal precursor al ácido araquidónico (AA, C20:4), y las PGs de la serie 3 provenientes del ácido eicosapentanoico (EPA) (Needleman *et al.*, 1986).

Investigaciones mencionan que las PGE1 y PGE2 funcionan como agentes luteotropicos, es decir, estimulan la secreción de progesterona para mantener el cuerpo lúteo (Weems *et al.*, 1997; Arosh *et al.*, 2004), contrario a la función de las PGF_{2 α} , las cuales causan la regresión del cuerpo lúteo (luteolíticos), proceso necesario para iniciar el nuevo ciclo estral, además, provocan contracciones uterinas las cuales ayudan en el transporte de los espermatozoides, facilitan la labor del parto y la involución uterina posterior del parto (Pate, 1994; Smith *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1998).

Para la síntesis de PGF_{2 α} es necesaria la presencia de AA (C20:4), el cual es tomado directamente de los ingredientes de la dieta o en dado caso puede ser sintetizado a partir de AL (C18:2) mediante acciones enzimáticas (Figura 1). Esta conversión de AL a AA se desarrolla mediante dos pasos principales; el primero es desaturación (inserción de un doble enlace en la

cadena) en la posición 5 y 6 por la enzima desaturasa, y posterior una elongación (adición de dos carbonos a la cadena) por la enzima elongasa (Wathes *et al.*, 2007).

Para iniciar el proceso de síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Figura 2) se requiere un estímulo externo, el cual inicia con la unión de la oxitocina (OT) a su receptor en el endometrio uterino (OTr) para posteriormente activar la actividad de la fosfolipasa A2 (FLA2) y fosfolipasa C (FLC) que actúan sobre los fosfolípidos de la membrana plasmática con la finalidad de incrementar la disponibilidad de AGPs para ser procesados por la prostaglandina H sintasa (PGHS), de tal forma que si el AGP es el AA nos generará PGs de la serie 1 y 2 como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (vía PGHS, Epoxigenasa, Lipoxigenasa) o en su caso ácido epoxieicosatrienoico (AEET) o leucotrienos (vía FLC, Diacilglicerol DAC), sin embargo, si el AGP es el EPA se producirán PGs de la serie 3.

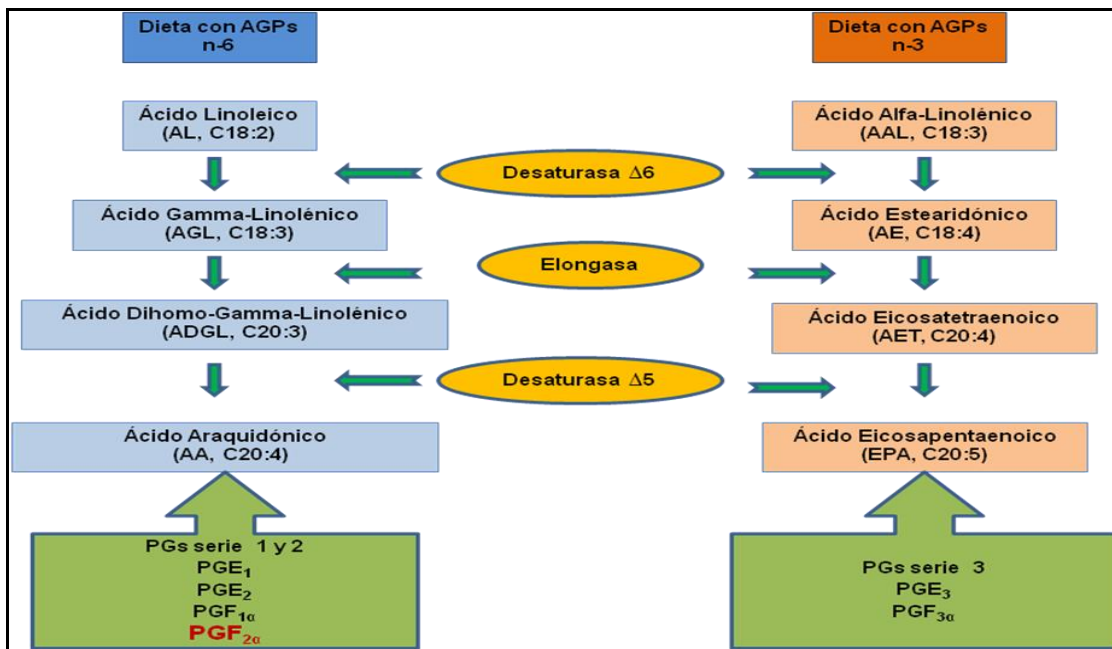


Fig.1. Representación esquemática que ilustra la generación de prostaglandinas (PGs) de las series 1, 2 y 3 referente a los tipos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) que conforman la dieta (Wathes *et al.*, 2007).

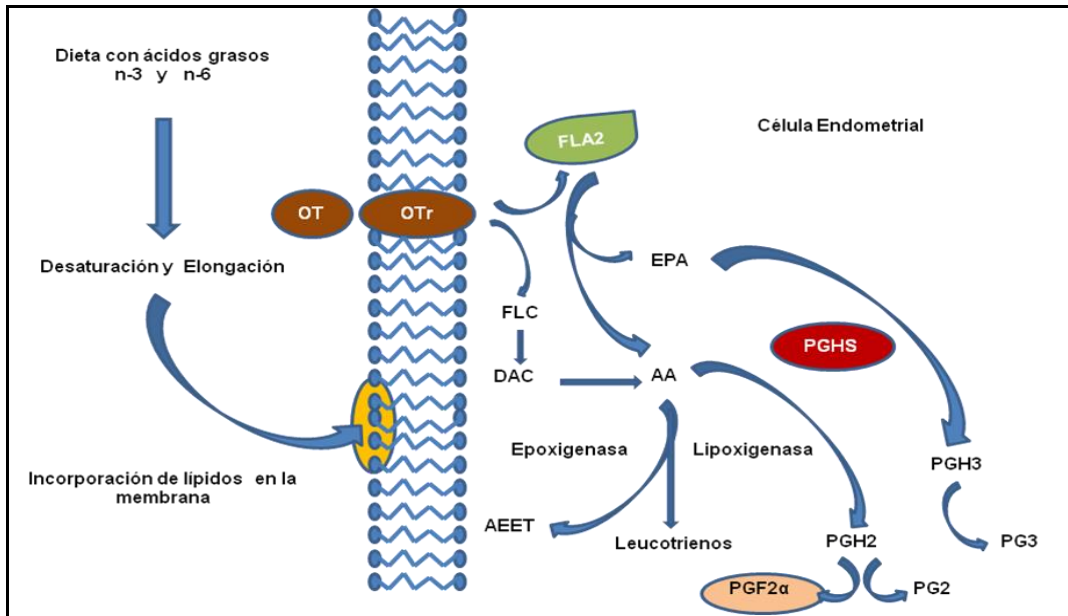


Fig. 2. Representación esquemática del metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) de la dieta (Ω 3 y 6) en la regulación de la síntesis de prostaglandinas $PGF_{2\alpha}$ (Mattos *et al.*, 2000).

5.4.1 AGPs en la regulación de la síntesis de prostaglandinas $F_{2\alpha}$

En diversas investigaciones se ha observado que los AGPs n-3 pueden disminuir la síntesis de $PGF_{2\alpha}$, esto a través de la disponibilidad de su precursor el AA o en cierta forma por la competencia enzimática de las enzimas PGHS con ácidos grasos como el EPA y DHA. Por ejemplo, en un estudio realizado por Mattos *et al.* (2002) en donde alimentaron a vacas lecheras durante 34 d con diferentes niveles de harina de pescado (FM) en la dieta (0, 2.6, 5.2 y 7.8 % FM) enriquecida con AGPs EPA y DHA, antes de la sincronización del estro (con inyecciones de 100 μ g GnRH y $PGF_{2\alpha}$ en los días 7 y 8 con 25 y 15 mg respectivamente), observaron que en el día 15 del ciclo estral sincronizado, posterior a las inyecciones vía intravenosa de 17- β estradiol (0.5 mg mL⁻¹) y oxitocina (100 UI), los grupos de vacas alimentadas con FM (2.6, 5.2 y 7.8 % FM) presentaron una disminución considerable en las concentraciones de los metabolitos de

PGF_{2α} (13-14 dihidro-15 keto-prostaglandina, PGFM) comparado con el grupo testigo (0% FM).

Por su parte, Caldari-Torres *et al.* (2006) también determinaron el efecto del ácido graso EPA en la producción de PGF_{2α} pero en células endoteliales de bovino (BEND) influenciadas por la cantidad de AL en el medio de incubación (AL:EPA), confirmando que existía una disminución en PGF_{2α} en células BEND ante la presencia de EPA, sin embargo, este efecto inhibitorio se reducía conforme incrementaba la relación de AL a EPA, sugiriendo que la inhibición de la síntesis de PGF_{2α} en el endometrio uterino por AGPs n-3 depende de relación existente de n-6 y n-3 en el útero.

5.4.2 Prostaglandinas F_{2α} y reconocimiento materno de la preñez

En rumiantes, mantener un alto porcentaje de hembras gestantes resulta redituable para el ható o rebaño ganadero, sin embargo, se estima que cerca del 20 y 30% de embriones bovinos mueren en los primeros 30 días de gestación, debido a una secreción temprana de PGF_{2α} y a un retraso en el reconocimiento materno (Ayalon, 1978; Thatcher *et al.*, 1995; Dunne *et al.*, 2000).

El reconocimiento materno está dado por una proteína llamada interferón tau (IFN-T), la cual es secretada por células del trofoblasto embrionario hacia el interior del lumen uterino; este proceso fisiológico ocurre aproximadamente durante el día 12 en ovejas y 16 en vacas, de sus ciclos estrales (Hafez y Hafez, 2000).

Así mismo, se ha observado que los AGPs Ω-3 modifican la síntesis de PGF_{2α} (Cheng *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005; Wamsley *et al.*, 2005), de manera que, al disminuir las concentraciones de PGF_{2α} podemos proporcionar el tiempo necesario para la secreción del IFN-T y de esta manera ayudar al reconocimiento materno.

En una investigación realizada por Burns *et al.* (2003), en donde alimentaron a vacas Angus con harina de pescado (FM) enriquecida con EPA y DHA (FM, 5.1 % de la dieta) comparado con otro grupo de vacas alimentado con harina de gluten de maíz (CGM, 8.5% de la dieta), se observó que el grupo de FM presentaba una mayor concentración de EPA y DHA en plasma respecto al grupo con CGM a los 35 d de alimentación con las dietas, de igual forma, se presentó una mayor cantidad de EPA en el endometrio para el grupo FM comparado con el grupo CGM, concluyendo que la harina de pescado en la dieta altera la composición de AGPs Ω -3 tanto en el plasma como en el endometrio, resultados similares reportan Heravi *et al.* (2007) en donde alimentaron a vacas lecheras con diferentes niveles de harina de pescado en la dieta (1.25, 2.5 y 5%), sin embargo, mencionan que este cambio de AGPs Ω -3 en el endometrio no modificó la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Mattos *et al.* (2003), determinaron el efecto de los AGPs (AA n-6, AAL, EPA y DHA n-3) y el interferón tau bovino recombinante (bIFN-T), en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células endometriales bovinas (BEND) por estimulación de la proteína quinasa C con dibutirato 12,13 de forbol (PDBu), encontraron que efectivamente los AGPs AAL, EPA y DHA estimuladas por PDBu interfieren en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, presentado un mayor efecto inhibitorio en $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte del EPA y DHA que del AAL, de igual manera, se encontró una inhibición en $\text{PGF}_{2\alpha}$ por bIFN-T aunque el mecanismo difiere del de EPA y DHA, posiblemente este efecto es mediado por la actividad enzimática de la prostaglandina- endoperóxido sintasa 2(PGSH-2) por parte del EPA.

En general, el uso de AGPs Ω -3 en la dieta se ve reflejado en el plasma y endometrio uterino, este proceso inhibe la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, por lo tanto, puede ser utilizado como una

estrategia en el desarrollo reproductivo para ayudar a la supervivencia embrionaria y mejorar la fertilidad de la hembra.

5.4.3 Influencia de los AGPs en la respuesta ovárica y embrionaria

La utilización de grasas en las dietas para rumiantes como fuente de energía ha mostrado mejoras en su sistema reproductivo. Estudios recientes revelan que los AGPs influyen en el crecimiento folicular, calidad del oocito y, por consecuencia, en el desarrollo embrionario (Lozano *et al.*, 2003; Borowczyk *et al.*, 2006; Bilby *et al.*, 2006).

En una investigación realizada por Thomas *et al.* (1997) determinaron el efecto de los diversos ácidos grasos de la dieta en el crecimiento folicular, comparando una dieta testigo (CT, sin grasa) contra otras dietas que contenían ácidos grasos saturados (SAT, cebo animal), poliinsaturados (PU, aceite de soya) y altamente poliinsaturados (HPU, aceite de pescado), encontraron que el grupo de PU incrementó el número de folículos de tamaño mediano (4 a 9 mm) comparado con los grupos CT, SAT y HPU, durante los días 5 y 9 del ciclo estral, correspondientes a la tercera semana de alimentación, de igual forma, reportan un aumento en las concentraciones de insulina, colesterol y hormona de crecimiento en suero, además del incremento de IGF-I en fluido folicular para todas las dietas con grasa (SAT, PU y HPU) comparadas con la dieta testigo, posiblemente el aumento en las concentraciones de estas hormonas se deba a la proliferación celular relacionada a la actividad folicular.

Zachut *et al.* (2008) evaluaron el efecto de la grasa protegida enriquecida en ácidos grasos insaturados (UFAs, oleico y linoleico) en tres grupos de vacas lecheras, el primero como grupo testigo (GT, sin grasa), el segundo con bajo (LUFA) y el tercero con alto (HUFA) contenido de UFAs en las dietas; encontraron un mayor diámetro en los folículos preovulatorios para el grupo HUFA (15.4 mm) comparado con los grupos GT (11.8 mm) y LUFA (10.5 mm);

conjuntamente con un incremento en las concentraciones de estradiol (E_2 , 3523.6 ng mL⁻¹) y androstenediona (A_4 , 416.7 ng mL⁻¹) en fluido folicular para el grupo HUPA contrastado con los grupos LUFA (E_2 , 867.6 ng mL⁻¹, A_4 , 36.0 ng mL⁻¹) y GT (E_2 , 1490.5 ng mL⁻¹, A_4 , 136.9 ng mL⁻¹), concluyendo que los UFAs en la dieta presentan efectos benéficos en el tamaño del folículo preovulatorio y esteroidogénesis, aunque los mecanismos no están totalmente definidos.

Childs *et al.* (2008) también evaluaron el efecto de los AGPs Ω -3 presentes en el aceite de pescado (FO) en algunas variables reproductivas en vacas, para lo cual utilizaron cuatro niveles de FO parcialmente protegido: 0 g o grupo testigo (CON); 65 g grupo bajo (LOW; 39 g EPA, 26 g DHA); 140 g o grupo medio (MED; 84 g EPA, 56 g DHA); 275 g o alto (HIGH; 165 g EPA, 110 g DHA), con base en materia seca de la dieta. En general no encontraron diferencias por efecto de las dietas en las concentraciones de progesterona y estradiol; sin embargo, el tamaño del cuerpo lúteo (CL) si fue diferente conforme incrementaba el nivel de FO en la dieta (CON 17.5 ± 1.17 ; LOW 19.8 ± 1.17 ; MED 25.7 ± 1.17 ; HIGH 24.1 ± 1.05) en el día 7 posterior al estro sincronizado, aunque este incremento en tamaño del CL no fue relacionado con la concentración de progesterona; no obstante, mencionan que existió una alta concentración de metabolitos de PGF 2α (13-14 dihidro-15 keto-prostaglandina, PGFM) en los grupos alimentados con FO (LOW, MED, HIGH) comparados con el grupo testigo (CON), en el día 15, posterior a la inyección intravenosa de oxitocina (50 UI), así mismo, reportan una correlación positiva entre las concentraciones de EPA ($R^2=0.86$) y el total AGPs Ω -3 ($R^2=0.77$) el endometrio uterino y el plasma; y concluyen que el uso de AGPs Ω -3 en la dieta puede ser manipulado para mejorar la fertilidad aumentando los porcentajes de gestación.

Por otra parte, Herrera-Camacho *et al.* (2008) evaluaron la tasa ovulatoria y el desarrollo embrionario de ovejas Pelibuey en respuesta al consumo de AGPs presentes en el aceite de maíz

(AM, 4% de materia seca en la dieta) comparado con un grupo testigo (SM, 0% de aceite), y reportaron que existió un aumento en el número de cuerpos lúteos, células colectadas totales y embriones (14.73 ± 1.87 ; 9.18 ± 2.16 ; 6.72 ± 1.78 , respectivamente) en el grupo AM comparado con el grupo testigo (10.73 ± 1.42 ; 4.18 ± 1.36 ; 3.09 ± 1.36 , respectivamente), conjuntamente con un mayor número de embriones en estado de mórula en el grupo AM (5.90 ± 1.59) respecto al grupo SA (2.18 ± 1.30), aunque la adición de AM no mejoró la calidad morfológica embrionaria (excelente, buena, regular y mala), reafirman que efectivamente los AGPs tienen un efecto en la respuesta ovulatoria en términos de número de cuerpos lúteos y embriones en estado de mórula, no obstante, mencionan que es necesario realizar nuevas investigaciones para implementar a los AGPs en la dieta como una alternativa en mejoras de la prolificidad de los ovinos.

Como otra alternativa para mejorar la fertilidad, los AGPs han sido utilizados con la finalidad de modificar los componentes de la membrana plasmática celular, aunque la mayoría de los estudios han sido enfocados en los espermatozoides (Sanocka y Kurpisz, 2004; Whates *et al.*, 2007), se sugiere que su uso en la hembra está relacionado con una mejor fluidez de la membrana, facilitando el intercambio de nutrientes y metabolitos requeridos en el desarrollo del ovocito y del propio embrión (Zeron *et al.*, 2001).

5.4.4 Efecto de los AGP sobre el desarrollo del ovocito

La ovogénesis es la gametogénesis femenina, es decir, el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica y se lleva a cabo en los ovarios. Este proceso se produce a partir de una célula diploide y se forman como productos una célula haploide funcional (el óvulo) y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares).

Si bien la ovogénesis es un proceso natural, el uso de aceite y harina de pescado no pueden modificar de manera directa este mecanismo, sin embargo, si pueden causar variaciones en las estructuras que se desarrollan; se ha demostrado que ovocitos de muchas especies contienen altos niveles de ácidos grasos (McEvoy *et al.*, 2000), estos ácidos grasos son utilizados como fuente de energía principalmente durante la maduración del ovocito e incluso pueden extenderse su uso hasta el desarrollo embrionario antes de su implantación (Adamiak *et al.*, 2005).

Está determinado que las señales endocrinas y metabólicas regulan el crecimiento folicular y también el desarrollo del ovocito a través de cambios hormonales, concentración de factores de crecimiento en fluido folicular o vía interacción ovocito-granulosa (Webb *et al.*, 1999), por ejemplo, cambios en el consumo de energía durante periodos cortos influyen tanto en la morfología del ovocito como en su potencial desarrollo (Adamiak *et al.*, 2006).

Elevados niveles de grasa en la dieta pueden influir sobre el contenido de ácidos grasos en la membrana o en el citoplasma de los ovocitos, reportes indican que cambios en la concentración de ácidos grasos en el fluido folicular durante el verano pueden influir sobre la fertilidad en vacas (Bilby *et al.*, 2006); e incrementos en los niveles de AGP durante el invierno pueden influir sobre los ovocitos ovinos a la resistencia al enfriamiento (Zeron *et al.*, 2002).

En vacas, la suplementación con AGP (omega 3 y 6) induce severos cambios en aspectos de folículogénesis, incluyendo el número total de folículos y el tamaño del folículo dominante o pre-ovulatorio (Ambrose *et al.*, 2006); en ovejas la suplementación con AGP en grasas protegidas incrementa el número de folículos y ovocitos en ovarios, mejorando el número de

ovocitos de alta calidad, con mayor cantidad de AGP en plasma y células del cumulus (Zeron *et al.*, 2002).

Zachut *et al.* (2008), mencionan que la inclusión de AGP en la alimentación de vacas incrementa el tamaño y el contenido de hormonas esteroideas en folículos pre-ovulatorios; Sturmei *et al.* (2009), concluyen que existe evidencia de que los ovocitos y embriones utilizan los lípidos endógenos como substratos de energía, Herrera-Camacho *et al.* (2008), reafirman que efectivamente los AGPs desarrollan un efecto en la respuesta ovulatoria en términos de número de cuerpos lúteos y embriones en estado de mórula, no obstante, mencionan que es necesario realizar nuevas investigaciones para incorporar a los AGPs en la dieta como una alternativa para mejorar la prolificidad de los ovinos; a este respecto, Fouladi-Nashta *et al.* (2007), mencionan que el uso de AGP puede beneficiar al ovocito no solo en crecimiento y desarrollo durante su maduración, sino también para el embrión y el periodo de pre-implantación.

5.4.5 Uso de AGP en la calidad embrionaria y la criopreservación

La utilización de grasas en las dietas para rumiantes como fuente de energía ha mostrado mejoras en su sistema reproductivo. Estudios recientes revelan que los AGPs pueden influir en el crecimiento folicular, calidad del oocito y, por consecuencia, en el desarrollo embrionario (Borowczyk *et al.*, 2006; Bilby *et al.*, 2006).

Sin embargo, los resultados referentes a la calidad embrionaria no son expresados en forma positiva, Ponter *et al.* (2012), mencionan que la alimentación con AGP a vacas no modifica el número y calidad de ovocitos y embriones recuperados y producidos *in vitro*.

Por otra parte, respecto a la criopreservación del embrión, se menciona que frecuentemente presenta fracturas en la zona pelúcida y membrana citoplasmática posterior a su

descongelamiento lo que induce una alta tasa de muerte celular embrionaria (Cuello *et al.*, 2007). El lípido contenido en los embriones es un indicador importante tanto para la calidad como para la criotolerancia durante el enfriamiento y congelación; Pereira *et al.* (2008), propusieron la incorporación directa de ácido linoleico y ácido octadecadienoico dentro de la membrana embrionaria durante su cultivo *in vitro* contribuyendo a la fluidez de la membrana y sugieren que esto posiblemente podría mejorar la resistencia del embrión a la criopreservación.

5.4.6 AGP en la espermatogénesis y características seminales

La espermatogénesis se define como un proceso natural que inicia en la pubertad, cuya finalidad es formar una estructura que protege y transporta material genético del espermatozoide hasta el otro material genético contenido en el ovulo (Guyton y Hall, 2006); este proceso de manera general se divide en tres etapas: la primera llamada espermatocitogénesis en donde se producen las células madre y los espermátocitos mediante la división mitótica; la segunda es la meiosis, en este proceso se reduce el número de cromosomas de un estado diploide a un haploide dando origen a las espermátidas; y por último en esta etapa se produce una diferenciación de la espermátida esférica a madura, la cual es liberada a la luz del túbulo seminífero como espermatozoide (Llamos, 2006).

En la espermatogénesis también se desencadenan procesos biológicos importantes y es aquí donde tendría importancia la incorporación de ácidos grasos provenientes de la harina y el aceite de pescado; estos son: los cambios lipídicos de la membrana plasmática del espermatozoide y la peroxidación lipídica; además de la apoptosis de células germinales no competentes. Durante el traslado del espermatozoide por el epidídimo se incorporan lípidos a la estructura de la membrana, principalmente fosfatidilcolina y los ácidos grasos insaturados. La distribución de los ácidos grasos se puede modificar presentando un mayor predominio de los

insaturados en la cola y los saturados en la cabeza; por lo que, estos cambios son relacionados directamente con aumentos en la actividad flagelar y movilidad del espermatozoide (Llamos, 2006).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) han sido detectados desde hace tiempo en los espermatozoides de diversas especies animales, incluyendo al hombre (Alvarez *et al.*, 1995), al carnero, toro, verraco (Poulos *et al.*, 1986), además aves como el gallo, pato y pavo (Surai *et al.*, 1998). Sin embargo, en la última década han retomado su importancia por su relación con la fertilidad; en este tenor, Wathes *et al.* (2007) mencionan que los ácidos grasos insaturados proporcionan cierta fluidez a la membrana del espermatozoide, la cual es necesaria en la fusión de membranas principalmente en eventos asociados con la fertilización.

La composición de la membrana plasmática desarrolla una función determinante en la fluidez, en la motilidad y viabilidad del espermatozoide (Miller *et al.*, 2004). En las aves, los AGPs más abundantes en los espermatozoides son los Ω -6 con el ácido araquidónico (5 y 9%) y el docosahexaenoico con el 15 y 21% (Blesbois *et al.*, 1997), de igual manera ocurre en los verracos, aunque el principal ácido graso es el docosapentanoico (DPC); sin embargo, ninguno de estos AGPs están relacionados con mejoras en la motilidad del espermatozoide; en contraste, el ácido graso docosahexaenoico (DHA) se relaciona positivamente con esta variable. Resultados similares se han documentado en el espermatozoide de humanos (Aksoy *et al.*, 2006), mientras que dietas basadas en ácidos grasos saturados y Ω -6 se correlacionan negativamente con la motilidad y la viabilidad (Safarinejad *et al.*, 2010).

Sin duda alguna los AGPs desempeñan una función importante en la fluidez de la membrana del espermatozoide y a la susceptibilidad en la peroxidación lipídica, lo que favorece a la

fertilidad del gameto (Blesbois *et al.*, 2004; Am-in *et al.*, 2011); sin embargo, en otros estudios en humanos (Conquer *et al.*, 2000), en pavos (Zaniboni y Cerolini, 2009), en conejos (Gliozzi *et al.*, 2009) y en verracos (Paulenz *et al.*, 2000) los resultados son contradictorios y no parece existir efecto de los AGP Ω -3 sobre la calidad del semen; esta variabilidad en los resultados se debe posiblemente a la gran cantidad y tipos de grasas en las dietas específicamente en los Ω -3.

Aunque está determinado que el DHA es el principal AGP presente en el esperma del humano y en la mayoría de las otras especies mamíferas (Tavilani *et al.*, 2006) también es el principal puente con los fosfolípidos que ayuda a desarrollar un mayor funcionamiento en la fluidez de la membrana del esperma (Ollero *et al.*, 2000). En verracos se ha determinado que la suplementación con estos Ω -3 incrementa la motilidad progresiva de los espermias y disminuye el porcentaje con morfología anormal (Rooke *et al.*, 2001). Maldjian *et al.* (2005), reportan que la adición de 3 % de aceite de pescado en la dieta de verracos incrementa el contenido de DHA en el esperma del 33 al 45 % y aumenta el número de espermias por eyaculado. Estienne *et al.* (2008), encontraron que el número de espermias incrementó y que incluso algunas características de la conducta sexual fueron alteradas en verracos alimentados durante 7 semanas con AGP Ω -3.

Por lo tanto, la inclusión de AGP provenientes de harina y aceite de pescado pueden ser utilizados como una estrategia para mejorar las características seminales principalmente en motilidad y viabilidad espermática, y posiblemente en concentración; no obstante, debemos tener en claro que no está totalmente determinado el funcionamiento de los Ω -3, por la controversia que presenta en sus resultados, por lo que son necesarias investigaciones futuras, y actualmente enfocadas no solo a los beneficios de los AGP, sino también a la susceptibilidad que presentan los AGP a las especies reactivas del oxígeno (ERO) y sus efectos en la fertilidad del macho.

5.4.7 AGP y la capacidad del semen a la criopreservación

La criopreservación de semen es un método utilizado para almacenar material genético durante un largo tiempo y permitir que este pueda estar disponible en el momento que se requiera; sin embargo, en este proceso ocurren eventos traumáticos como el enfriamiento, congelamiento y la misma descongelación del semen lo que hace que esta técnica presente complejidad para otras especies. Por lo tanto, la estructura de la membrana del espermatozoide se considera esencial, ya que regula no únicamente los cambios extracelulares, sino también los procesos de fertilización (Flesch y Gadella, 2000), en este tenor, la diferencia en la composición de los lípidos de la membrana del espermatozoide sugiere ser el factor clave para la diferenciación de los espermatozoides susceptibles a congelamiento (Parks y Lynch, 1992).

En la mayoría de los espermatozoides de especies mamíferas, cerca del 60 % del total de los ácidos grasos son AGPs de la familia Ω -3, lo que genera la fluidez de la membrana debido a la mayoría de sus dobles enlaces (Nissen y Kreysel, 1983; Erickson, 1998), estas características específicas en las membranas deben dar una mayor resistencia a los daños ocasionados por la formación de cristales de hielo en el congelamiento (Bwanga *et al.*, 1991); sin embargo, este proceso de criopreservación en el verraco no es común, a pesar de que la composición de AGP en su espermatozoide es interesante, debido a que contiene el 25 % de docosapentanoico (DPA) y el 30 % de docosahexanoico (DHA), lo que recae nuevamente en nuestra pregunta como específicamente la composición de estos ácidos grasos contribuyen a la congelación de este gameto (Penny *et al.*, 2000; Rooke *et al.*, 2001).

Un componente clave utilizado durante el enfriamiento y posterior congelación son los lípidos. Los lípidos son el principal constituyente de las membranas y los daños en la misma pueden deberse a su composición, por esta razón uno de los crioprotectores naturales más

utilizados durante el congelamiento es la yema de huevo, la cual contiene una gran cantidad de lípidos los cuales interactúan con los de la membrana de los espermatozoides, se sugiere que debe existir un sinergismo entre varios componentes que contiene la yema de huevo y son utilizados por el espermatozoide como antioxidantes, AGP y microelementos (Kundu *et al.*, 2000).

Watson (2000), menciona que son varias causas que reducen la fertilidad con semen criopreservado, los factores que afectan el semen para la proporción de sobrevivientes son: la susceptibilidad del choque térmico o de frío, la velocidad de enfriamiento, la composición del diluyente y el estrés osmótico; y los factores que influyen en el estado funcional del sobreviviente: la estabilidad de la membrana, el daño oxidativo, los receptores de la membrana y la estructura nuclear.

Con base a lo antes mencionado, se puede decir que los AGP presentes en la harina y aceite de pescado pueden ayudar al proceso de criopreservación del semen ovino, principalmente por el incremento de DHA el cual debería incrementar la fluidez de las membranas del espermatozoide lo que disminuiría el daño en las membranas durante el congelamiento; no obstante, debemos tener en cuenta que son solo hipótesis. Por otra parte, es conocido que la criopreservación tiene un efecto oxidativo que se podría acelerar por la alta disponibilidad de los AGP en las membranas, por lo que, el uso de antioxidantes en los diluyentes durante el enfriamiento y congelación pueden ayudar positivamente en este proceso, aunque para esto son necesarias investigaciones futuras.

5.5 Hormonas metabólicas

5.5.1 Leptina

La leptina es una proteína secretada principalmente por el tejido adiposo, está constituida por 167 aminoácidos y tiene un peso molecular de 16 kDa, fue descubierta en 1994 como

producto del gen *ob* en roedores, está relacionada con la obesidad, regulación del apetito y procesos reproductivos (Houseknecht *et al.*, 1998; Margetic *et al.*, 2002). Su estudio se ha basado principalmente en ratones y humanos, no obstante, en años recientes despertó el interés en rumiantes como bovinos, ovinos y cabras, debido a que se considera un indicador del estado nutricional y metabólico del animal (Caprio *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2005).

Delavaud *et al.* (2000) mencionan que existe una correlación de 0.68 y 0.72 entre el tejido graso acumulado y la condición corporal de los ovinos con los niveles de leptina en plasma, por lo tanto, alteraciones en la reserva de grasa corporal pueden modificar la respuesta reproductiva en los animales; aunado a esto, se menciona que existen receptores para leptina sobre el núcleo arcuato y ventromedial del hipotálamo, lo cual posiblemente modifica la secreción de gonadotropinas, aunque esto no está bien determinado, se ha establecido una relación entre el nivel del consumo de alimento y la leptina secretada (Cunningham *et al.*, 1999; Blache *et al.*, 2000; Hileman *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2002).

Henry *et al.* (2001) encontraron que la restricción de alimento en ovejas ovariectomizadas reduce la amplitud de los pulsos de LH ($2.0 \pm 0.2 \text{ ng mL}^{-1}$) comparado con amplitud de LH presentada en ovejas alimentadas *ad libitum* ($3.5 \pm 0.6 \text{ ng mL}^{-1}$), no obstante, cuando se administró leptina (4 $\mu\text{g/h}$) a las ovejas restringidas de alimento, la concentración de LH incrementó ($P < 0.05$) volviendo a sus niveles normales, resultados similares reportaron Morrison *et al.* (2001) al administrar en ovejas 1.25 $\mu\text{g/kg/h}$ de leptina ovina recombinante, mediante cánulas cerebroventriculares, durante ocho días, demostrando que las concentraciones de leptina cambian en respuesta a la reducción del estado nutricional, además de ser capaz de regular múltiples procesos fisiológicos incluyendo el consumo de alimento y la función neuroendocrina.

Existe evidencia de la participación de la leptina sobre las gónadas (Clarke y Henry, 1999); respecto a esto, Kendall *et al.* (2004) encontraron que la infusión de una dosis baja de leptina (2 µg/h) en la arteria ovárica disminuye la concentración de estradiol ($209 \pm 100 \text{ ng mL}^{-1}$) comparada con una dosis alta (20 µg/h, $1609 \pm 1731 \text{ ng mL}^{-1}$; respectivamente), concluyendo que la leptina es capaz de modular la esteroidogénesis directamente en el ovario e intensamente en los rumiantes, por lo tanto, la denominan como un regulador alterno en la actividad reproductiva.

5.5.2 Insulina

La insulina es una hormona de origen proteico, secretada en las células B de los islotes de Langerhans, permite el transporte de glucosa a través de las membranas celulares, por lo que su concentración en sangre es dependiente de la disponibilidad de glucosa. Se estima que la insulina también actúa como señal metabólica debido a la relación que mantiene con glucosa; esto ha sido de gran interés para estudios del área reproductiva, y más aún, porque posee receptores sobre el núcleo arcuato y la eminencia media, neuronas generadoras de GnRH (Van Houten y Posner, 1981; Miller *et al.*, 1998).

En un experimento realizado por Leury *et al.* (1990) donde administraron 15 UI de insulina por oveja al día, no se observaron aumentos en la tasa ovulatoria, esto posiblemente se debió a que una sola dosis de insulina no fue capaz de causar estímulos para cambiar la respuesta reproductiva; sin embargo, resultados similares obtuvieron Downing y Scaramuzzi (1997) al utilizar insulina bovina en dosis de 0.4 UI/kg/d, por un periodo de 72 h, durante la fase lútea de la oveja, reportando que tampoco existió diferencia en la tasa ovulatoria entre el grupo tratado con insulina (1.9 ± 0.07) comparado con el grupo testigo (2.0 ± 0.10 , solución salina); no obstante, la frecuencia de los pulsos de LH (4.3 ± 0.4 vs 1.8 ± 0.3 pulsos por 24 h) y la

concentración en plasma de LH (0.48 ± 0.04 vs 0.32 ± 0.03 ng mL⁻¹) fueron significativamente reducidos en el grupo tratado con insulina al compararlo con los presentados por el grupo testigo, este efecto se atribuye a la hipoglucemia ocasionada por la aplicación constante de insulina, la cual fue capaz de inhibir la secreción de LH, por lo tanto, se considera a la insulina como mediador en el funcionamiento normal del eje hipotálamo – hipófisis.

En otro estudio, Downing *et al.* (1999) evaluaron el efecto de la infusión de insulina, de glucosa o ambas al mismo tiempo en la arteria ovárica de la oveja, por un lapso de 13.5 h en el día 11 del ciclo estral, encontrando que la administración por separado tanto de insulina como de glucosa no ejercen ningún efecto sobre la secreción de androstenediona y E₂; sin embargo, cuando estas son administradas juntas androstenediona y E₂ disminuyen su concentración considerablemente, estos resultados muestran que se requiere una participación de glucosa e insulina al mismo tiempo para influir sobre el funcionamiento del ovario, y posiblemente intervenir en la respuesta de la tasa ovulatoria.

Por su parte, la glucosa es considerada como un indicador del estado nutricional del animal, porque posterior al consumo de alimentos (energéticos o proteicos) existe el incremento de su concentración en plasma, la cual a su vez es regulada directamente por la insulina. Este comportamiento llevó a diversos investigadores a realizar estudios para determinar si existía algún efecto sobre los aspectos reproductivos y en esencia, los resultados presentaron variaciones (Howland *et al.*, 1966; Prior y Christenson, 1978; Rutter y Manns, 1986).

Se estima que la falta de energía ocasiona cambios que pueden alterar la secreción de gonadotropinas, sin embargo, no determinan una acción directa de la glucosa sobre las células liberadoras de GnRH, esta respuesta podría deberse a la interacción que existe con hormonas

como la insulina y la leptina (Ohkura *et al.*, 2004; Archer *et al.*, 2005). Por otra parte, los experimentos a nivel de ovario reflejan modificaciones por la glucosa, entre ellos Rubio *et al.* (1997) reportaron que la infusión de 50 g de glucosa (100 mL al 50 % de dextrosa) ocasiona el incremento de glucosa e insulina en plasma, y en consecuencia, un aumento en producción de P₄ durante la fase lútea, por lo que sugieren que ambas hormonas influyen sobre la esteroidogénesis del ovario, no obstante, no se mejoró el aspecto reproductivo de la oveja.

Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002), muestran que la infusión de glucosa (50 mmol/h) por cinco días antes del retiro de una esponja de FGA, modifica la foliculogénesis en el reclutamiento (3-4 mm) y selección (> 6 mm) de folículos, dicho efecto es independiente de la FSH, pero se atribuye a los cambios en las concentraciones del sistema leptina; resultados similares encontraron Letelier *et al.* (2008) en ovejas tratadas con administraciones orales de 200 mL de una mezcla glucogénica (70 % glicerol, 20 % 1, 2 – propanediol y 10 % agua) dos veces al día, durante cuatro días, dos días posteriores al retiro de la esponja de FGA (45 mg), en contraste al grupo testigo (200 mL de agua). Se encontró un incremento en las concentraciones de glucosa posterior a la primera administración de la mezcla (3.9 ± 0.3 mmol/l) respecto al grupo testigo (3.0 ± 0.1 mmol/l), así mismo, el periodo corto de energía modificó la tasa de ovulación (1.9 ± 0.1) comparada con la presentada por el grupo testigo (1.3 ± 0.2), en consecuencia al incremento del número de folículos seleccionados para la ovulación durante el tratamiento (mezcla: 5.9 ± 0.6 ; testigo: 4.3 ± 0.4 , respectivamente), por lo tanto, el incremento en la tasa ovulatoria en respuesta a un alto consumo de energía, podría ser la causa en la competencia del desarrollo de folículos preovulatorios.

5.5.3 Efecto de los IGF en los procesos reproductivos

Todos los procesos reproductivos en los animales domésticos son regulados por hormonas como la liberadora de gonadotropinas (GnRH), la folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la progesterona (P_4), el estradiol (E_2) y la testosterona entre otras y algunos metabolitos que actúan acorde al estado fisiológico del animal, y manteniendo una homeostasis normal. Entre estos mediadores químicos se encuentra el factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I), el cual desarrolla una función importante en los procesos reproductivos de los mamíferos (Kadakia *et al.*, 2001), debido a que este péptido es producido en órganos de gran importancia como el hipotálamo, ovarios, oviducto y útero (Daftary *et al.*, 2005) aunque el IGF-I medido en sangre es el producido en el hígado (Fenwick *et al.*, 2008).

Los IGF-I se involucran en procesos reproductivos como la edad al primer parto (Brickell *et al.*, 2007), la tasa de gestación al primer servicio (Patton *et al.*, 2007) ovulaciones múltiples (Echternkamp *et al.*, 2004) desarrollo y pre-implantación del embrión (Velazquez *et al.*, 2005).

La pubertad en la hembra se caracteriza por la primer conducta estral y el desarrollo de un cuerpo lúteo normal (Kinder *et al.*, 1995) y el principal factor endocrino que regula este proceso es la liberación de la LH (Day *et al.*, 1987), sin embargo, también es necesario que el animal presente el desarrollo y el peso adecuado para iniciar su actividad reproductiva (Abeygunawardena *et al.*, 2004), es aquí donde inicia su relación con el IGF-I, ya que su concentración en la circulación se relaciona con el peso corporal durante la pubertad (Lammers *et al.*, 1999), incluso se estima una correlación del 0.88 al 0.92 (Lacau *et al.*, 2000), así mismo, cambios en las concentraciones de IGF-I antes de la pubertad son altamente influenciados por su régimen nutricional (Granger *et al.*, 1989).

Posterior a la pubertad la hembra continúa con su ciclicidad hasta quedar gestante. Existe evidencia que los IGF-I pueden influir tanto en el crecimiento folicular como en la actividad lútea. Durante este proceso, el folículo dominante presenta una relación importante con los factores de crecimiento más comunes, entre los que se encuentran el factor de crecimiento parecido a la insulina o IGFs (Khamsi y Roberge, 2001).

En la gestación, el embrión tiene que atravesar el oviducto e implantarse en el útero, en este proceso el IGF-I puede potencialmente influir sobre la supervivencia del embrión directamente transfiriéndose por el lumen al tracto reproductivo o de forma indirecta vía acciones del ovario, oviducto o útero; en efecto, embriones de bovinos tratados con IGF-I *in vitro* presentan una alta tasa de gestación posterior a su transferencia (Block *et al.*, 2007).

Sin duda alguna los IGF-I desarrollan una función importante en la reproducción, sin embargo, no debe ser visto por separado, sino más bien como un componente del sistema endocrino. El IGF-I actúa monitoreando eventos reproductivos bajo condiciones nutricionales; no obstante, el IGF-I no es considerado previsor de eventos reproductivos, esto es porque necesita interactuar con otras hormonas como las gonadotropinas; por lo tanto, por sí solo no puede incrementar el número de crías al parto, pero si puede ayudar en los diversos procesos reproductivos. Lo que de manera directa puede influir es como predictor en sucesos reproductivos, por lo que se sugiere como un indicador de fertilidad futura en hembras prepúberes la cual puede ser estimada mediante mediciones en las concentraciones de IGF-I en el torrente sanguíneo.

5.6 Sincronización del ciclo estral

El conocimiento de la actividad endocrina y la determinación de los niveles plasmáticos de las hormonas que regulan el ciclo estral de la oveja, ha permitido desarrollar metodologías

capaces de manipular este ciclo, las cuales se basan en la aplicación exógena de estas hormonas y de sus análogos, con el objetivo de mejorar la fertilidad de la hembra. La sincronización del estro es una técnica que tiene como finalidad mantener a un grupo de hembras receptivas (en estro) y listas para reproducirse en el momento que el productor lo requiera, ofrece las ventajas de realizar mejoras genéticas mediante el uso de la inseminación artificial o transferencia de embriones, además, obtener rebaños de corderos uniformes, facilita el manejo del parto, y otros aspectos como la sanidad, nutrición y animales remplazo, no obstante, es importante tomar en cuenta el estado nutricional y fisiológico en el que se encuentra la hembra, así como factores ambientales presentes al momento de la sincronización pueden influir en la respuesta a los tratamientos hormonales (Cordova-Izquierdo *et al.*, 2008).

Durante el proceso de sincronización es común el uso de P₄ y progestágenos para simular el cuerpo lúteo, o bien mediante la aplicación de prostaglandinas (PGF_{2α}) como agentes luteolíticos, sin embargo, estudios recientes muestran la participación del efecto macho como una variante más para mejorar la eficiencia reproductiva de la hembra y a la vez disminuir el uso de fármacos hormonales (Álvarez y Zarco, 2001; Ungerfeld *et al.*, 2005).

5.6.1 Sincronización del estro con progestágenos

El uso de P₄ y progestágenos en la sincronización del estro en ovejas tienen la finalidad de simular la presencia de un cuerpo lúteo, de tal forma que la P₄ presente pueda inhibir la secreción de los pulsos de GnRH en el hipotálamo y de la FSH y LH en la hipófisis, deteniendo la maduración de folículos pre-ovulatorios y activándola al momento de su retiro, lo que hace a este tipo de fármacos hormonales los más efectivos en la programación del estro, incluso durante el periodo de anestro estacional (Wildeus, 2000).

Existe gran variedad en la presentación de progestágenos los cuales pueden ser administrados por vía intramuscular, oral, subcutánea y la más común es la administración intravaginal; en el caso de ovejas estos dispositivos intravaginales son fabricados con poliuretano y silicona siendo los mas utilizados el acetato de fluorogestona (FGA), acetato de medroxiprogesterona (MAP) y el CIDR impregnado de P₄ natural. La metodología consiste en colocar el dispositivo por un periodo de 12 o 14 d en el interior de la vagina, posterior a su retiro, teóricamente las ovejas presentaran estro alrededor de 24 a 48 h, durante la época reproductiva (Deweese *et al.*, 1970; Fitzgerald *et al.*, 1985).

Las esponjas impregnadas con acetato de fluorogestona son disponibles en presentaciones de 20, 30, 40 y 45 mg, encontrándose hasta 90 y 100 % de ovejas en estro, así como un porcentaje de gestación que oscila entre 65 y 95 % (Urviola *et al.*, 2005; Ali, 2007). Abecia *et al.* (2002), reportan 30 % de fertilidad en ovejas inseminadas artificialmente y sincronizadas con 40 mg de FGA, sin embargo, cuando las hembras recibieron monta natural la fertilidad incrementó hasta el 90 %. Por su parte Mustafa *et al.* (2007), evaluaron el efecto de acortar el tiempo de 12 a 4 d la exposición al progestágeno, durante el periodo de anestro, reportando que no encontró diferencias significativas en presentación del estro (83 % FGA 12 d y 67 % FGA 4 d) y porcentaje de gestación (67 % FGA 12 d y 50 % FGA 4 d) respectivamente, por lo tanto, concluyen que disminuir la fase lútea sincronizada (4 d) con FGA presenta resultados similares a los de una fase lútea normal (12 d) en ovejas fuera de la época reproductiva.

Del acetato de medroxi progsterona (MAP) existen presentaciones en esponjas con 60 mg, reportando del 60 al 90 % de hembras en estro (Boscos *et al.*, 2002). Viñoles *et al.* (2000) redujeron el tiempo de exposición de este progestágeno de 12 a 6 d, no encontrando diferencias

en presentación de estro, con 95 % de estros para MAP por 6 d, y 88 % para MAP por 12 d, sin embargo, el porcentaje de gestación fue mayor (87 %) para MAP por 6 d, comparado con MAP por 12 d (63 %), por lo que sugiere que la concentración del progestágeno posiblemente afectó la dinámica folicular.

En lo que respecta al CIDR, Molina *et al.* (2005) utilizaron este dispositivo con 300 mg de P₄, reportando el 100 % de respuesta en estros, además del 77.8 % de gestación en ovejas con presencia de un cuerpo lúteo funcional y el 83.3 % de gestaciones en ausencia del mismo, durante la época reproductiva.

Ungerfeld y Rubianes (2002) evaluaron el efecto de MAP, FGA y CIDR durante el periodo de 6 d, sin encontrar diferencias entre tratamientos para porcentaje de presentación de estro (MAP: 94.1, FGA: 91.5 y CIDR: 95.9 %), ni en porcentaje de gestación (MAP: 62.5, FGA: 76.4 y CIDR: 59.6 %), sin embargo, se sugiere que cambios en la duración de la fase lútea, podrían causar un inadecuado desarrollo folicular y, por consecuencia, un prematuro pico preovulatorio de LH, lo que repercutiría de manera directa sobre la fertilidad de la hembra (Skinner *et al.*, 2000).

5.6.2 Sincronización del estro con prostaglandinas (PGF_{2α})

Es el método que se utiliza cuando las hembras se encuentran ciclando, porque parte del éxito de este tratamiento es la presencia de un cuerpo lúteo funcional, el cual sufrirá regresión ante la presencia de PGF_{2α} originando un descenso en las concentraciones de P₄ e induciendo el crecimiento de un nuevo folículo preovulatorio (Inskeep, 1973; Douglas y Ginther, 1973; Hansel y Convey, 1983; Smith *et al.*, 1994).

Durante el ciclo estral de la oveja, la prostaglandina es secretada por el útero y es indispensable en el proceso de luteólisis, no obstante, es necesaria la presencia de P_4 , E_2 y oxitocina para su liberación (Fairclough *et al.*, 1984). Eventualmente la P_4 disminuye su concentración al término de la fase lútea, de tal forma que el efecto negativo sobre la secreción de gonadotropinas cesa, esto permite la formación de receptores para E_2 y oxitocina en el endometrio y al mismo tiempo se activa el generador de pulsos de oxitocina en el hipotálamo aunada a la secretada por el cuerpo lúteo.

La presencia de E_2 y oxitocina aumentan la actividad de la fosfolipasa A (enzima liberadora del ácido araquidónico de los fosfolípidos) así como de la prostaglandina sintetasa (enzima que transforma el ácido araquidónico a prostaglandina) originando la secreción de $PGF_{2\alpha}$ por el endometrio, no obstante para que ésta ejerza su efecto se requiere de la presencia de receptores en las células grandes del cuerpo lúteo (Ellinwood *et al.*, 1979; Homanics y Silvia, 1988; Pate, 1994), dicho proceso de luteólisis es mediado por acción del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) el cual actúa sobre las células del cuerpo lúteo causando la apoptosis (Miyamoto *et al.*, 1998).

El efecto de la $PGF_{2\alpha}$ sobre el cuerpo lúteo de la oveja se ha observado del día 5 al 14 del ciclo estral (Acritopoulou y Haresing, 1980), no obstante, Urviola *et al.* (2005), evaluaron el efecto de la $PGF_{2\alpha}$ en los días 4 y 10 del ciclo estral de la oveja, encontrando el 100 % de presentación de estro para ambos tratamientos, y el 63.6 % de gestación para ovejas tratadas con $PGF_{2\alpha}$ el día 10 y 65 % para ovejas tratadas con $PGF_{2\alpha}$ el d 4, sin embargo, el inicio de estro posterior a las aplicaciones de $PGF_{2\alpha}$ fue menor en el grupo tratado con $PGF_{2\alpha}$ el d 4 (34.28 ± 4.2 h), comparado con el grupo tratado con $PGF_{2\alpha}$ el d 10 (47.45 ± 7.0 h), y concluyen que este efecto posiblemente se deba a que los cuerpos lúteos de mayor edad (10 d) secretan mayor

cantidad de progesterona en relación a los de menor tiempo (4 d), por lo tanto, se retrasa la presencia del estro, no obstante, la respuesta a estro y gestación fue semejante para los dos tratamientos.

Las prostaglandinas aparentan ser un buen programa para la sincronización del estro en ovejas, durante la época reproductiva, sin embargo, la fertilidad alcanzada es baja (50 y 60 %), dicha disminución en la fertilidad se atribuye a la muerte o inmovilización de los espermatozoides sobre una porción anterior del cérvix durante las 24 h posteriores a la monta, así como una disminución en las contracciones uterinas hacia el oviducto, este mecanismo de acción no están bien determinado, pero se estima que puede deberse algún tipo de factor espermaticida (Hawk *et al.*, 1981; Hawk, 1983; Evans y Armstrong, 1984).

5.6.3 Combinación de fármacos hormonales en el manejo del ciclo estral de la oveja

La combinación de progestágenos y P₄ (FGA, MAP, CIDR) con prostaglandinas (PGF_{2α}) son utilizadas en la sincronización del estro hasta con el 100 % de respuesta en presentación de estro, no obstante, esto no garantiza que exista la ovulación; para ello se han utilizado otras hormonas como la GnRH, la cual estimula a la hipófisis en la secreción de gonadotropinas, necesarias en el crecimiento y maduración de folículos preovulatorios; de igual forma, también se pueden combinar con la gonadotropina coriónica equina (eCG), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona folículo estimulante de tipo porcina (FSHp), comúnmente utilizadas para incrementar el porcentaje de ovulación, gestación y en protocolos de superovulación para la transferencia de embriones, tanto en época reproductiva como durante el anestro estacional (Fukui *et al.*, 1999; Dogan *et al.*, 2004; Kridli *et al.*, 2006).

Dogan y Nur (2006) probaron diferentes protocolos para inducir el estro en ovejas durante el anestro, tomando como base al MAP en combinación con PGF_{2α} (125 µg) y eCG (500

UI), con inseminación artificial a las 48 y 60 h de retirado el progestágeno, reportando que existió variación en inicio de estro, presentándose antes (31.1 ± 1.8 h) en los animales tratados con eCG, se estima que dicho efecto se debe a que la eCG estimula el desarrollo de folículos, por lo tanto, los niveles de E_2 aumentan anticipando la presencia del estro en este grupo de ovejas, no obstante, el porcentaje de gestación no fue diferente entre tratamientos.

Por otra parte, en un estudio realizado por Timurkan y Yildiz (2005), en ovejas sincronizadas con FGA a las que aplicaron dosis de 500 UI (T1), 600 UI (T2) y 750 UI (T3) de eCG al retiro de la esponja, además de un grupo testigo (T4), con inseminación artificial a las 72 y 96 h posterior a las administraciones de eCG, observaron el 100 % de presentación de estro en los tratamientos con eCG y el 97 % para el grupo testigo, así mismo, observaron 100 % de gestación para T3 (750 UI), y el 93.7, 90.6 y 97 % para el T2 (600 UI), T1 (500 UI) y T4 (Testigo) respectivamente, no obstante, se menciona que altas cantidades de eCG resultan contraproducentes por ocasionar rechazo inmunológico (Roy *et al.*, 1999).

Respecto a los programas de superovulación para la transferencia de embriones se han utilizado eCG y FSHp, aunque los mejores resultados se presentan cuando se utiliza FSHp, debido a que la eCG posee funciones biológicas tanto de FSH como de LH, y esto repercute sobre el desarrollo folicular, adelanta las ovulaciones o causa variación en incidencia, inicio y duración del estro, tomando en cuenta que la sincronía en estos procesos con hembras receptoras y donadoras benefician la respuesta reproductiva. Referente a estos programas Watanabe *et al.* (1998), mencionan que una serie de aplicaciones simultaneas decrecientes (5, 5, 3, 3, 2, 2 mg) de 20 mg de FSHp más 500 UI de eCG presentan resultados aceptables para la superovulación, sin embargo, Okada *et al.* (1999) indican que la combinación apropiada de eCG y FSHp es aplicar

20 mg FSHp 48 h antes de retirar la esponja de FGA y de 200 a 300 UI de eCG 24 h después de iniciada la aplicación de FSHp.

6 Literatura citada

- Abecia, J. A., Forcada, R., Zúñiga, O. and Valares, J. A. 2002. The effect of progestagen treatment on sheep reproductive performance at different phases of the oestrous cycle. *Anim. Res.* 51: 149-155.
- Abecia, J. A., Sosa, C., Forcada, F., and Meikle, A. 2006. The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 367–378.
- Acritopoulou, S. and Haresing, W. 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF_{2α} given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 58: 219-223.
- Adamiak S.J., Mackie K., Watt R.G., Webb R., Sinclair K.D. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reproduc.* 73:918-926.
- Adamiak S.J., Powell K., Rooke J.A., Webb R., Sinclair K.D. 2006. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction.* 131:247-258.
- Adams, N. R., Abordi, J. A., Briegel, J. R. and Sanders, M. R. 1994. Effect of diet on the clearance of estradiol-17β in the ewe. *Biol. Reprod.* 51: 668-674.
- Aksoy Y, Aksoy H, Altinkayak K, Aydin HR, Ozkan A. 2006. Sperm fatty acids composition in subfertile men. *Porstaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 75: 75-9.
- Ali, A. 2007. Effect of time of eCG administration of follicular response and reproductive performance of FGA – treated Ossimi ewes. *Small Rum. Res.* 72: 33–37.
- Alvarez JG, Storey BT. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 42:334-336.
- Ambrose DJ, Kastelic JP, Corbertt R, Pitney PA, Petit HV, Small JA, Zalkovic P. 2006. Lower pregnancy loss in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J Dairy Sci.* 89:3066-3074.
- Am-in N, Kirkwood RN, Techakumphu M, Tantasuparuk W. 2011. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology.* 75: 897-903.

- Archer, Z. A., Rhind, S. M., Findlay, P. A., Kyle, C. E., Barber, M. C. and Adam, C. L. 2005. Hypothalamic responses to peripheral glucose infusion in food-restricted sheep are influenced by photoperiod. *J. Endocrinol.* 184: 515-525.
- Archer, Z. A., Rhind, S. M., Findlay, P.A., Kyle, C.E., Thomas, L., Marie, M., and Adam, C. L. 2002. Contrasting effects of different levels of food intake and adiposity on LH secretion and hypothalamic gene expression in sheep. *J. Endocrinol.* 175: 383–393.
- Armstrong, D. G. and Webb, R. 1997. Ovarian follicular dominance: The role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* 2: 139-146.
- Armstrong, D. G., McEvoy, T. G., Baxter, G., Robinson, J. J., Hogg, C. O., Woad, K. J., Webb, R. and Sinclair, K. D. 2001. Effects of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: Associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.* 64: 1624-1632.
- Arosh, J.A., S.K. Banu., P. Chapdelaine., E. Madore., J. Sirois, and A. Fortier. 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basic form autoregulation of luteal function. *Endocrinology.* 145: 2551-2560.
- Arroyo, L. J., Gallegos-Sánchez, J., Villa, G. A. y Valencia, M. J. 2006. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: Una revisión. *Interciencia.* Vol. 31. No. 1. 8-15.
- Ashes, J. R., B. D. Siebert., S.K. Gulati., A.Z. Cuthbertson, and T.W. Scott. 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids.* 27: 629-631.
- Ayalon, N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54: 483-493.
- Baird, D. T. 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J. Reprod. Fert.* 69: 343-352.
- Banchero, G. E., Quintans, G., Martin, G. B., Lindsay, D. R. and Milton, J. T. B. 2004. Nutrition and colostrum production in sheep. 1. Metabolic and hormonal responses to a high-energy supplement in the final stages of pregnancy. *Reprod. Fert. Develop.* 16: 1-11.
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J. and Rawlings, N. C. 1998. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J. Reprod. Fert.* 113: 275-285.
- Bayourte, C., Moncoulon, R. and Vernay, M. 1993. Effect of protein – protected fat on ruminal and total nutrient digestibility of sheep diets. *J. Anim. Sci.* 71: 1026-1031.
- Bearden, H. J. y Fuquay, J. 1982. Reproducción animal aplicada. El ciclo estral. Primera edición. *El Manual Moderno.* México. pp. 50-63.

- Becú-Villalobos, D., García-Tornadú, I., Shroeder, G., Salado, E. E., Gagliostro, G., Delavaud, C., Chilliard, Y., and Lacau-Mengido, I. M. 2007. Effect of fat supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 71: 218–225.
- Bell, A. W., Burhans, W. S. and Overton, T. R. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 119-126.
- Bilby, T.R., J. Block., B.C. do Amaral., O.S. Filho., F.T. Silvestre., P.J. Hansen., C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *J. Dairy. Sci.* 89: 3891-3903.
- Blache, D., Tellam, R. L., Chagas, L. M., Blackberry, M. A., Vercoe, P. E., and Martin, G. B. 2000. Level of nutrition effects leptin concentration in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J. Endocrinol.* 165: 625–637.
- Blat, C., Villaudy, J. and Binoux, M. 1994. *In vivo* proteolysis of serum insuline-like growth factor (IGF) binding protein -3 results in increased availability of IGF to target cells. *J. Clin. Invest.* 93: 2286-2290.
- Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM, Hermier D. 1997. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod.* 56:1216-1220.
- Blesbois E, Douard V, Germain M, Boniface P. 2004. Effect of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkey. *Theriogenology.* 61: 537-49.
- Boland, M. P., Lonergan, P., and O`Callaghan, D. 2000. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55: 1323–1340.
- Borowczyk, E., J.S. Caton., D.A. Redmer., J.J. Bilski., R.M. Weigl., K.A. Vonnahme., P.P. Borowicz., J.D. Kirsch., K.C. Kraft., L.P. Reynolds, and A.T. Grazul-Bilska. 2006. Effects of plane of nutrition on *in vitro* fertilization and early embryonic development in sheep. *J. Anim. Sci.* 84: 1593-1599.
- Boscós, C. M., Samartzi, F. C., Dellis, S., Rogge, A., Stefanakis, A. and Krambovitis, E. 2002. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology.* 58: 1261-1272.
- Burns, P.D., T.E. Engle., M.A. Harris., R.M. Enns, and J.C. Whittier. 2003. Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in nonlactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 81: 2840-2846.

- Bwanga CO. 1991. Cryopreservation of boar semen I: a literature review. *Acta Vet Scand.* 32: 431-53.
- Caldari-Torres, C., Rodriguez-Sallaberry., E.S. Greene, and L. Badinga. 2006. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandins F_{2α} production by bovine endometrial cells. *J. Dairy. Sci.* 89: 971-977.
- Camacho, R. J. C., Rodríguez, C., Hernández, H. J. E., Becerril, P. C. M. y Gallegos, S. J. 2008. Características reproductivas en ovejas pelibuey sincronizadas e inducidas a la pubertad. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol. 16. No. 1: 18-24.
- Canfield, R. W., Sniffen, C. J. and Butler, W. R. 1990. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 73: 2342-2349.
- Cannas, A., Pes, A., Mancuso, R., Vodret, B. and Nudda, A. 1998. Effect of dietary energy and protein concentration on the concentration on milk urea in dairy ewes. *J. Dairy. Sci.* 81: 499-508.
- Caprio, M., Fabbrini, E., Isidori, A. M., Aversa, A. and Fabbri, A. 2001. Leptin and reproduction. *Endocrinol. Metab.* 12 (2): 65-72.
- Caraty, A., and Skinner, D. 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 140: 165-170.
- Caraty, A., Fabre-nys, C., Delaleu, B., Locatelli, A., Bruneau, G., Karsch, F. J. and Herbison, A. 1998. Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in ewe. *Endocrinology* 139: 1760-1998.
- Cerna, C. A., Porras, A. A., Zarco, Q. L. y Valencia, M. J. 2004. Efecto del fotoperiodo artificial sobre el reinicio de la actividad ovárica posparto en la oveja pelibuey. *Vet. Méx.* 35 (3): 179-185.
- Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J. A., Guérin, Y., Ravault, J. P., Thimonier, J. and Pelletier, J. 1992. Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 30: 157-184.
- Cheng, Z., M. Elmes., S.E. Kirkup., E.C. Chin., D.R.E. Abayasekera, and D.C. Wathes. 2005. The effect of a diet supplement with the n-6 polyunsaturated fatty acids linoleic acid on prostaglandin production on early- and late-pregnant ewes. *J. Endocrinol.* 184: 165-178.
- Cheng, Z., R.S. Robinson., P.G.A. Pushpakumara., R.J. Mansbridge, and D.C. Whates. 2001. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. *J. Endocrinol.* 171: 463-473.

- Childs, S., A.A. Hennessy., J. M. Sreenan., D.C. Wathes., Z. Cheng., C. Stanton., M.G. Diskin, and D.A. Kenny. 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology*. 70: 595-611.
- Chilliard, Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs and rodents: a review. *J. Dairy. Sci.* 76: 3897-3931.
- Chilliard, Y., Delavaud, C. and Bonnet, M. 2005. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom. Anim. Endocrinol.* 29: 3-22.
- Choi, B. R., and Palmquist, D. L. 1996. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic peptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *J. Nutr.* 126: 2913–2919.
- Choi, B. R., Palmquist, D. L., and Allen, M. S. 2000. Cholecystokinin mediates depression of feed intake in dairy cattle fed high fat diets. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19: 159–175.
- Clarke, I. J. and Henry, B. A. 1999. Leptin and reproduction. *Rev. Reprod.* 4: 48-55.
- Conover, C. A., Faessen, G. R; Igi, K., Chandrasekher, D., Christiansen, M., Overgaard, M. T., Oxiving, C. and Gludice, L. C. 2001. Pregnancy-Associated plasma-A is the insulin – like growth factor binding protein -4 protease secreted by human ovarian granulose cells and in a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology* 142 (5): 2155-2158.
- Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. 2003. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. *Lipids.* 35: 149-54.
- Córdova-Izquierdo, A, Córdova-Jiménez, M. S, Córdova-Jiménez, C. A, Guerra-Liera, J. E. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Rev. Vet.* 19 (1): 67-79.
- Cuello C, Berthelot F, Delaleu B, Venturi E, Pastor LM, Vazquez JM, Roca J, Martinat F, Martinez EA. 2007. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocyst: an ultrastructural and cell death study. *Theriogenology.* 67: 970-982.
- Cunningham, M. J., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. 1999. Leptin’s actions on the reproductive axis: Perspectives and mechanisms. *Biol. Reprod.* 60: 216-222.

- Delavaud, C., Bocquier, F., Chilliard, Y., Keisler, D. H., Gertler, A. and Kann, G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: Effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J. Endocrinol.* 165: 519-526.
- DeRouen, S. M., Franke, D. E., Morrison, D. G., Wyatt, W. E., Coombs, D. F., White, T. W., Humes, P. E. and Greene, B. B. 1994. Prepartum body condition and weight influence on reproductive performance of first-calf beef cows. *J. Anim. Sci.* 72: 1119-1125.
- Deweese, W. P., Glimp, H. A, and Dutt, R. H. 1970. Comparison of medroxyprogesterone acetate orally and in vaginal sponges for synchronizing estrus in ewes. *J. Anim Sci.* 31: 394-397.
- Dixon, A. B., Knights, M., Winkler, J. L., Marsh, D. J., Pate, J. L., Wilson, M. E., Dailey, R. A., Seidel, G., and Inskeep, E. K. 2007. Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *J. Anim. Sci.* 85: 1274–1284.
- Dogan, I. and Nur, Z. 2006. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. *Vet. Med.* 51 (4): 133-138.
- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soylu, M. K. and Sonmez, C. 2004. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. *South Afric. Soc. Anim. Sci.* 34 (1): 18-22.
- Douglas, R. H and Ginther, O. J. 1973. Luteolysis following a single injection of prostaglandin F_{2α} in sheep. *J. Anim. Sci.* 37: 990-993.
- Downing, J. A., and Scaramuzzi, R. J. 1997. The effect of the insulin during the luteal phase of the cycle on the ovulation rate and on the plasma concentrations of LH, FSH, and glucose in ewes. *Theriogenology* 47: 747–759.
- Downing, J. A., Joss, J., and Scaramuzzi, R. J. 1999. The effect of a direct arterial infusion of insulin and glucose on the ovarian secretion rates androstenedione and oestradiol in ewes with an autotransplanted ovary. *J. Endocrinol.* 163: 531–541.
- Dunn, T. G., and Moss, E. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1580–1593.
- Dunne, L.D., M.G. Disken, and J.M. Sreenan. 2000. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 39-44.
- Ebling, F. J. P. and Foster, D. L. 1988. Photoperiod requirements for puberty differ from those for the onset of the adult breeding season in female sheep. *J. Reprod. Fert.* 84: 283-293.
- Eckery, D. C., Moeller, C. L., Nett, T. M. and Sawyer, H. R. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulation hormone, luteinizing hormone,

- growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 57: 507-513.
- Edwards, J. W., Cannell, R. C., Garrett, R. P., Savell, J. W., Cross, H. R., and Longnecker, M. T. 1989. Using ultrasound, linear measurements and live fat thickness estimates to determine carcass composition of market lambs. *J. Anim. Sci.* 67: 3322.
- Ellinwood, W. E., Nett, T. M and Niswender. 1979. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. II. Prostaglandin secretion by the endometrium *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 21: 845-856.
- Erickson M. C. 1998. Chemistry and function of phospholipids. In: Akoh CC, Min DB, editors. *Food lipids, chemistry, nutrition and biochemistry*. New York: Marcel Dekker INC. p. 41.
- Espinoza, J. L., Ramirez-Godinez, J. A., Simental, S. S., Jiménez, J., Ramirez, R., Palacios, A., and De Lun, R. 1997. Effects of calcium soaps of fatty acids on serum hormones and lipid metabolites in Pelibuey ewes. *Small Rum. Res.* 26: 61-68.
- Espinoza-Villavicencio, J. L. Ortega, P. R., Palacios, E. A., Valencia, M. J. y Aréchiga, F. C. F. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: Una revisión. *Interciencia*. Vol. 32. No. 2. 93-99.
- Estienne MJ, Harper AF, Crawford RJ. 2008. Dietary supplementation with a source of omega 3 fatty acids increasing sperm number and duration of ejaculation in boars. *Theriogenology*.70: 70-76.
- Evans, G. and Armstrong, D. T. 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fert.* 70: 47-53.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Glover, B. H., and Karsch, F. J. 1994. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the perovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 134: 1806-1811.
- Evans, A. C. O., Duffy, P., Quinn, K. M., Knight, P. G. and Boland, M. P. 2001. Follicular waves are associated with transient fluctuations in FSH but not oestradiol or inhibin-A concentrations in anoestrous ewes. *Brit. Soc. Anim. Sci.* 72: 547-554.
- Fairclough, R. J., Moore, L. G, Peterson, A. J and Watkins, W. B. 1984. Effect of oxytocin on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F and the oxytocin-associated neurophysin during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 31: 36-43.

- Filley, S. J., Turner, H. A., and Stormshak, F. 2000. Plasma fatty acids, prostaglandin F_{2α} metabolite, and reproduction response in postpartum heifers fed rumen bypass fat. *J. Anim. Sci.* 78: 139–144.
- Findlay, J. K. 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 48:15-23.
- Fitzgerald, J. A., Ruggles, A. J, Stellflug, J. N, and Hansel, W. 1985. A seven-day synchronization method for ewes using medroxyprogesterone acetate (MAP) and prostaglandin F_{2α}. *J. Anim. Sci.* 61: 466-469.
- Fortune, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50: 225-232.
- Foster, D. L., Yellon, S. M. and Olster, D. H. 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *J. Reprod. Fert.* 75: 327-344.
- Foster, D. L., Ebling, F. J. L. and Claypool, L. E. 1988. Timing of puberty by photoperiod. *Reprod. Nutr. Develop.* 28: 349-364
- Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Garnsworthy PC, Webb R. 2007. Impact of dietary fatty acids quality and development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction.* 77: 9-17.
- Frandsen, R. D. 1988. Anatomía y fisiología de animales domésticos. Aspectos fisiológicos de la reproducción de la hembra. Cuarta edición. McGraw-Hill. México. pp. 379-389.
- Fukui, Y., Ishikawa, D., Ishida, N., Okada, M., Itagaki, R. and Ogiso, T. 1999. Comparison of fertility of estrous synchronized ewes with four different intravaginal devices during the breeding season. *J. Reprod. Dev.* 45: 337-343.
- Funston, R.N. 2004. Fat supplementation and reproductive in beef females. *J. Anim. Sci.* 82: E154–E161.
- Galina, C. y Valencia, J. 2008. Reproducción de animales domésticos. Pubertad, ciclo estral y estacionalidad. Tercera edición. Limusa. México. pp. 85-116.
- Ginther, O. J., Knopf, L. K. and Kastelic, J. P. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.* 87: 223-230.
- Glozzi TM, Zaniboni L, Maldjian A, Luzi F, Maertens L, Cerolini S. 2009. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology.* 71: 910-9.

- Goodman, R. L., Thiery, J. C., Delaleu, B. and Malpoux, B. 2000. Estradiol increases multiunit electrical activity in the A15 area of ewes exposed to inhibitory photoperiods. *Biol. Reprod.* 63: 1352-1357.
- Goodman, R. L. 1996. Neural systems mediating the negative feedback actions of estradiol and progesterone in the ewe. *Acta. Neurobiol. Exp.* 56: 727-741.
- Goodman, R. L., Bittman, E. L., Foster, D. L. and Karsch, F. J. 1982. Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underline the season variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biol. Reprod.* 27: 580-589.
- Grant, M. H. J., Hess, B. W., Hixon, D. L., Van Kirk, E. A., Alexander, B. M., Nett, T. M., and Moss, G. E. 2003. Effect of feeding high-linoleate safflower seeds on reproductive endocrine dynamics in postpartum beef females. *Amer. Soc. Anim. Sci.* 54: 36-39.
- Greiner, S. P., Rouse, G. H., Wilson, D. E., Cundiff, L. V. and Wheeler, T. L. 2003. Prediction of retail product weight and percentage using ultrasound and carcass measurements in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1736-1742.
- Guyton AC, Hall JE. 2006. *Medical physiology*. Philadelphia; Elsevier: 999-1001.
- Hafez, E.S. y Hafez B. 2002a. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ciclos reproductivos. Séptima edición. McGraw-Hill. México. pp. 56-65.
- Hafez, E.S. y Hafez B. 2002b. Reproducción e inseminación artificial en animales. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. Séptima edición. McGraw-Hill. México. pp. 33-50.
- Hamlin, K. E., Green, R. D., Cundiff, L. V., Wheeler, T. L., and Dikeman, M. E. 1995. Real-time ultrasonic measurement of fat thickness and longissimus muscle area: II. Relationship between real-time ultrasound measures and carcass retail yield. *J. Anim. Sci.* 73: 1725-1734.
- Han, S., Abraham, M. and Herbison, A. E. 2002. Effect of GABA on GnRH neurons Switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in female mouse. *Endocrinology* 143 (4): 1459-1466.
- Han, S., Todman, M. G. and Herbison, A. E. 2004. Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin – releasing hormone neurons. *Endocrinology* 145 (2): 495-499.
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R. and Galloway, S. M. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70: 900-909.

- Hansel, W. and Convey, E. M. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57(2): 404-424.
- Hardy, S. L., Anderson, G. M., Valent, M., Connors, J. M. and Goodman, R. L. 2003. Evidence that estrogen receptor alpha, but not beta, mediates seasonal, changes in the response of the ovine retrochiasmatic area to estradiol. *Biol. Reprod.* 68: 846-852.
- Harvatine, K. J. and Allen, M. S. 2006. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 1081-1091.
- Havern, R. L., Whisnant, C. S. and Goodman, R. L. 1991. Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biol. Reprod.* 44: 476-482.
- Hawk, H. W. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J. Dairy. Sci.* 66: 2645-2660.
- Hawk, H. W., Cooper, B. S and Pursell, V. G. 1981. Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J. Anim. Sci.* 52: 601-610.
- Henry, B. A., Goding, J. W., Tilbrook, A. J., Dunshea, F. R., and Clarke, I. J. 2001. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of body weight. *J. Endocrinol.* 168: 67-77.
- Heravi, A.R.M., R.O. Gilbert., T.R. Overton., D.E. Bauman, and W.R. Butler. 2007. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating cows. *J. Dairy Sci.* 90: 145-154.
- Herbosa, C. G., Wood, R. I., I'anson, H. and Foster, D. L. 1994. Prenatal, photoperiod and the timing of puberty in the female lamb. *Biol. Reprod.* 50: 1367-1376.
- Hernández, S. A., Escobar, M. F. J. Aréchiga, F. C. F. and Colina, F. F. 2004. Comportamiento reproductivo en ovejas de pelo a 22° 58' N. *Vet. Zacat.* 3: 33-38.
- Herrera-Camacho, J., J.R. Aké-López., J.C. Ku-Vera., G.L. Williams., y J.A. Quintal-Franco. 2008. Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. *Téc. Pec. Méx.* 46(2): 107-117.
- Hess, B. W., Moss, G. E., and Rule, D. C. 2008. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 86 (E. Suppl.): E188-E204.

- Hileman, S. M., Pierroz, D. D. and Flier, J. S. 2000. Leptin, nutrition, and reproduction: Timing is everything. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 85 (2): 804-807.
- Homanics, G. E. and Silvia, W. J. 1988. Effects of progesterone and estradiol-17 β on uterine secretion of prostaglandin F_{2 α} in response to oxytocin in ovariectomized ewes. *Biol. Reprod.* 38: 804-811.
- Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L. and Spurlock. 1998. The biology of leptin: A review. *J. Anim. Sci.* 76: 1405-1420.
- Howland, B. E., Bellows, R. A., Pope, A. L. and Casida, L. E. 1966. Ovarian activity in ewes treated with glucose and triiodothyronine. *J. Anim. Sci.* 25: 836-838.
- Inskeep, E. K. 1973. Potencial uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *J. Anim. Sci.* 36: 1149-1157.
- Juengel, J. L., Bodensteiner, K. J., Heath, D. A. Hudson, N. L., Moeller, C. L., Smith, P., Galloway, S. M., Davis, G. H., Sawyer, H. R. and McNatty, K. P. 2004. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim. Reprod. Sci.* 82: 447-460.
- Karsch, F. J., Bowen, J. M., Caraty, A., Evans, N. P. and Moenter, S. M. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* 56: 303-309.
- Karsch, F. J., Legan, S. J., Ryan, K. D. and Foster, D. L. 1980. Importance of estradiol and progesterone in regulation LH secretion and anestrus behavior during the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 23: 404-413.
- Karsch, F. J. 1984. The hypothalamus and anterior pituitary gland. In: Austin and short (Editors), *Reproduction in Mammals. Vol. 3. Hormones and reproduction.* Cambr. Univ. Press. pp 1-20.
- Kaur, H. and Arora. S. P. 1995. Dietary effects on ruminant livestock reproduction with particular reference to protein. *Nutr. Res. Rev.* 8: 121-136.
- Kendall, N. R., Gutierrez, C. G., Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Webb, R. and Campbell, B. K. 2004. Direct *in vivo* effects leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 128: 757-765.
- Khamsi, F. and Roberge, S. 2001. Granulosa cell of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I. *J. Endocrinol.* 170: 565-573.
- Khorasani, G. R., and Kennelly, J. J. 1998. Effect of added dietary fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 81: 2459-2468.

- Kiyama, Z., Alexander, B. M., Van Kirk, E. A., Murdoch, W. J., Hallford, D. M., and Moss, G. E. 2004. Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *J. Anim. Sci.* 82: 2548–2557.
- Kowalski, Z. M. 1997. Rumen fermentation, nutrient flow to the duodenum and digestibility in bulls fed calcium soaps rapeseed fatty acids soya bean meal coated with calcium soaps. *Anim. Feed. Sci. Tec.* 69: 289-303.
- Kridli, R. T., Husein, M. Q., Muhdi, H. A. and Al-Khazaleh, J. M. 2006. Reproductive performance of hormonally treated anestrous ewes. *Anim Reprod.* 3 (3): 347-352.
- Kundu CN, Chakrabarty J, Dutta P, Bhattacharyya A, Ghosh A, Majumder GC. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical define medium and goat caude epididymal spermatozoa. *Cryobiology.*40: 117-125.
- Kurz, S. G., Dyer, R. M., Hu, Y., Wright, M. D. and Day, M. L. 1990. Regulation of luteinizing hormone secretion in puberty heifers fed an energy-deficient diet. *Biol. Reprod.* 43: 450-456.
- Lalman, D. L., Keisler, D. H., Williams, J. E., Scholljegerdes, E. J. and Mallett, D. M. 1997. Influence of postpartum weight and body condition change on duration of anestrus by undernourished suckled beef heifers. *J. Anim. Sci.* 75: 2003-2008.
- Lammoglia, M. A., Willard, S. T., Halloford, D. M. and Randel, R. D. 1997. Effects dietary fat and follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol-17 β , 13, 14–dihydro-15–keto–prostaglandin F_{2 α} and grown hormone in estrus cycling Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 75: 1591-1600.
- Lawrance, J. B., Oxving, C., Overgaard, M. T., Strup-Jansen, L., Gleich, G. L., Hoys, L. G., Yates, J. R. and Conover, C. A. 1999. The insulin-like growth factor (IGF)–dependent IGF binding protein–4 protease secreted by human fibroblasts in pregnancy–associated plasma protein–A. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3149-3153.
- Lehninger, A.L., L. N. David, y M.C. Michael. 1993. Principios de bioquímica. Lípidos. Segunda edición. Omega S.A. Barcelona. 240-244 pp.
- Letelier, C., Mallo, F., Encinas, T., Ros, J. M. and Gonzales-Bulnes, A. 2008. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicle without effects on ghrelin secretion. *Reproduction* 136: 65-72.
- Leury, B. J., Murray, P. J., and Rowe, J. B. 1990. Effect of nutrition on the response in ovulation rate in merino ewes following short–term lupin supplementation and insulin administration. *Aust. J. Agric. Res.* 41: 751–759.

- Levy, J. R., and Stevens, W. 2001. The effects of insulin glucose, and pyruvate on the kinetics of leptin secretion. *Endocrinology* 142 (8): 3558–3562.
- Littell, R. C., Henry, P. R., and Ammerman, C. B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76: 1216–1231.
- Lozano, J.M., P. Lonergan., M.P. Boland, and D.O. O’Callaghan. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction.* 125: 543-553.
- Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S., Penny P., Noble R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology.* 63:411-21.
- Malpaux, B., Robinson, J. E., Wayne, N. L. and Karsch, F. J. 1989. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: Importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J. Endocrinol.* 122: 269-278.
- Malpaux, B., Thiéry, J. C. and Chemineau, P. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39: 355-366.
- Manzano, E. C., García, M. R., Miranda, M. G., León, A. E. y Fonseca, J. 1999. Relación entre peso vivo, condición corporal e indicadores bioquímicos de la nutrición de ovejas vacías y secas de la raza pelibuey. *Arch. Zoot.* 48: 223-226.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G. and Hill, R. A. 2002. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *Inter. J. Obesity.* 26: 1407-1433.
- Martin, G. B., Milton, J. T. B., Davidson, R. H., Banchero-Hunzicker, G. E., Lindsay, D. R., and Blache, D. 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 231–246.
- Martin, T. L., Fogwell, R. L. and Ireland, J. J. 1991. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 44: 693-700.
- Martínez AG, Valcácel A, Furnus CC, Matos DG, Iorio G, Heras MA. Cryopreservation of *in vitro* produces bovine embryos. *Small Rum Res*; 63: 288-296.
- Mattioli, M., Conte, F., Galeati, G., and Seren, E. 1986. Effect of naloxone on plasma concentration of prolactin and LH in lactating sows. *J. Reprod. Fert.* 76: 167-173.
- Mattos, R., A. Guzeloglu., L. Badinga., C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2003. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-T modify phorbol ester-induced secretion of

- prostaglandin $F_{2\alpha}$ and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase- A_2 in bovine endometrial cells. *Biol. Endocrinol.* 69: 780-787.
- Mattos, R., C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5: 38-45.
- Mattos, R., C.R. Staples., J. Williams., A. Amorocho., M.A. McGuire, and W.W. Thatcher. 2002. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J. Dairy. Sci.* 85: 755-764.
- McEvoy T.G., Coull G.D., Broadbent P.J., Hutchinson J.S., Speake B.K. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 118:163-170.
- McKenzie, F. F. and Phillips, R. W. 1931. Some observations in the estrual cycle in the sheep. *J. Anim. Sci.* 138-143.
- McLaren, D. G., Novakofski, J., Parrett, D. F., Lo, L. L., Singh, S. D., Nueman, K. R. and McKeith, F. K. 1991. A study of operator effects on ultrasonic measures on fat depth and longissimus muscle area in cattle, sheep and pigs. *J. Anim. Sci.* 69: 54-66.
- McNeill, D. M., Slepatis, R., Ehrhardt, R. A., Smith, D. M. and Bell, A. W. 1997. Protein requirements of sheep in the late pregnancy: Partitioning of nitrogen between gravid uterus and maternal tissues. *J. Anim. Sci.* 75: 809-816.
- McShane, T. M. and Keisler, D. H. 1991. Effects of dietary energy on ovarian function, estrogen suppression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, and competency of gonadotropin surge. *Biol. Reprod.* 45: 486-492.
- Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D. and Chilibruste, P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127: 727-737.
- Miller, D. W., Blache, D., Boukhliq, R., Curlewis, J. D. and Martin, G. B. 1998. Central metabolic messengers and the effects of nutrition on gonadotrophin secretion in sheep. *J. Endocrinol. Fert.* 112: 347-356.
- Miyamoto, A., T. Nakatsuka., M. Ohtani, and Y. Fukui. 1998. Intraluteal release of progesterone and prostaglandins during $F_{2\alpha}$ induced luteolysis in ewes: local effects of tumor necrosis factor- α . *J. Reprod. Dev.* 44: 385-391.
- Molina, M. P., Sánchez, T. E. T., García, F. E., Martínez, G. A., Cárdenas, L. M., Peralta, O. J., Cordero, M. J. L., Hizarza, E. A. y Ortega, C. M. E. 2005. Manipulación de la presencia del cuerpo lúteo en la sincronización del estro en ovejas Dorset. *Agrociencia* 39: 11-18.

- Monroy, J. M. H. 1999. Uso de grasa de sobrepaso en la lactación de cabras en lactación avanzada. Tesis Ingeniero Agrónomo, Especialidad en Zootecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Morrison, C. D., Daniel, J. A., Holmberg, B. J., Djiane, J., Raver, N., Gertler, A. and Keisler, D. H. 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: Effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 168: 317-324.
- Moss, G. E., Crowder, M. E. and Nett, T. M. 1981. GnRH-receptor interaction. VI. Effect progesterone and estradiol on hypophyseal receptors for GnRH, and serum and hypophyseal concentrations of gonadotropins in ovariectomized ewes. *Biol. Reprod.* 25: 938-944.
- Muñoz-Gutiérrez, M., Blache, D., Martin, G. B., and Scaramuzzi, R. J. 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 124: 721–731.
- Murdoch, W. J., Peterson, T. A., VanKirk, E. A., Vincent, D. L. and Inskoop, E. K. 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.* 35: 1187-1194.
- Mustafa, Q. H., Ababneh, M. M., and Abu-Ruman, D. S. 2007. The effects of short or long term FGA treatment with or without eCG on reproductive performance of ewes bred out-of-season. *Ame. J. Anim. Vety. Sci.* 2 (1): 23–28.
- Navarro, L. y Torres, A. 1984. Duración, frecuencia e incidencia natural del estro en ovejas West African en la mesa de Guanipa. *Zootec. Trop.* Vol. 2: 39-49.
- Needleman, P., J. Turk., B.A. Kakshik., A.R. Morrison, and J.B. Lefkowitz. 1986. Arachidonic acids metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 69-102.
- Nett, T. M., Flores, J. A., Carnevali, F. and Kil, J. P. 1990. Evidence for direct negative effect of estradiol at the level of the pituitary gland in sheep. *Biol. Reprod.* 43: 554-558.
- Nett, T. M., McClellan, M. C. and Niswender, G. D. 1976. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: Blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol. Reprod.* 15: 66-78.
- Nissen HP, Kreysel HW. 1983. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrology.* 15: 264-9.
- Niswender, G. D. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction.* 123: 333-339.

- Niswender, G. D., Reichert, L. E., Midgley, A. R., and Nalbandov, A. V. 1969. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology* 84 (5): 1166-1173.
- Noel, B., Bister, J. L. and Paquay, R. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fert.* 99: 695-700.
- O'Callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L. J., and Boland, M. P. 2000. Effects of nutrition and superovulation on oocyte morphology, fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fert.* 118: 303-313.
- Ocon, O. M. and Hansen, P. J. 2003. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *J. Dairy. Sci.* 86: 1194-1200.
- Ohkura, S., Ichimaru, T., Itoh, F., Matsuyama, S. and Okamura, H. 2004. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinology.* 145 (7): 3239-3246.
- Okada, M., Ishida, N., Ogiso, T., Itagaki, R., Ishikawa, D. and Fukui, Y. 1999. Effect of dosage of equine chorionic gonadotropin combined with a single injection of porcine follicle-stimulating hormone for superovulation treatment in ewes. *J. Reprod. Dev.* 45: 307-313.
- Ollero M, Power RD, Alvarez JG. 2000. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol. Reprod. Dev.* 55:326-34.
- Osgerby, J. C., Gadd, T. S. and Wathes, D. C. 2003. Effect of maternal body condition on placental and fetal growth and insulin-like growth factor axis in Dorset ewes. *Reproduction.* 125: 717-731.
- Palmquist D.L. 1991. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 74: 1354-1360.
- Palmquist, D. L., and Moser, E. A. 1981. Dietary fat effects on blood insulin, glucose utilization, and milk protein content of lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 64: 1664-1670.
- Pant, H. C., Hopkinson, C. R. N. and Fitzpatrick, R. J. 1977. Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone, and follicle stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrus cycle. *J. Endocrinol.* 73: 247-255.
- Parks J.E, Lynch D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 29: 255-66.
- Pate, J.L. 1994. Cellular components involved in luteolysis. *J. Anim. Sci.* 72: 1884-1890.

- Paulenz H, Kommissrud E, Hofmo PO. 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on quality of lipid boar semen. *Reprod Dom Anim.* 35: 83-7.
- Penny P.C, Noble R.C, Maldjian A, Cerolini S. 2000. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pigs News Inform.* 121: 315-22.
- Pereira R.M, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista M.C, Vasques M.I, Horta A.E.M, Santos I.C, Marques M.R, Reis A, Silva Pereira M, Marques C.C. 2008. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans 10,cis 12* conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Anim Reprod Sci* 106:322-332.
- Petersen, S. L., Ottem, E. N. and Carpenter, C. D. 2003. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol. Reprod.* 69: 1771-1778.
- Peura, T. T., Kleemann, D. O., Rudiger, S. R., Nattrass, G. S., McLaughlan, C. J. and Walker, S. K. 2003. Effect of nutrition of oocyte donor on the outcomes of somatic cell nuclear transfer in the sheep. *Biol. Reprod.* 68: 45-50.
- Plascencia, A., Mendoza, G., Vásquez, C. y Zinn, R. 2005. Factores que influyen en el valor nutricional de las grasas utilizadas en las dietas para bovinos de engorda en confinamiento: Una revisión. *Interciencia* 30 (3): 134-142.
- Ponter A.A, Guyader C, Nuttinck F, Grimard B, Humblot P. 2012. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. *Theriogenology.* 78: 632-645.
- Poulos A, Sharp P, Jhoson D White I, Fellenberg A. 1986. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem J.* 240:891-895.
- Prieto, G. B. y Velázquez, P. M. 2002. Fisiología de la reproducción: Hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev. Fac. Med. UNAM.* Vol. 45. No. 6. 252-257.
- Prior, R. L. and Christenson, R. K. 1978. Insulin and glucose effects on glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 46: 201-210.
- Quirke, J. F., Bradford, G. E., Famula, T. R. and Torrell, D. T. 1985b. Ovulation rate in sheep selected for weaning weight or litter size. *J. Anim. Sci.* 61: 1421-1430.
- Quirke, J. F., Hanrahan, J. P., and Gosling, P. J. 1981. Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. *J. Reprod. Fert.* 61: 265-272.

- Quirke, J. F., Stabenfeld, G. H. and Bradford, G. E. 1985. Onset of puberty and duration of the breeding season in Suffolk, Rambouillet, Finnish Landrace, Dorset and Finn-Dorset ewe lambs. *J. Anim. Sci.* 60: 1463-1471.
- Ravindra, J. P., Rawlings, N. C., Evans, C. O. and Adams, G. P. 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fert.* 101: 501-509.
- Recabarren, S. E., Muños, P., Lobos, A., Vilches, C. y Parilo, J. 2006. Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Arch. Med. Vet.* Vol. 38. No. 1. 39-46.
- Renquist, B. J., Adams, T. E., Adams, B. M. and Calvert, C. C. 2008. Dietary restriction reduce the rate of estradiol clearance in sheep (*Ovis aries*). *J. Anim. Sci.* 86: 1124-1131.
- Rhoads, M. L., Gilbert, R. O., Lucy, M. C. and Butler, W. R. 2004. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 87: 2896-2901.
- Robinson, J. E. and Kendrick, K. M. 1992. Inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe by progesterone: associated changes in the release of gamma-aminobutyric acid and noradrenaline in the preoptic area as measured by intracranial microdialysis. *J. Neuroendocrinol.* 4: 231-236.
- Robinson, J. J., Ashworth, C. J., Rooke, J. A., Mitchell, L. M., and McEvoy, T. G. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Tec.* 126: 259-276.
- Robinson, R. S., Pushpakumara, P. G. A., Cheng, Z., Peters, A. R., Abayasekara, D. R. E., and Wathes, D. C. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction* 124: 119-131.
- Roche, J. F., Karsch, F. J., Foster, D. L. and Dziuk, P. J. 1974. Serum LH in ewes following sequential removal of ovaries follicles, corpora lutea and stroma. *J. Reprod. Fert.* 40: 215-218.
- Rooke J.A, Shao C.C, Speake B.K. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pigs spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction.* 121: 315-22.
- Rosales, T. A. M. y Guzmán, S. A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revisión. Téc. Pecu. Méx.* 46 (2): 159-182.
- Roy, F., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E., Pobel, T., Delétang, F., Combarous, Y., Guillou, F. and Maurel, M. C. 1999. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol. Reprod.* 61: 209-218.

- Rubianes, E. 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Act. Fisiol.* 6: 93-103.
- Rubio, J. M., Hallford, D. M. and Hawkins, D. E. 1997. Effect of glucose administration during the estrous cycle on serum hormone profiles, mRNA for steroidogenic enzymes, and breeding performance of ewes. *J. Anim. Sci.* 75: 775-780.
- Russel, A. J. F., Doney, J. M. and Gunn, R. G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72: 451-454.
- Rutter, L. M. and Manns, J. G. 1986. Changes in metabolic and reproductive characteristics associated with lactation and glucose infusion in the postpartum ewe. *J. Anim. Sci.* 63: 583-545.
- Rutter, L. M. and Randel, R. D. 1984. Postpartum nutrient intake and body condition: Effect on pituitary function and onset of estrus in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 58: 265-274.
- Safarinejad M.R, Hossein S.Y, Dakhah F, Asgari M.A. 2010. Relationship of omega 3 omega 6 fatty acids with semen characteristic, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparasion between fertile and infertile men. *Clin Nutr.* 29: 100-5.
- SAGARPA. 2009. Inventario de Ganado Ovino de 2005. Centro de Estadística Agropecuario (CEA). [web en línea]. Disponible desde Internet: [http:// www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx). (Revisado el 23 de julio de 2009).
- Sanocka, D, and M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 (12): 1-7.
- Scaramuzzi, R. J. and Radford, H. M. 1983. Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 69: 353-367.
- Scaramuzzi, R. J., Campbell, B. K., Downing, J. A., Kendall, N. R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M., and Somchit, A. 2006. A review of effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 339-354.
- Schillo, K. K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in the cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1271-1282.
- Schneider, J. E. 2004. Energy balance and reproduction. *Phys. Behav.* 81: 289-317.
- Scott, T. W. and Ashes, J. R. 1993. Dietary lipids for ruminants: protection, utilization and effects on remodeling of skeletal muscle phospholipids. *Aust. J. Agric. Res.* 44 (3): 495-508.

- Shafiee-Kermani, F., Han, S. and Miller, W. L. 2007. Chronic gonadotropin-releasing hormone inhibits activin induction of the ovine follicle-stimulating hormone β subunit: Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein and nitric oxide synthase type I. *Endocrinology*. 148 (7): 3346-3355.
- Silva, S. R., Gomes, M.J., Silva, A., Gil, L. F., and Azevedo, J. M. T. 2005. Estimation *in vivo* of the body and carcass chemical composition of growing lambs by real-time ultrasonography. *J. Anim. Sci.* 83: 350–357.
- Skinner, D. C. and Herbison, A. E. 1997. Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and β -endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology* 138: 2585-2595.
- Skinner, D. C. and Malpoux, B. 1999. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140: 4399-4405.
- Skinner, D. C., Harris, T. G. and Evans, N. P. 2000. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol. Reprod.* 63: 1135-1142.
- Smeaton, T. C. and Robertson, H. A. 1971. Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fert.* 25: 243-252.
- Smith M. F., McIntush E. W. and Smith, G. W. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72: 1857-1872.
- Smith, M.F., E.W. McIntush, and G.W. Smith. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72: 1857-1872.
- Somchit, A., Campbell, B. K., Khalid, M., Kendall, N. R., and Scaramuzzi, R. J. 2007. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology* 68: 1037–1044.
- Sorensen, A., Adam, C. L., Findlay, P. A., Marie, M., Thomas, L., Travers, M. T. and Vernon, R. G. 2002. Leptin secretion and hypothalamic neuropeptide and receptor gene expression in sheep. *Am. Phys. Reg. Integ. Comp. Physiol.* 282: R1227-R1235.
- Souza, C. J. H., Campbell, B. K. and Baird, D. T. 1997. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 56: 483-488.

- Spitzer, J. C., Niswender, G. D., Seidel, G. E. and Wiltbank, J. N. 1978. Fertilization and blood levels of progesterone and LH in beef heifers on a restricted energy diet. *J. Anim. Sci.* 46: 1071-1077.
- Steel R, Hasler J.F. 2004. Pregnancy rates from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. *Reprod Fertil Dev.* 16: 182-3.
- Sturme R.G, Reis A, Leese H.J, McEvoy T.G. 2009. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Dom Anim.* 44: 50-58.
- Sullivan, S. D. and Moenter, S. M. 2005. GABAergic integration of progesterone and androgen feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol. Reprod.* 72: 33-41.
- Surai P.F, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard J.P, Wishart G.J, Ceroline S, Sparks N.H. 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 120:527-533.
- Suttie, J. M., Foster, D. L., Vennvliet, B. A., Manley, T. R. and Corson, I. D. 1991. Influence of food intake but independence of body weight on puberty in female sheep. *J. Reprod. Fert.* 92: 33-39.
- Tatman, W. R., Judkings, M. B., Dunn, T. G., and Moss, G. E. 1990. Luteinizing hormone in nutrient-restricted ovariectomized ewes. *J. Anim. Sci.* 68: 1097-1102.
- Tavilini H, Doosti M, Abdi K, Vaisiraygani A, Joshaghani HR. 2006. Decrease polyunsaturated and increase saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia.* 38:173-8.
- Teixeira, A., Matos, S., Rodrigues, S., Delfa, R., and Cadavez, V. 2006. *In vivo* estimation of lamb carcass composition by real-time ultrasonography. *Meat Sci.* 74: 289-295.
- Thatcher, W.W., M.D. Meyer, and G. Danet-Desnoyers. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49: 15-28.
- Thiéry, J. C., Martin, G. B., Tillet, Y., Caldani, M., Quentin, M., Jamain, C. and Ravault, J. P. 1989. Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during season anestrus. *Neuroendocrinology.* 49: 80-87.
- Thomas, L., Wallace, J. M., Aitken, R. P., Mercer, J. G., Trayhurn, P. and Hoggard, N. 2001. Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J. Endocrinol.* 169: 465-476.

- Thomas, M. G., Bao, B. and Williams, G. L. 1997. Dietary fats varying in their fatty composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. *J. Anim. Sci.* 75: 2512-2519.
- Timurkan, H. and Yildiz, H. 2005. Synchronization of oestrus in Hamdani ewes: The use of different PMSG doses. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 49: 311-314.
- Ungerfeld, B.R., Carbajal, B., Rubianes, E., and Forsberg, M. 2005. Endocrine and ovarian changes in response to the ram effect in medroxyprogesterone acetate-primed Corriedale ewes during the breeding and nonbreeding season. *Acta Vet. Scand.* 46:33-44.
- Ungerfeld, R. and Rubianes, E. 2002. Short term priming with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG estrous induction in anestrus ewes. *Small. Rum. Res.* 46: 63-66.
- Uribe-Velásquez, L. F., Oba, E. y Souza, M. I. L. 2008. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Arch. Med. Vet.* 40: 83-88.
- Urviola, M., Leyva, V., Huamán, H., y García, W. 2005. Manipulación de la ovulación del folículo dominante con prostaglandina en diferentes estadios del ciclo estrual sobre las tasas reproductivas en ovinos Corriedale. *Rev. Inv. Vet. Peru* 16 (2): 103–113.
- Van Cleeff, J., Karsh, F. J., and Padmanabhan, V. 1998. Characterization of endocrine events during the peri-estrous period in sheep after estrous synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15 (1): 23-34.
- Van Houten, M. and Posner, B. I. 1981. Cellular basis of direct insulin action in the central nervous system. *Diabetologia.* 20: 255-267.
- Van Houten, M., Posner, B., Kopriwa, B., and Brawer, J. 1980. Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus. *Science.* 207. 1081–1083.
- Viñoles, C., Forsberg, G., Banchero, G., and Rubianes, E. 2002. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Anim. Sci.* 74: 539–545.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchero, G. and Rubianes, E. 2000. Effect of long-term and short-term progestogen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55: 993-1004.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Martin, G. B., Cajarville, C., Repetto, J., and Meikle, A. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition effects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129: 299-303.

- Wade, G. N., and Jones, J. E. 2004. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R1277–R1296.
- Wamsley, N.E., P.D. Burns., T.E. Engle, and R.M. Enns. 2005. Fish meal supplementation alters uterine prostaglandin F_{2α} synthesis in beef heifers with low and luteal-phase progesterone. *J. Anim. Sci.* 83: 1832-1838.
- Watanabe, H., Miyamoto, A., Okada, M., Ishida, N., Kimura H. and Fukui, Y. 1998. A simple superovulation method of a single injection of follicle-stimulating hormone combined with equine chorionic gonadotropin for superovulation of Suffolk ewes during the breeding season: I. Effects of different treatments on the endocrine profiles. *J. Reprod. Dev.* 44: 169-176.
- Wathes, D.C., D.R.E. Abayasekera, and R.J. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Bio. Reprod.* 77: 190-201.
- Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 481-492.
- Webb R, Capmbell B.K, Garverick H.A, Gonj J.G, Gutierrez C.G, Armstrong D.G. 1999. Molecular Mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Suppl.* 54: 33-48.
- Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J. L. and Armstrong, D. G. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 82: 63-74.
- Weems, Y.S., P.J. Bridges., Y. Tanaka., R.G. Sasser., B.R. LeaMaster., D.L. Vincent, and C.W. Weems. 1997. PGE1 or PGE2 not regulates secretion of progesterone *in vitro* by the 88-90 day ovine corpus luteum of pregnancy. *Prostaglandin.* 53: 337-353.
- Wiggins, E. L., Barker, H. B. and Miller, W. W. 1970. Estrual activity in open Rambouillet ewes. *J. Anim. Sci.* 30: 405-408.
- Wildeus, S. 2000. Current concept in synchronization of estrus: sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 77: 1-14.
- Wintermantel, T. M., Campbell, R. E., Porteous, R., Bock, D., Grône, H. J., Todman, M. G., Korach, K. S., Greiner, E., Pérez, C. A., Schütz, G. and Herbison, A. 2006. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin releasing hormone neurons and fertility. *Neuron.* 52: 271-280.
- Wood, R. I., Ebling, F. J., I'anson, H. and Foster, D. L. 1991. The timing of neuroendocrine sexual maturity in the male lamb by photoperiod. *Biol. Reprod.* 45: 82-88.

- Wu, Z. and Palmquist, L. 1991. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. J. Dairy. Sci. 74: 3035-3046.
- Zachut M, Arieli A, Lehrer H, Argov N, Moallem U. 2008. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. Reproduction. 135: 683-692.
- Zaniboni L, Cerolini S. 2009. Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to reduce *in vitro* peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. Anim Reprod Sci.112: 51-65.
- Zavala, M., Greyling, J. P. C., Schwalbach, L. M. J., Muller, T. and Erasmus, J. A. 2005. Effect of progestagen and PMSG on oestrus synchronization and fertility on Dorper ewes during the transition period. Small Rum. Res. 56: 47-53.
- Zelege, M., Greyling, J. P. C., Schwalbach, L. M- J., Muller, T., and Erasmus, J. A. 2005. Effect of progestagen and PMSG on ostrus synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. Small Rum. Res. 56: 47–53.
- Zeron Y., Sklan D., Arav A. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. Mol Reprod Dev. 61:271-278.
- Zeron, Y., A. Ocheretny., O. Kedar., A. Borochoy., D. Sklan, and A. Arav. 2001. Season change in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction. 121: 447-454.

7 CAPITULO I. INFLUENCIA DE HARINA Y ACEITE DE PESCADO EN EL PERFIL HORMONAL Y VARIABLES REPRODUCTIVAS DE OVEJAS INSEMINADAS MEDIANTE LAPAROSCOPIA

7.1 Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de un período corto de alimentación utilizando una dieta que contenía aceite y harina de pescado, sobre el perfil de progesterona (P_4), insulina (INS) y variables reproductivas como presentación de estro, gestación y prolificidad en ovejas primaras con inseminación artificial por laparoscopia (IAL). Cuarenta y dos ovejas Dorset fueron asignadas a dos grupos experimentales. Grupo HAP (n=21) adicionado con harina y aceite de pescado (4 y 0.8 % respectivamente, con base en materia seca) y el grupo testigo (TES, n=21) sin la adición de estos ingredientes. Las ovejas se pre-sincronizaron con prostaglandinas $F_{2\alpha}$, posteriormente se sincronizaron con esponjas de cronolone durante 11 días y al momento de su retiro recibieron 200 UI de eCG. La IAL inició a las 48 h de retirada la esponja y detectado el estro. El tiempo del inicio del estro fue diferente ($P < 0.05$; TES: 35.1 ± 2.1 ; HAP 41.0 ± 1.8 h), sin embargo, la presentación de estros no fue diferente ($P > 0.05$) entre grupos. No se encontraron diferencias en concentraciones promedio de P_4 (HAP: 3.8 ± 1.2 ; TES: 3.5 ± 1.4 ng mL^{-1}) e INS en suero (HAP: 0.12 ± 0.02 ; TES: 0.13 ± 0.03 ng mL^{-1}). La alimentación con HAP no influyó en el porcentaje de gestación (HAP: 52 %; TES: 55%) pero si en el índice de prolificidad (HAP: 1.63; TES: 1.25) entre tratamientos ($P < 0.05$). Se concluye que la adición de HAP durante un periodo corto en ovejas primaras modifica el tiempo de inicio del estro y la prolificidad.

Palabras clave: Laparoscopia, ácidos grasos poliinsaturados, progesterona, insulina, ovejas.

7.2 Introducción

La fertilidad de la hembra al utilizar IAL es influenciada por diversos factores como el estado nutricional, fisiológico y corporal, aunado al sistema de explotación de la granja y factores ambientales (Paulenz *et al.*, 2002; Anel *et al.*, 2005).

Es importante comprender los mecanismos que regulan la nutrición sobre los aspectos reproductivos y su impacto en la fertilidad (Hess *et al.*, 2008). La suplementación con fuentes energéticas durante periodos cortos en los días 9 al 13 del ciclo estral modifican la secreción de hormonas metabólicas, las oleadas foliculares y la tasa ovulatoria (Viñoles *et al.*, 2005; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

En este sentido, la adición de ingredientes con fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) Ω 3 y 6 en la alimentación de rumiantes han influido en el crecimiento de folículos, desarrollo embrionario, actividad uterina, componentes de membrana celular, síntesis de esteroides y prostaglandinas (Heravi *et al.*, 2007; Zachut *et al.*, 2008); sin embargo, los efectos específicos de estos ácidos grasos en los procesos reproductivos son variables.

Dietas con altas concentraciones de Ω -3 están asociadas con bajo colesterol en plasma (Robinson *et al.*, 2002) lo cual puede repercutir en la síntesis de hormonas esteroideas como la progesterona (P_4) y el estradiol (E_2), además, se han reportado folículos ovulatorios y cuerpos lúteos de mayor tamaño en vacas lecheras alimentadas con estos ácidos grasos (Petit *et al.*, 2002; Ambrose *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2011) por el contrario, dietas altas en Ω -6 se relacionan con un incremento de colesterol lo que posiblemente estimule la producción de P_4 (Wathes *et al.*, 2007).

En otros trabajos (Thangavelu *et al.*, 2007; Childs *et al.*, 2008) se reportó que dietas adicionadas con harina y aceite de pescado como fuente AGP Ω -3 suprimen la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ mediante la

reducción de su precursor el ácido araquidónico, lo que repercute de manera directa sobre la regresión lútea y favorece al reconocimiento materno, influyendo en el porcentaje de gestación y prolificidad; no obstante, no existen referencias que comprueben los efectos directos de los AGP Ω -3 en la fertilidad de la oveja.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue examinar el efecto de una alimentación focalizada con una dieta basada en harina y aceite de pescado como fuentes de AGP Ω -3 en el perfil hormonal de progesterona (P_4), insulina (INS) y variables reproductivas como presentación del estro, gestación y prolificidad en ovejas primaras inseminadas por laparoscopia.

7.3 Materiales y métodos

El estudio se realizó en la unidad ovina de la granja experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, de acuerdo a las normas de ética y bioseguridad (CIOMS, 1986) y leyes mexicanas (NOM-062-ZOO-1999) para el uso de animales experimentales (DOF, 2001).

Animales y tratamientos

Se utilizaron 42 ovejas de las razas Dorset; en época reproductiva, con un peso promedio de 54 ± 4.2 kg y una condición corporal de 3 en escala de 1 a 5 (Russel *et al.*, 1969), las cuales fueron previamente desparasitadas (IVOMECC®, Merial) y vitaminadas (Vigantol A.D.E®, Bayer), además se realizó una ecografía transvaginal con un ultrasonido SONOVET 600 para determinar que no se encontraran gestantes.

Las ovejas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales para probar dos dietas. Los tratamientos evaluados: el grupo HAP (n=21) adicionado con harina y aceite de pescado (4 y 0.8 % respectivamente, con base en materia seca) y grupo testigo (TES, n=21) sin la adición de

estos ingredientes (Cuadro 1). Ambas dietas se formularon para ser isoenergéticas e isoproteicas y cubrir los requerimientos de proteína cruda (14 %) y energía metabolizable (2.6 Mcal kg^{-1}) de acuerdo a los requerimientos para ovinos (NRC, 2007).

Las ovejas fueron alojadas en jaulas individuales de $1.2 \times 2.0 \text{ m}$ (2.4 m^2), ofreciendo por animal 0.8 kg d^{-1} de alimento, posteriormente fueron liberadas en corrales con sombra en donde recibieron agua a libre acceso.

El periodo de alimentación de las ovejas con las dietas experimentales fue de 15 días (d), iniciando cuatro días antes de la inserción de las esponjas para la sincronización del estro y terminando el día del retiro de las esponjas intravaginales.

Sincronización del estro

Las ovejas fueron pre-sincronizadas con dos aplicaciones de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ (65 mg de cloprostenol, Celosil®, Schering-Plough) a intervalos de ocho días cada una, para que todas las ovejas presentaran la misma fase del ciclo estral; seis días después de la última aplicación se colocó intravaginalmente a cada oveja una esponja con 20 mg de cronolone, (Chronogest®, Intervet), durante un periodo de 11 días, al momento del retiro recibieron una inyección intramuscular de 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligon®, Intervet).

La detección del estro se inició 24 h después del retiro de la esponja con ayuda de sementales con mandil; posteriormente se monitoreó el comportamiento del estro cada 6 h, durante 48 h, para determinar el inicio del mismo antes de la IAL.

El diagnóstico de gestación se confirmó a los 30 días posteriores de la inseminación utilizando un equipo de ultrasonido Sonovet 600 con un transductor de 7,5 MHz, por vía transrectal (Medison, Inc., Cypress, California, EUA).

Inseminación artificial por laparoscopia

Todas las ovejas fueron dietadas durante 24 h antes de ser inseminadas con semen congelado (pajillas de 0.25 mL, con 90×10^6 espermatozoides). La tranquilización preanestésica se realizó con una inyección intramuscular de hidrocloreuro de xilacina al 2% (Rompun®, Bayer) en una dosis de 0.1 mL 10 kg^{-1} de peso vivo; como anestésico se aplicó ketamina (Anesket®, Pisa) en una dosis de 0.2 mL 10 kg^{-1} de peso vivo por vía endovenosa (Mejía, 1997). La inseminación artificial se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Ramírez *et al.* (2005).

Toma de muestras y análisis de laboratorio

Las muestras de sangre (5 mL) fueron colectadas mediante punción de la vena yugular a las 09:00 h (2 h después de la alimentación). Para determinar la concentración de P_4 en suero, las muestras se colectaron dos días antes de insertar las esponjas, y posteriormente cada 48 h durante el ciclo estral sincronizado (12 días). Las muestras de INS se colectaron cada 48 h durante 15 días, periodo correspondiente a la alimentación con las dietas experimentales.

Todas las muestras se centrifugaron a 1500 g a 4°C durante 15 min en una centrífuga (IEC Centra 8R, International Equipment Company, EUA); el suero sanguíneo fue separado y almacenado en tubos de polipropileno para su conservación a -20 °C en un congelador hasta realizar el análisis hormonal.

Los análisis de P₄ se realizaron mediante ensayo inmunoenzimático (Immunometrics, UK Ltd, 280 Muster Road, London SW6 6BQ). La sensibilidad analítica fue de 0.13 ng mL⁻¹ con coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9.59 y 13.7 %, respectivamente. La determinación de las concentraciones de INS se realizó por RIA con una sensibilidad de 4.09 ng mL⁻¹ y coeficientes de variación intra e inter ensayo de 1.44 y 0.25%, respectivamente.

Las dietas experimentales fueron analizadas en el laboratorio para determinar la concentración de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990); energía bruta en una bomba calorimétrica adiabática (Oxygen Bomb Calorimeter, Parr Instruments Co. Illinois, EUA); calcio por espectrofotometría de absorción atómica (Espectrofotómetro Varian Spectr AA 10 plus, Varian, Australia), y fósforo total por espectrofotometría de absorción de rayos UV (Espectrofotómetro Varian Cary 1E UV-vis, Varian, Australia), siguiendo las metodologías de Fick *et al.* (1979).

La determinación de lípidos totales de las dietas experimentales (Cuadro 2) se realizó siguiendo el método 923.07 de la AOAC (2000). La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases en un equipo Varian 3400 CX (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) con auto-muestreador 8400 y detector de ionización de flama; la columna utilizada fue una DB23 (30 m X 0.25 mm d.i., Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), utilizando N₂ como gas acarreador a un flujo de 30 mL min⁻¹. La concentración de los ácidos grasos de la muestra se calculó utilizando el área de cada pico con relación al área conocida del estándar.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, en donde cada oveja representó una unidad experimental. El porcentaje de presentación de estros y gestación fueron analizados a través de la prueba de χ^2 por medio del PROC FREQ. Para el inicio del estro se realizó un análisis de varianza por medio del PROC GLM y la prueba de comparación de medias de Tukey. Para la concentración de P_4 e INS se realizó un análisis de varianza de mediciones repetidas a través del tiempo por medio del procedimiento PROC MIXED, el cual incluyó efectos fijos del tratamiento y día, e interacción de ambos. Para este procedimiento, la estructura de covarianza fue modelada usando el efecto de la oveja dentro del grupo, determinándose para la presente variable usar la estructura autoregresiva de primer orden (AR 1) para determinar la correlación entre las mediciones secuenciales dentro del mismo animal (Littell *et al.*, 1998). Los valores medios fueron comparados por el método de medias de mínimos cuadrados. Todos los procedimientos fueron realizados por el paquete del sistema de análisis estadístico (SAS, 2009).

7.4 Resultados

Presentación e inicio del estro

El inicio del estro fue diferente ($P < 0.05$, Cuadro 3) entre tratamientos, presentando el estro temprano el grupo TES (35.1 ± 2.1 h) en relación al grupo HAP (41.0 ± 1.8 h). La presentación del estro en respuesta a la sincronización no mostró diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos, registrando 95 % para el grupo TES y 100 % para el grupo HAP.

Perfil hormonal

Progesterona (P₄)

No se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$) por efecto de la adición de la harina y aceite de pescado en las concentraciones promedio de P₄ en suero (HAP: 3.8 ± 1.2 ; TES: 3.5 ± 1.4 ng mL⁻¹), no obstante, la concentración de P₄ fue diferente ($P < 0.05$) el d 8 de la fase lútea sincronizada (HAP: 5.5 ± 1.4 ; TES: 4.2 ± 1.2 ng mL⁻¹), antes del retiro de la esponja (Fig. 3).

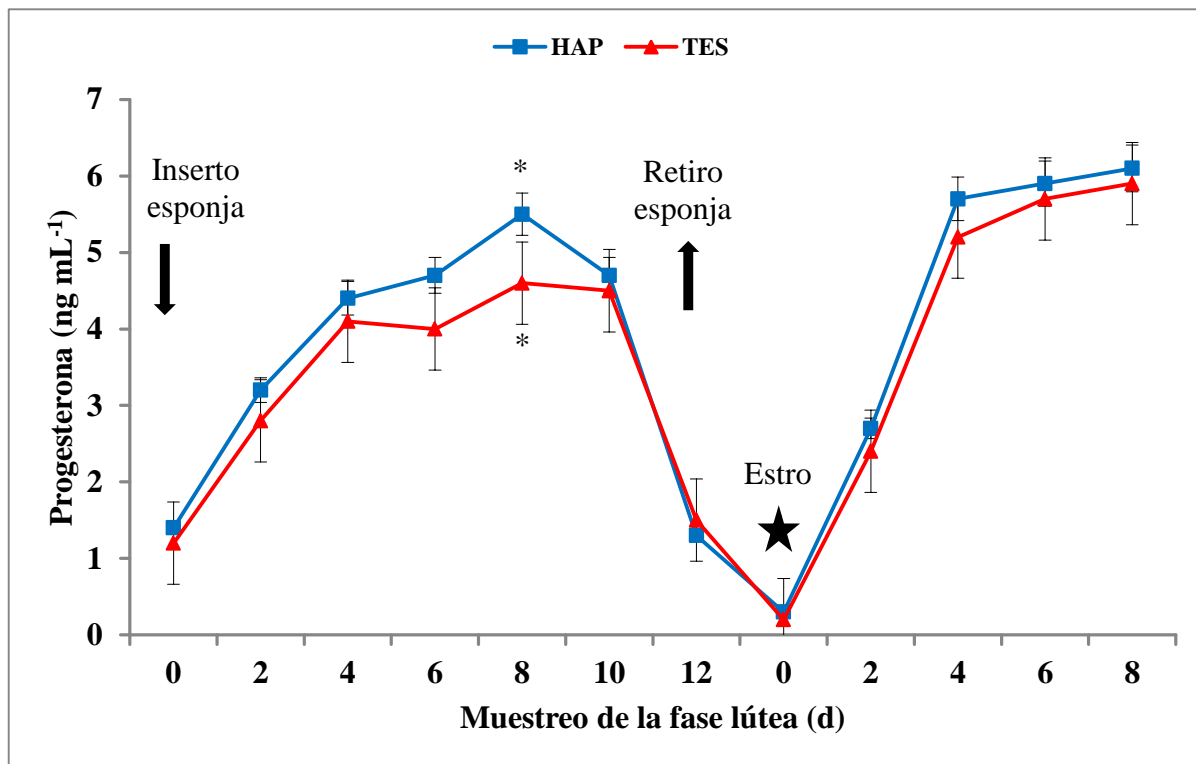


Fig. 3. Concentración de progesterona durante la fase lútea sincronizada de ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES).

HAP: Grupo adicionado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo Testigo. * Indica diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo.

Insulina (INS)

No se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$) por efecto de la adición de harina y aceite de pescado en las concentraciones promedio de INS en suero (HAP: 0.12 ± 0.02 ; TES: 0.13 ± 0.03 ng mL⁻¹) sin embargo, las concentraciones de INS se vieron influenciadas ($P < 0.05$) por la interacción de dieta X tiempo los d 10, 16 y 18 del periodo de alimentación, Fig. 4 (HAP: 0.13 ± 0.06 , 0.13 ± 0.04 , 0.14 ± 0.02 ; TES: 0.20 ± 0.01 , 0.09 ± 0.04 , 0.10 ± 0.03 ng mL⁻¹), respectivamente.

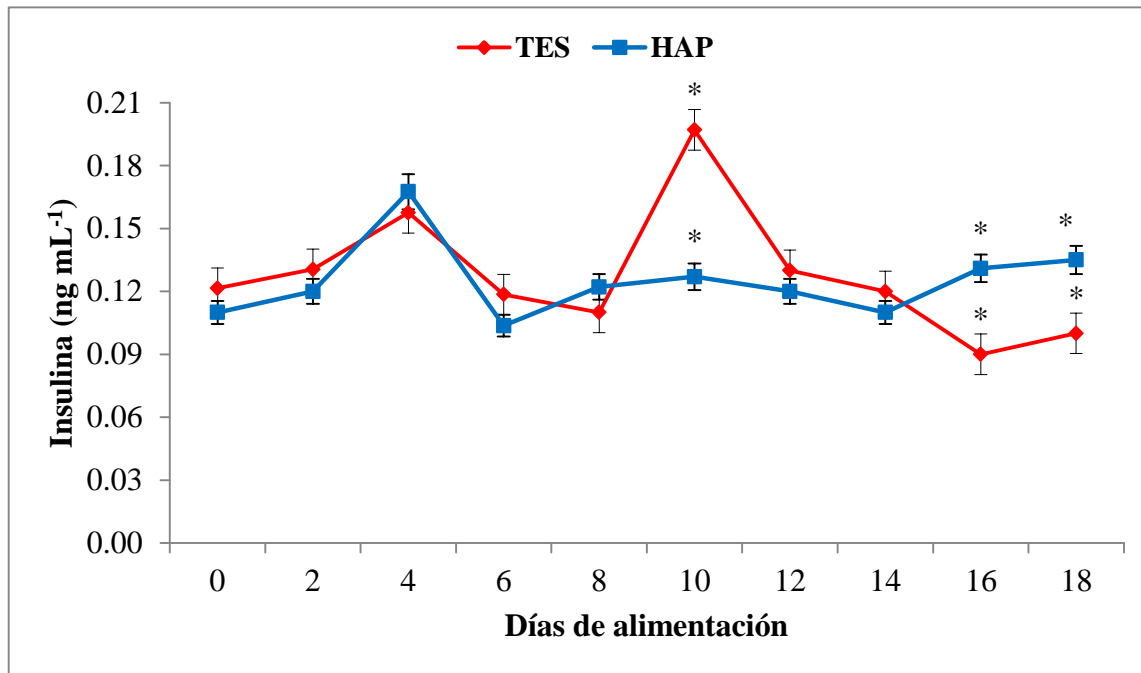


Fig. 4. Concentración de insulina en ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), inseminadas mediante laparoscopia.

HAP: Grupo adicionado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo Testigo. * Indica diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo.

Gestación y prolificidad

El porcentaje de ovejas gestantes entre tratamientos hasta el día 30 no fue diferente ($P > 0.05$; TES: 55 y HAP: 52 %; Cuadro 3); sin embargo, al parto se presentaron diferencias en el índice de prolificidad ($P < 0.05$), siendo mayor el grupo HAP (1.63) respecto al grupo TES (1.25).

7.5 Discusión

Presentación e inicio del estro

El inicio del estro en respuesta a la sincronización del grupo TES (35.1 ± 2.1 h) presentó resultados similares a lo reportado por Ali (2007) quien observó un tiempo de 32 ± 5.6 h, después de retirada la esponja, mientras que Mustafa *et al.* (2007) reportan un inicio de estro de 34.5 ± 2.6 h posterior al retiro de la esponja.

Respecto al efecto de los AGP sobre la presentación de estros se menciona que la alimentación con Ω -6 en rumiantes puede adelantar el inicio del mismo posiblemente por un incremento en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y, por ende, la estimulación temprana en la luteólisis (Mattos *et al.*, 2000). Sin embargo, este efecto no fue posible observarlo debido a las hormonas utilizadas para la sincronización. Por otra parte en el grupo HAP se presentó un estro más tardío (41.0 ± 1.8 h), posiblemente debido al incremento de P_4 el d 8 antes del retiro de la esponja (Fig. 1).

En el presente trabajo se observó que los ácidos grasos linoleico y linolénico estaban en mayor concentración en la dieta suplementada con HAP, razón por la cual posiblemente se haya retrasado el inicio del estro. En vacas, se ha encontrado que el tipo de ácidos grasos como son linoleico y linolénico incrementan la concentración sérica de P_4 (Thangavelu *et al.*, 2007). Por lo tanto, los mecanismos que llevan a cabo los AGP (presentes en la harina y aceite de pescado)

para influir sobre el inicio del estro en ovejas todavía no se conocen en su totalidad y requieren investigaciones futuras.

La presentación del estro entre tratamientos en respuesta a la sincronización con esponjas intravaginales (95 y 100 %, TES y HAP, respectivamente) es semejante a otras investigaciones en las que reportan 87, 90 y 100 % de presencia de estros (Urviola *et al.*, 2005; Mustafa *et al.*, 2007); no obstante, en el presente trabajo la respuesta tanto en inicio, como en la presentación de estro probablemente sean independientes de la adición de AGP y pueden deberse a los fármacos utilizados en la sincronización.

Concentraciones de Progesterona (P₄) e Insulina (INS) en suero

Las concentraciones de P₄ en la presente investigación, con excepción del día 8 no se vieron influenciadas por la alimentación de ambos tratamientos (HAP y TES), y de acuerdo con la literatura el comportamiento de P₄ en respuesta a los AGP es inconsistente, en algunos reportes su concentración en suero incrementa (Stronge *et al.*, 2005), en otros disminuye (Robinson *et al.*, 2002; Nieto *et al.*, 2010) o simplemente no cambia (Mattos *et al.*, 2002; Heravi *et al.*, 2007).

Sin embargo, existe información donde se observa que la alimentación con dietas enriquecidas en AGP Ω -3 disminuyen la concentración de colesterol en plasma y, en contraparte, una dieta alta en Ω -6 es asociada con incrementos en colesterol (Robinson *et al.*, 2002), posiblemente el desbalance en proporciones de Ω -3 y -6 en la dieta puede modificar la síntesis de hormonas esteroideas como la P₄ y el E₂ debido a que el colesterol es el precursor (Wathes *et al.*, 2007). Wamsley *et al.* (2005) sugieren que los AGP Ω -3 presentes en la harina de pescado pueden disminuir la señal luteolítica en vacas con baja concentración de P₄ durante la fase lútea mediante

la supresión en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, lo que repercute de manera positiva en la fertilidad de la hembra.

La INS es una hormona metabólica esencial en los procesos reproductivos, existe evidencia de que la INS en plasma puede ser manipulada por la suplementación con AGP. Garnsworthy *et al.* (2008a), encontraron que la INS en vacas disminuye cuando cambia la alimentación de dietas isoenergéticas enriquecidas de almidón a dietas altas en grasa; en un segundo experimento Garnsworthy *et al.* (2008b), probaron la hipótesis de que la INS presenta una correlación negativa con el consumo de grasa en la dieta, cuando el animal excede los 15 g kg^{-1} de materia seca (MS) en la dieta (Megalac), sin embargo, en la presente investigación se utilizó la harina y aceite de pescado como fuente de ácidos grasos, pero cabe mencionar que la harina de pescado es también fuente de aminoácidos y esto pudiera estar influenciando los niveles de INS, sobre todo en la última fase (d 16 y 18) de alimentación (Proud, 2006; Newsholme *et al.*, 2007).

Gestación y prolificidad

Los resultados obtenidos en la tasa de gestación no estuvieron influenciados por las dietas experimentales (HAP y TES), sin embargo, el índice de prolificidad presentó un incremento en el grupo de ovejas alimentadas con HAP (1.63) respecto al grupo TES (1.25). A este respecto, la inclusión de ácidos grasos en la alimentación de vacas ha mejorado los porcentajes de gestación (Funston, 2004; Hess *et al.*, 2008), no obstante, en ovinos no existen estudios publicados que indiquen los efectos directos de los AGP sobre la fertilidad (Gulliver *et al.*, 2012).

Se han reportado incrementos en la tasa de gestación y disminución en pérdidas embrionarias en vacas que fueron alimentadas con dietas altas en Ω -3 comparadas con Ω -6 y grasas saturadas (Santos *et al.*, 2008; Wathes *et al.*, 2007), esto se debe a que AGP como el linoleico, linolénico,

eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) pueden inhibir la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediante la reducción de su precursor, el ácido araquidónico (Mattos *et al.*, 2000), en este contexto, se ha probado que los AGP Ω -3, EPA y DHA presentes en la harina y aceite de pescado pueden retrasar la regresión del cuerpo lúteo y mejorar la fertilidad favoreciendo la sobrevivencia del embrión (Burns *et al.*, 2003; Mattos *et al.*, 2004).

Por lo tanto, se esperaba que la dieta enriquecida con HAP incrementara la tasa de concepción, debido a la influencia de los AGP (Ω -3) en la disminución en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el reconocimiento materno (Bilby *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008); sin embargo, solo existió efecto sobre el índice de prolificidad. En este contexto se ha observado que la alimentación con dietas altas en AGP Ω -3 ha incrementado el tamaño promedio de folículos ovulatorios y el desarrollo de cuerpos lúteos, mientras que la respuesta se reduce cuando las hembras son alimentadas con dietas altas en Ω -6. Esto es importante ya que a pesar de que son pocos los estudios que reportan el efecto de los AGP Ω -3 y -6 en la tasa ovulatoria de rumiantes, se menciona que el número y tamaño de los folículos determinan la futura tasa ovulatoria y viabilidad del ovocito, que repercuten finalmente en gran proporción en la gestación y prolificidad (Petit *et al.*, 2002; Ambrose *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2011).

7.6 Conclusión

Bajo las condiciones en las que se realizó el presente experimento, se concluye que la adición de HAP como fuente de AGP Ω -3 en la dieta durante un periodo corto en ovejas primíparas no modificó las variables reproductivas presentación del estro y tasa de gestación, no obstante, sí influyó sobre el inicio del estro y la prolificidad. Por otra parte, las concentraciones de P_4 e INS presentaron pequeñas variaciones por efecto de los AGP, aunque estas no fueron concluyentes,

se requieren más investigaciones para determinar sus efectos en los procesos reproductivos de la oveja.

Cuadro 1. Contenido de nutrientes en las dietas experimentales adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), en ovejas inseminadas mediante laparoscopia.

Ingredientes (% MS ^a)	Dieta experimental	
	HAP	TES
Maíz	33.64	25.09
Sorgo	10.13	10.15
Pasta de soya	7.43	13.75
Harina de pescado	4.01	-
Aceite de pescado	0.84	-
Heno de avena	37.40	44.46
Melaza	4.75	4.76
Mezcla mineral ^b	1.80	1.79
Análisis determinado		
Proteína cruda (%)	14.20	14.45
Energía bruta (Mcal kg ⁻¹)	2.64	2.61
Calcio (%)	0.45	0.42
Fosforo (%)	0.36	0.31

^aMS: Materia seca. ^bMezcla mineral: Fosforo 10%, Calcio 12%, Hierro 0.5%, Magnesio 0.1%, Cobre 0.15%, Zinc 0.12%, Manganeso 0.055%, Cobalto 0.05%, Yodo 0.02%, Selenio 200 ppb, Vitamina A 50000 UI.

Cuadro 2. Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas experimentales adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), en ovejas inseminadas por laparoscopia.

Esteres metílicos de ácidos grasos (%)	Dieta experimental	
	HAP	TES
Palmítico	9.18	14.23
Palmitoleico	0.41	1.13
Heptadecanoico	N.D.	2.86
Esteárico	3.15	4.29
Oleico	25.60	28.05
Linoleico	52.20	40.12
α -Linolénico	4.28	2.64
Araquídico	0.65	0.46
Eicosenoico	0.28	1.23
Eicosapentanoico	0.89	0.30
Erúcico	1.16	1.09
Lignocérico	0.14	0.16
Otros	2.15	2.85
Saturados	13.12	22.63
Monoinsaturados	27.45	31.50
Poliinsaturados	59.52	45.91

N. D: No detectable

Cuadro 3. Respuesta de las variables reproductivas en ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado e inseminadas mediante laparoscopia.

Variables reproductivas	Tratamientos	
	HAP (n=21)	TES (n=21)
Presentación del estro (%)	100 (21/21)	95.2 (20/21)
Inicio del estro (h) ^{†1}	41.0 ± 1.8 ^a	35.1 ± 2.1 ^b
Gestante (%) ²	52 (11/21)	57 (12/21)
Índice de prolificidad ³	1.63 (18/11) ^a	1.25 (15/12) ^b

HAP: Grupo suplementado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo testigo.

¹ Tiempo referido al retiro de la esponja de FGA. ² Basado en los perfiles de P₄ en suero y ultrasonografía en el día 30. ³ Número de corderos nacidos por oveja parida. ^{a, b} Valores con distinta literal entre columnas son diferentes (P < 0.05). [†] Medias ± error estándar.

7.7 Literatura citada

- Ali, A., 2007. Effect of time of eCG administration of follicular response and reproductive performance of FGA – treated Ossimi ewes. *Small Rum. Res.* 72, 33-37.
- Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J. A., Zalkovic, P., 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 89, 3066-3074.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., De la Fuente, L.F., De la Paz, P., 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology.* 63, 1235-1247.
- AOAC., 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Arligton (VA): Association of Official Analytical Chemist. p: 1298.
- AOAC., 2000. Official methods of analysis. 17th ed. Arligton, D.C: Association of Official Analytical Chemist. p: 556.
- Bilby, T.R., Block, J., Do Amaral, B.C., Sa Filho, T., Silvestre, F.T., Hansen, P.J., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *J. Dairy Sci.* 89, 3891-3903.
- Burns, P.D., Engle, T.E., Harris, M.A., Enns, R.M., Whittier, J.C., 2003. Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in nonlactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 81, 2840-2846.
- Childs, S., Hennessy, A.A., Sreenan, J.M., Wathes, D.C., Cheng, Z., Stanton, C., Diskin, M.G., Kenny, D.A., 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology.* 70, 595-611.
- CIOMS (Council for international Organizations of Medical Sciences). 1986. “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”. CIOMS, Geneva, Switzerland.

- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2001. “Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. México, D.F.
- Fick, K.R., McDowell, L.R., Miles, R.H., Wilkins, J.D., Funk, J.D., Conrad, J.H., 1979. Methods of mineral analysis of plant and animal tissues. 2nd ed. Animal Science Department, University of Florida, Gainesville, F.L. USA.p: 736.
- Funston, R.N., 2004. Fat supplementation and reproduction in beef females. *J. Anim. Sci.* 82, E154-E161.
- Garnsworthy, P.C., Lock, A., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R., 2008a. Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. *J. Dairy Sci.* 91, 3814-3823.
- Garnsworthy, P.C., Sinclair, K.D., Webb, R., 2008b. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal.* 2, 1144-1152.
- Gulliver, C.E., Friend, M.A., King, B.J., Clayton, E.H., 2012. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 131, 9-22.
- Heravi M.A.R., Gilbert, R.O., Overton, T.R., Bauman, D.E., Butler, W.R., 2007. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating dairy cows. *A. Dairy Sci. Association.* 90, 145-154.
- Hess, B.W., Moss, G.E., Rule, D.C., 2008. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 86, 188-204.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216-1231.
- Mattos, R., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5, 38-45.

- Mattos, R., Staples, C.R., Williams, J., Amorocho, A., McGuire, A.M., Thatcher, W.W., 2002. Uterine, Ovarian, and production response of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J. Dairy Sci.* 85, 755-764.
- Mattos, R., Staples, C.R., Arteche, A., Wiltbank, M.C., Diaz, F.J., Jenkins, T.C., Thatcher, W.W., 2004. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF_{2α} milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87, 921–932.
- Mejía, V.O., 1997. Transferencia de embriones en pequeños rumiantes. *In: Memorias del curso de manejo reproductivo e inseminación artificial en pequeños rumiantes.* Facultad de Medicina y Veterinaria Zootecnia. UNAM. México. D.F. México. pp: 79-85.
- Mendoza, A., Crespi, D., Hernández, A., Roura, N., Valentin, H., La Manna, A., Cavestany, D., 2011. Effect of dietary supplementation with fish oil during the transition period on milk production, plasma metabolites and postpartum anoestrus interval in grazing dairy cows. *Anim. Prod. Sci.* 51, 481-489.
- Mustafa, Q.H., Ababneh, M.M., Abu-ruman, D.S., 2007. The effects of short or long term FGA treatment with or without eCG on reproductive performance of ewes bred out-of-season. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2 (1), 23-28.
- National Research Council (NRC)., 2007. Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press, Washington D.C.
- Newsholme, P., Bender, K., Kiely, A., Brennan, L., 2007. Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Bio. Soc. Trans.* 35, 1180-1186.
- Nieto, R., Sánchez, T.M., Mejía, O., Olivares, L., Peralta, J.J., Cordero, J.L., Molina, P. Cárdenas, M., 2010. Grasa de sobrepeso en ovejas con diferente espesor de grasa dorsal, respuesta hormonal y principales variables reproductivas. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 20 (6), 665-673.

- Paulenz, H., Adnoy, T., Fossen, O. H., Soderquist, L., Berg, K. A., 2002. Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. *Vet. Rec.* 150, 299-302.
- Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresing, W., Twagiramungu, H., Mann, G.E., 2002. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J. Dairy Sci.* 85, 889-899.
- Proud, C.G., 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. *Bio. Soc. Trans.* 34, 213-216.
- Ramírez, M. A., Martínez, R. R., Mejía, V. O., Soto, C. R., 2005. Modificación de la técnica de inseminación artificial intrauterina mediante laparoscopia en ovejas pelibuey. *Agrociencia.* 39, 589-593.
- Robinson, R., Pushpakumara, P., Cheng, Z., Peters, A., Abayasekara, D., Whates, D., 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction.* 124, 119-131.
- Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72, 451-454.
- Santos, J.E.P., Bilby, T.R., Thatcher, W.W., Staples, C.R., Silvestre, F.T., 2008. Long chain fatty acids of diets as factors influencing reproduction in cattle. *Repro. Domest. Anim.* 43, 23-30.
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz, G. M. Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 339-354.
- Statistical Analysis System Institute (SAS). 2009. *SAS User's Guide: Statistics (Version 5)*. Cary, N.C. U.S.A. Inst. Inc. 584 pp.

- Stronge, A.J., Sreenan, J.M., Diski, M.G., Meet, J.F., Kenny, D.A., Morris, D.G., 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64, 1212-1224.
- Thangavelu, G., Colazo, M.G., Ambrose, D.J., Oba, M., Okine, E.K., Dyck, M.K., 2007. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 68, 949-957.
- Urviola, M., Leyva, V., Huamán, H., García, W., 2005. Manipulación de la ovulación del folículo dominante con prostaglandina en diferentes estadios del ciclo estral sobre las tasas reproductivas en ovinos Corriedale. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16 (2), 103-113.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Martin, G. B., Cajarville, C., Repetto, J., Meikle, A., 2005. Short – term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*. 129, 299-309.
- Wamsley, N.E., Burns, P.D., Engle, T.E., Enns, R.M., 2005. Fish meal supplementation alters uterine prostaglandin F2 (alpha) synthesis in beef heifers with low luteal-phase progesterone. *J. Anim. Sci.* 83, 1832-1838.
- Wathes, D.C., Abayasekara, D.R.E., Aitken, R.J., 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77, 190-201.
- Zachut, M., Arieli, A., Lehrer, H., Argov, N., Moallem, U., 2008. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction*. 135, 683-692.

8 CAPITULO II. RESPUESTA OVULATORIA, DESARROLLO EMBRIONARIO Y TASA DE GESTACIÓN EN OVEJAS ADICIONADAS CON HARINA Y ACEITE DE PESCADO

8.1 Resumen

El objetivo del experimento fue evaluar el efecto de harina y aceite de pescado como fuente de AGP Ω -3 en la respuesta ovulatoria, desarrollo embrionario y tasa de gestación posterior a la transferencia; además del perfil hormonal de progesterona (P_4) e insulina (INS). Cincuenta y cuatro ovejas se distribuyeron de forma aleatoria en dos tratamientos: El primer grupo (HAP) formado por ovejas donadoras ($n=7$) y receptoras ($n=20$) alimentadas con una dieta adicionada con harina y aceite de pescado (4 y 5 % de MS), el segundo grupo (TES): formado por ovejas donadoras ($n=7$) y receptoras ($n=20$) alimentadas con una dieta testigo. Todas las ovejas fueron pre-sincronizadas con dos dosis de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ (65 mg cloprostenol) a intervalos de 8 d. Las ovejas donadoras fueron sincronizadas con esponjas intravaginales de cronolone (20 mg) durante 11 d, y superovuladas con dosis decrecientes de FSHp (180 mg). Las ovejas receptoras fueron sincronizadas con esponjas de cronolone durante 10 d, además de 200 UI de eCG al momento del retiro de la esponja. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la respuesta ovulatoria respecto al número de cuerpos lúteos y estructuras recuperadas entre los tratamientos HAP y TES (14.8 ± 3.2 , 8.5 ± 1.3 vs 17.5 ± 3.4 , 12.2 ± 3.2 , respectivamente). No se encontró efecto ($P > 0.05$) de la harina y aceite de pescado en la dieta en el desarrollo embrionario relacionado con número de mórulas tempranas, compactas y maduras (HAP, 0.14 ± 3.2 , 3.0 ± 0.6 , 0 ± 0 vs TES, 0 ± 0 , 4.5 ± 2.0 , 0.2 ± 0.1 , respectivamente), ni en los blastocitos tempranos, maduros y expandidos (HAP, 2.14 ± 0.5 , 2.14 ± 0.2 , 0.85 ± 0.5 vs TES, 2.5 ± 1.4 , 3.8 ± 1.4 , 1.0 ± 0.3 , respectivamente), sin embargo, se encontró una mayor tasa de gestación en el grupo HAP comparada con el grupo TES (53.6 vs 31.5 %). En ovejas donadoras y receptoras no se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$) por efecto de la adición de la harina y

aceite de pescado en las concentraciones promedio de P_4 en suero; sin embargo, en las concentraciones de INS en suero se presentaron diferencias ($P < 0.05$). Se concluye que la adición de harina y aceite de pescado en la dieta no modifica la tasa ovulatoria ni el desarrollo embrionario en sus diferentes estructuras, sin embargo incrementa la tasa de gestación probablemente debido a una disminución en la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ durante el periodo del reconocimiento materno.

Palabras clave: Ovejas, estro, superovulación, embriones.

8.2 Introducción

La adición de grasa en la dieta está relacionada con alteraciones en los procesos reproductivos de rumiantes, particularmente en el desarrollo folicular, tasa ovulatoria y secreción hormonal (Thomas *et al.*, 1997). Investigaciones recientes muestran que el uso de ácidos grasos poliinsaturados (oleico, linoleico, linolénico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico) mejoran la fertilidad de la hembra y el macho en la mayoría de las especies domesticas (bovinos, ovinos, caprinos y cerdos), incrementa el tamaño del folículo ovárico, modifica el metabolismo de hormonas esteroideas (estradiol y progesterona) y la conformación de la membrana celular de embriones y espermatozoides (Bilby *et al.*, 2006; Wathes *et al.*, 2007).

Mattos *et al.* (2000) indican que las grasas pueden influir positivamente en la reproducción por alteraciones en la síntesis de hormonas esteroideas y prostaglandinas. Mencionan que los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolenico, eicosapentanoico y decosaexanoico) son capaces de inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la disminución de su precursor (el ácido araquidónico) a través de acciones enzimáticas, por lo que sugieren debe existir una alimentación estratégica vigilando el perfil de ácidos grasos en la dieta, de tal forma que se pueda disminuir la

síntesis de prostaglandinas durante los primeros días de gestación y de esta manera reducir la mortalidad embrionaria.

En un estudio realizado por Herrera-Camacho *et al.* (2008) evaluaron el efecto de ácidos grasos poliinsaturados (palmítico, oleico y linoleico) de aceite de maíz (AM; 4 % de la dieta) en ovejas superovuladas comparada con una dieta testigo (SM; *Cynodon nlemfluensis* más concentrado comercial), encontrando un mayor número de cuerpos lúteos, células colectadas totales y embriones en ovejas con AM (14.73 ± 1.78 ; 9.18 ± 2.16 ; 6.72 ± 1.78) respecto al grupo de ovejas SM (10.73 ± 1.42 ; 4.18 ± 1.36 ; 3.09 ± 1.36); además de un incremento en el número de embriones en estado de mórula en el grupo de ovejas con AM (5.90 ± 1.59) comparada con el grupo de ovejas SM (2.18 ± 1.30).

Por su parte Zachut *et al.* (2008) muestran que existe un incremento en el diámetro folículos (15.4 ± 0.1 mm) en vacas adicionadas con grasa protegida con mayor contenido de ácidos grasos insaturados (HUFA, 33.6 y 3.5 % de oleico y linoleico en 215 g d^{-1} Megalac) comparada con el grupo de vacas adicionadas con grasa protegida con un menor contenido de este tipo de ácidos grasos (LUFA, 10.5 ± 0.1 mm diámetro de folículo; 8.4 y 0.1 % de oleico y linoleico en 230 g d^{-1}), así mismo reportan un incremento en las concentraciones de andostrenediona y estradiol en los folículos de las vacas alimentadas con HUFA (416.7 ± 70.6 y $3523.6 \pm 539 \text{ ng mL}^{-1}$) comparada con el grupo de vacas LUFA (36 ± 70.6 y $867.6 \pm 539 \text{ ng mL}^{-1}$).

Con base a estas investigaciones, existen evidencias que indican que el uso de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta pueden modificar positivamente la respuesta reproductiva en rumiantes, por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de harina y aceite de pescado como fuente de AGP Ω -3 en la respuesta ovulatoria, desarrollo embrionario y

tasa de gestación posterior a la transferencia; además del perfil hormonal de progesterona (P₄) e insulina (INS) en ovejas.

8.3 Materiales y métodos

El estudio se realizó en la unidad ovina de la granja experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, de acuerdo a las normas de ética y bioseguridad (CIOMS, 1986) y leyes mexicanas (NOM-062-ZOO-1999) para el uso de animales experimentales (DOF, 2001).

Animales y tratamientos

Se utilizaron 54 ovejas de las razas Dorset, con un peso promedio de 54 ± 4.2 kg y una condición corporal de 3 en escala de 1 a 5 (Cottle, 1991), las cuales fueron previamente desparasitadas y vitaminadas, además de una ecografía transvaginal para determinar que no se encontraban gestantes.

Las ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos para la asignación de los tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron dos dietas isoenergéticas e isoproteicas, la primera una dieta experimental (HAP, n=27) adicionada con harina y aceite de pescado (4 y 0.8 % respectivamente, con base en materia seca) y la segunda una dieta testigo (TES, n=27) sin la adición de estos ingredientes (Cuadro 4). Ambas dietas se formularon para cubrir los requerimientos de proteína cruda (14 %) y energía metabolizable (2.6 Mcal kg⁻¹) recomendado por el National Research Council de ovinos (NRC, 2007).

Se seleccionaron 14 ovejas de ambos grupos para donadoras de embriones (HAP, n=7; TES, n=7), las cuales anteriormente presentaron fertilidad probada y habilidad materna (multíparas),

además de 40 ovejas como receptoras (HAP, n=20; TES, n=20) para evaluar la viabilidad de los embriones en fresco mediante la transferencia.

La alimentación con las dietas experimentales en las ovejas se realizó de manera individual, alojando a las ovejas en jaulas de 1.2 x 2.0 m (2.4 m²), ofreciendo por animal 0.8 kg d⁻¹ de alimento, posteriormente a la alimentación fueron liberadas en corrales con sombra en donde recibieron heno de avena y agua a libre acceso.

El periodo de alimentación en las ovejas con las dietas experimentales fue de 45 días, iniciando un mes antes de la sincronización del estro y terminando el día del diagnóstico de gestación.

Sincronización del estro

El tratamiento hormonal para la sincronización del estro en todas las ovejas inició con una pre-sincronización de prostaglandinas F2 α (65 mg de cloprostenol, Celosil®, Schering-Plough) aplicando dos inyecciones en intervalos de ocho días, para que al momento de insertar la esponja todas las ovejas presentaran la misma fase del ciclo estral.

Las ovejas donadoras se sincronizaron utilizando esponjas intravaginales impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA; Chronogest® Intervet), durante 11 días, recibiendo además 180 mg de hormona folículo estimulante (FSHp; Folltropin® Tornel) por vía i.m. en dosis decrecientes, cada 12 horas (a partir del día 9 de colocada la esponja), durante cuatro días (40, 30; 30, 20; 20, 20; 10, 10 mg). Al momento de la presentación del estro todas estas ovejas recibieron monta natural con machos seleccionados y previamente probados.

Las ovejas receptoras, por su parte, también se sincronizaron con esponjas intravaginales (20 mg FGA, Chronogest® Intervet), iniciando el mismo día y hora que el grupo de las ovejas

donadoras, solamente que en este grupo las esponjas permanecieron por 10 días y al momento del retiro de la esponja todas las ovejas recibieron una inyección intramuscular de 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligon®, Intervet). La detección del estro se inició 24 h después del retiro de la esponja con ayuda de machos enteros con mandil; posteriormente se monitoreó el comportamiento del estro cada 6 h, durante 48 h, para determinar el inicio y término del mismo.

Conteo de cuerpos lúteos, recolección y transferencia de embriones

El conteo de cuerpos lúteos y la recolección de embriones se realizaron el día seis posterior al estro por laparotomía medio ventral. Para ello las ovejas donadoras se sometieron a anestesia general: la tranquilización se realizó con una inyección intramuscular de hidrocloreuro de xilacina al 2% (Rompun®, Bayer) en una dosis de 0.1 mL 10 kg⁻¹ de peso vivo, y como anestésico se aplicó clorhidrato de ketamina (Anesket®, PISA) por vía endovenosa, en una dosis de 1 mg kg⁻¹ de peso vivo. Se rasuró, lavó y desinfectó la región abdominal para posteriormente realizar una incisión de aproximadamente 5 cm de largo y 3 cm anterior a la ubre sobre la línea media. Se exteriorizaron los ovarios para evaluar la respuesta a la superovulación y una vez realizado el conteo de cuerpos lúteos se introdujo a la cavidad para posteriormente exteriorizar el útero.

Se lavó cada cuerno uterino utilizando una sonda de Foley (calibre 10G), que se introdujo aproximadamente a 1 cm de la unión uterotubárica mediante una punción realizada con un catéter endovenoso (14Gx5½) para recuperar el medio de lavado. Posteriormente, a través de otro catéter endovenoso (18Gx¼) insertado en la punta del cuerno uterino, se administró 60 mL de solución Dulbecco modificada a la que se le agregó 0.4 % de albúmina sérica bovina y penicilina G sódica (100 UI/mL). El medio se colectó en un filtro concentrador; concluida la

recolección de embriones, se colocaron puntos de sutura en las incisiones hechas al útero, éste se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la incisión realizada plano por plano.

Para la transferencia de embriones, las hembras se tranquilizaron con xilacina al 2%. Posteriormente se realizaron dos incisiones en pared abdominal aproximadamente de 1 cm de longitud, y a 4 cm de la línea media y 3 cm anteriores a la ubre. Por una de estas incisiones se insertó un trocar con cánula por donde se introdujo el filamento óptico. Antes de insertar el trocar se insufló la cavidad con aire a través de una aguja de Verres. Se localizó el ovario con el cuerpo lúteo más desarrollado, y por la segunda cánula se introdujeron unas pinzas de Babcock con las que se sujetó y exteriorizó el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. En el cuerno uterino seleccionado se realizó una pequeña punción con un catéter endovenoso (18Gx¼) y se transfirieron dos embriones de excelente o buena calidad (esféricos, simétricos y con células de color, tamaño y textura uniformes, con zona pelúcida íntegra) por medio de un catéter (Tom Cat, USA); provenientes de la hembra donadora, finalmente se regresó el cuerno a la cavidad abdominal y se suturaron las incisiones.

El diagnóstico de gestación se confirmó a los 30 días posteriores a la transferencia utilizando un equipo de ultrasonido Sonovet 600 con un transductor de 7,5 MHz, por vía transrectal (Medison, Inc., Cypress, California, EUA).

Toma de muestras y análisis hormonal

Las muestras de sangre (5 mL) fueron colectadas mediante punción de la vena yugular para todas las ovejas de los grupos experimentales. Para determinar la concentración de P₄ en suero, las muestras se colectaron dos días antes de insertar las esponjas, y posteriormente cada 48 h durante

el ciclo estral sincronizado (12 días). Las muestras de INS se colectaron cada 48 h durante 35 días, periodo correspondiente a la alimentación con las dietas experimentales.

Todas las muestras se centrifugaron durante 20 min a 1500 g en una centrífuga (IEC Centra 8R, International Equipment Company, EUA); el suero sanguíneo fue separado y almacenado en tubos de polipropileno para su conservación a -20 °C en un congelador (Tappan EUR251P7W, Electrolux Home Products North America, EUA) hasta realizar el análisis hormonal.

Los análisis de P₄ se realizaron mediante ensayo inmunoenzimático (Immunometrics, UK Ltd, 280 Muster Road, London SW6 6BQ). La sensibilidad analítica fue de 0.13 ng mL⁻¹ con coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9.59 y 13.7 %, respectivamente. La determinación de las concentraciones de INS se realizó por RIA con una sensibilidad de 4.09 ng mL⁻¹ y coeficientes de variación intra e inter ensayo de 1.44 y 0.25 %, respectivamente. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Biología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, en donde cada oveja representó una unidad experimental. El porcentaje de presentación de estros y gestación fueron analizadas a través de la prueba de X² por medio del PROC FREQ. Para el inicio del estro se realizó un análisis de varianza por medio del PROC GLM y la prueba de comparación de medias de Tukey. Para la concentración de P₄ e INS en suero sanguíneo se realizó un análisis de varianza de mediciones repetidas a través del tiempo por medio del procedimiento PROC MIXED, el cual incluyó efectos fijos del tratamiento y día, e interacción de ambos. Para este procedimiento, la estructura de covarianza fue modelada usando el efecto de la oveja dentro del grupo, determinándose para

la presente variable usar la estructura autoregresiva de primer orden (AR 1) para determinar la correlación entre las mediciones secuenciales dentro del mismo animal (Littell *et al.*, 1998). Para determinar si existieron diferencias en el número de cuerpos lúteos por oveja por tratamiento, y número de embriones recolectados, se realizó la prueba de U-Mann-Withney. Valores medios fueron comparados por el método de medias de mínimos cuadrados. Todos los procedimientos fueron realizados por el paquete del sistema de análisis estadístico (SAS, 2009).

8.4 Resultados

Presentación e inicio del estro

La presentación del estro en respuesta a la sincronización con esponjas de FGA, posterior al tratamiento con prostaglandinas F2 α no mostraron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos, reportando el 100 % para ambos grupos experimentales (TES, n=27; HAP, n=27). Así mismo, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en el inicio del estro entre los tratamientos (TES: 36.1 ± 2.1 ; HAP: 38.2 ± 1.3 h, respectivamente).

Respuesta ovulatoria

No se encontró efecto ($P > 0.05$) de la harina y aceite de pescado en la dieta en la respuesta ovulatoria entre las ovejas donadoras de ambos tratamientos, en relación al número de mórulas tempranas, compactas y maduras (HAP, 0.14 ± 3.2 , 3.0 ± 0.6 , 0 ± 0 vs TES, 0 ± 0 , 4.5 ± 2.0 , 0.2 ± 0.1 , respectivamente), ni en los blastocitos tempranos, maduros y expandidos (HAP, 2.14 ± 0.5 , 2.14 ± 0.2 , 0.85 ± 0.5 vs TES, 2.5 ± 1.4 , 3.8 ± 1.4 , 1.0 ± 0.3 , respectivamente), sin embargo, los resultados obtenidos son excelentes en comparación a otros trabajos realizados bajo condiciones similares.

Perfil hormonal

Progesterona (P₄)

En las ovejas donadoras no se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$) por efecto de la adición de la harina y aceite de pescado en las concentraciones promedio de P₄ en suero (HAP: 5.4 ± 0.75 ; TES: 3.8 ± 1.8 ng mL⁻¹), no obstante, la concentración de P₄ fue diferente ($P < 0.05$) el d 6 de la fase lútea sincronizada (HAP: 11.4 ± 1.8 ; TES: 4.1 ± 1.8 ng mL⁻¹), antes del retiro de la esponja y en el d 4 y 6 posterior a la ovulación (HAP: 17.6 ± 1.6 , 17.9 ± 1.8 ; TES: 13.9 ± 1.7 , 14.4 ± 1.5 ng mL⁻¹, Fig. 5).

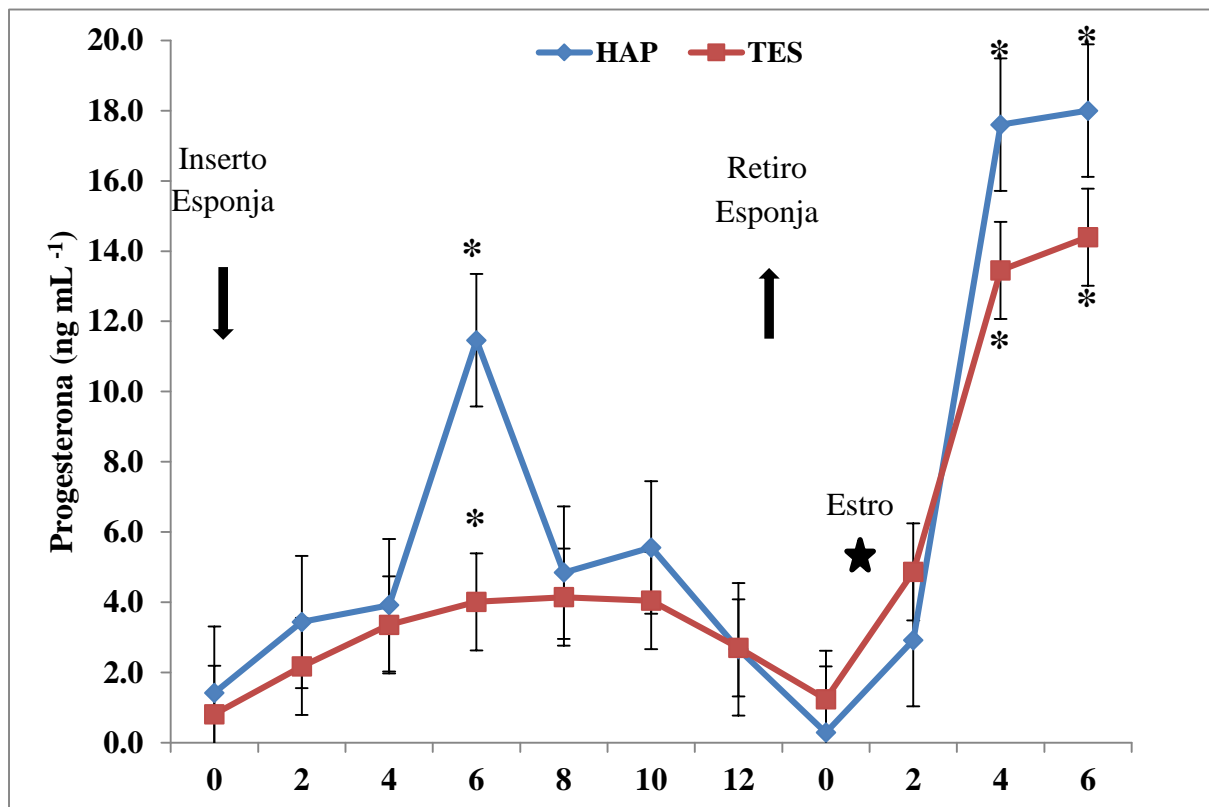


Fig. 5. Concentración promedio de progesterona en las ovejas donadoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación. HAP: Grupo adicionado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo Testigo. * Indica diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo.

En las ovejas receptoras no se encontraron diferencias entre tratamientos ($P = 0.07$) por efecto de la adición de harina y aceite de pescado en las concentraciones promedio de P_4 en suero (HAP: 3.0 ± 0.21 ; TES: 2.5 ± 0.20 ng mL⁻¹) sin embargo, las concentraciones de P_4 se vieron influenciadas ($P < 0.05$) por la interacción de dieta X tiempo los d 6, 8 y 10 de la fase lútea sincronizada (HAP 5.3 ± 0.35 , 5.1 ± 0.32 , 5.0 ± 0.32 ; TES: 3.7 ± 0.25 , 4.0 ± 0.35 , 3.2 ± 0.28 ng mL⁻¹), respectivamente; y el d 6 posterior a la ovulación (HAP: 4.5 ± 2.1 ; TES: 3.2 ± 1.7 ng mL⁻¹), Fig. 6).

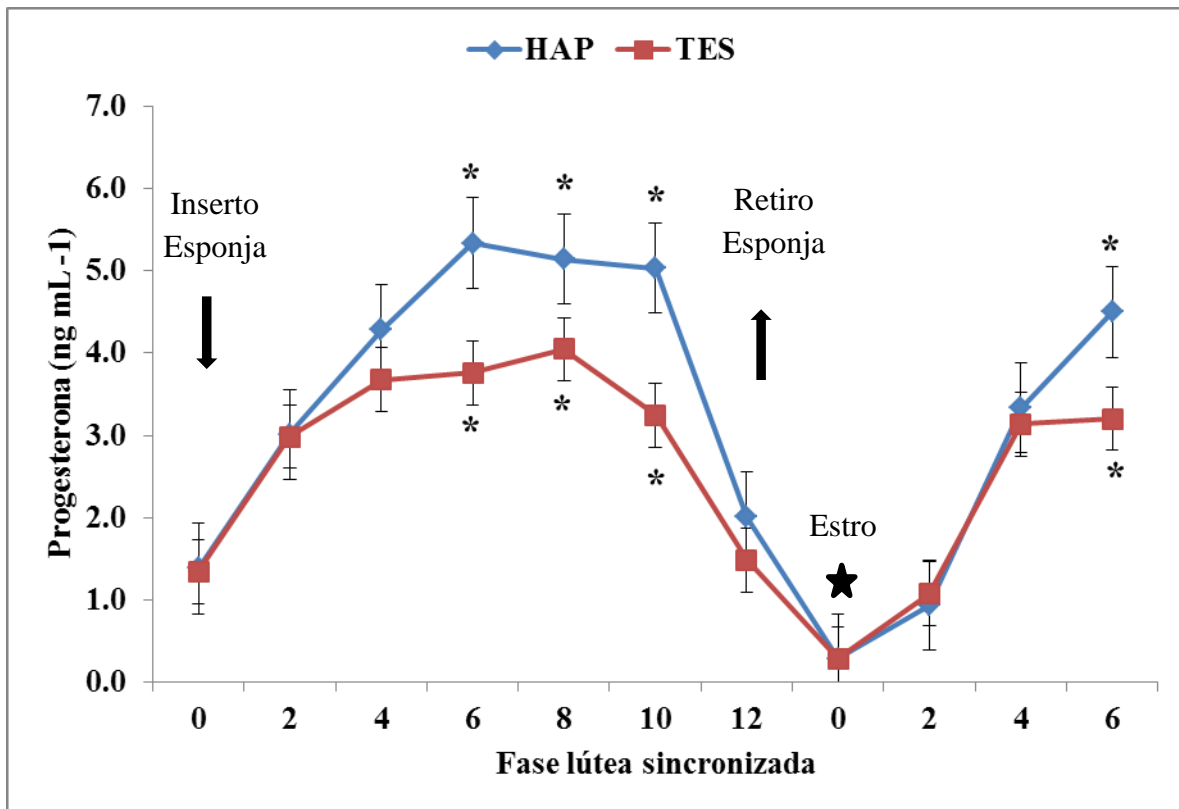


Fig. 6. Concentración promedio de progesterona en las ovejas receptoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación. HAP: Grupo adicionado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo Testigo. * Indica diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo.

Insulina (INS)

Los resultados en las concentraciones promedio de INS en suero presentaron diferencias ($P < 0.05$) tanto en ambos tratamientos (HAP y TES) como en ambos grupos experimentales de ovejas donadoras y receptoras. El grupo de ovejas donadoras adicionadas con harina y aceite de pescado presento una concentración menor (HAP: $0.20 \pm 0.02 \text{ ng mL}^{-1}$) respecto al grupo TES ($0.29 \pm 0.02 \text{ ng mL}^{-1}$, Fig. 7); sin embargo, en los grupos de ovejas receptoras se presentó todo lo contrario, con una mayor concentración el grupo HAP ($0.30 \pm 0.01 \text{ ng mL}^{-1}$) en relación al TES ($0.23 \pm 0.02 \text{ ng mL}^{-1}$, Fig. 8).

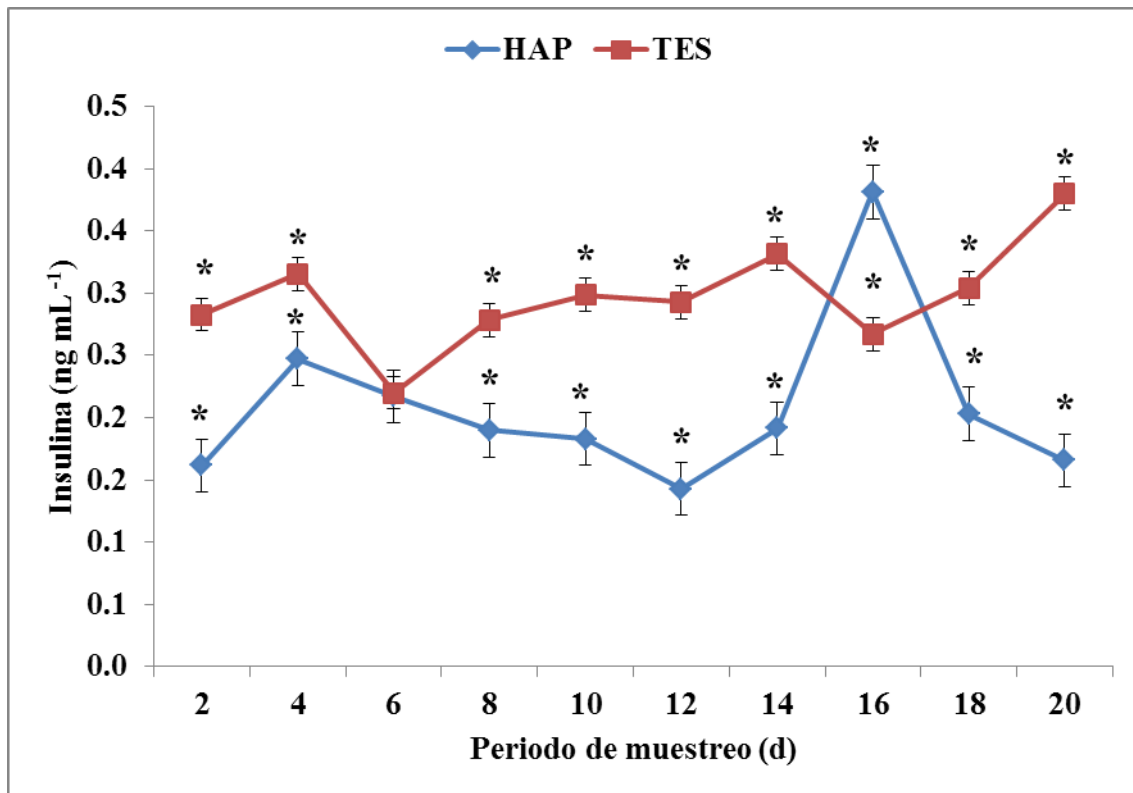


Fig. 7. Concentración promedio de insulina en las ovejas donadoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación. HAP: Grupo adicionado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo Testigo. * Indica diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo.

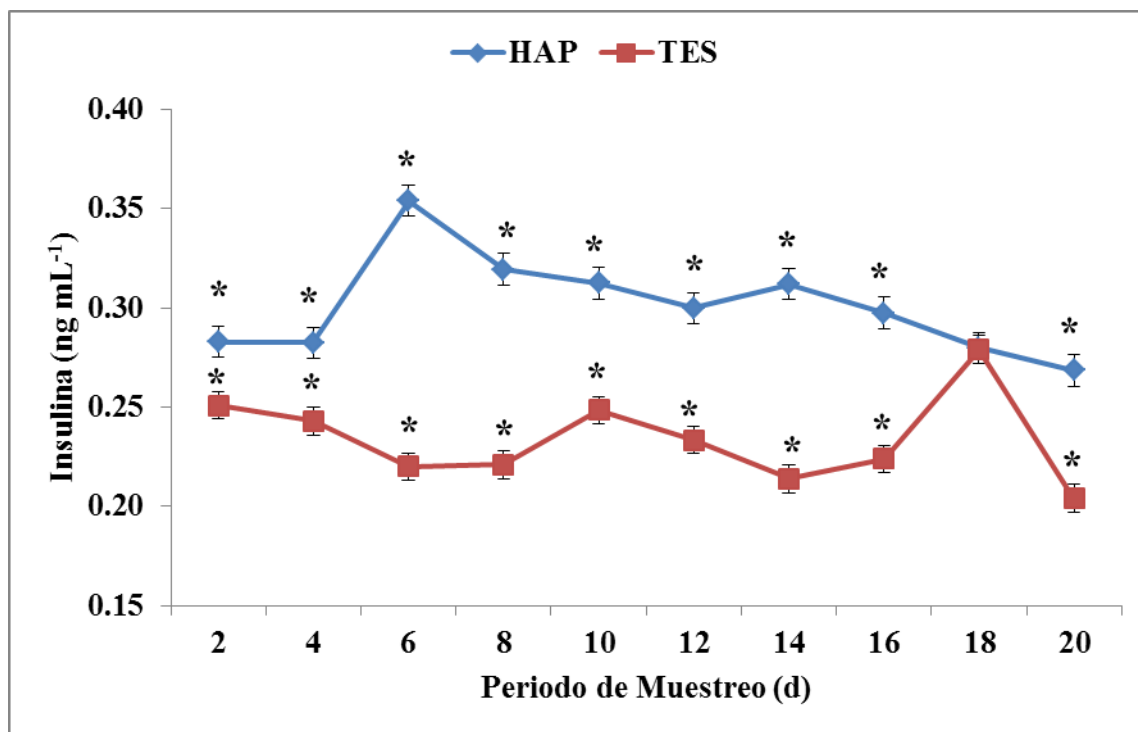


Fig. 8. Concentración promedio de insulina en las ovejas receptoras de los grupos experimentales HAP y TES, durante la fase lútea sincronizada y posterior a la ovulación. HAP: Grupo adicionado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo Testigo. * Indica diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo.

Gestación y prolificidad

El porcentaje de ovejas gestantes entre tratamientos fue diferente ($P < 0.05$) presentando el 53.6 % para el grupo HAP y el 31.5 % para el grupo TES, lo que indica un posible efecto por la alimentación basada en harina y aceite de pescado como fuente de omega-3; no obstante, el índice de prolificidad no mostró diferencias entre tratamientos experimentales ($P > 0.05$; HAP: 1.31, TES: 1.25; respectivamente).

8.5 Discusión

En la presente investigación no se encontró efecto de la harina y aceite de pescado como fuente de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) Ω -3 sobre la calidad y estructuras embrionarias en las ovejas donadoras. Está determinado que elevados niveles de grasa en la dieta pueden influir sobre el contenido de ácidos grasos en la membrana o en el citoplasma de los ovocitos, reportes indican que cambios en la concentración de ácidos grasos en el fluido folicular durante el verano pueden influir sobre la fertilidad en vacas (Bilby *et al.*, 2006); e incrementos en los niveles de AGP durante el invierno pueden influir sobre los ovocitos de ovejas a la resistencia del enfriamiento (Zeron *et al.*, 2002).

En vacas la suplementación con AGP (Ω 3 y 6) induce cambios en severos aspectos de folículoogénesis, incluyendo el número total de folículos y el tamaño del folículo dominante o pre-ovulatorio (Ambrose *et al.*, 2006); en ovejas la suplementación con AGP en grasas protegidas incrementa el número de folículos y ovocitos en ovarios, mejorando el número de ovocitos de alta calidad, con mayor cantidad de AGP en plasma y células del cumulus (Zeron *et al.*, 2002). Zachut *et al.* (2008), mencionan que la inclusión de AGP en la alimentación de vacas incrementa el tamaño y el contenido de hormonas esteroideas en folículos pre-ovulatorios; Sturmey *et al.* (2009), concluyen que existe evidencia de que los ovocitos y embriones utilizan los lípidos endógenos como substratos de energía; en este contexto, Fouladi-Nashta *et al.* (2007), mencionan que el uso de AGP puede beneficiar al ovocito no solo en crecimiento y desarrollo durante su maduración, sino también para el embrión y el periodo de pre-implantación.

Por otra parte, Herrera-Camacho *et al.* (2008), evaluaron la tasa ovulatoria y el desarrollo embrionario de ovejas Pelibuey en respuesta al consumo de AGP presentes en el aceite de maíz (AM, 4% de materia seca en la dieta) comparado con un grupo testigo (SM, 0% de aceite),

reportaron que existió un aumento en el número de cuerpos lúteos, células colectadas totales y embriones (14.73 ± 1.87 ; 9.18 ± 2.16 ; 6.72 ± 1.78 , respectivamente) en el grupo AM comparado con el grupo testigo (10.73 ± 1.42 ; 4.18 ± 1.36 ; 3.09 ± 1.36 , respectivamente), conjuntamente con un mayor número de embriones en estado de mórula en el grupo AM (5.90 ± 1.59) respecto al grupo SA (2.18 ± 1.30), aunque la adición de AM no mejoró la calidad morfológica embrionaria (excelente, buena, regular y mala), reafirman que efectivamente los AGP desarrollan un efecto en la respuesta ovulatoria en términos de número de cuerpos lúteos y embriones en estado de mórula, no obstante, mencionan que es necesario realizar nuevas investigaciones para implementar a los AGP en la dieta como una alternativa en mejoras de la prolificidad de los ovinos.

Como otra alternativa para mejorar la fertilidad, los AGP han sido utilizados con la finalidad de modificar los componentes de la membrana plasmática celular, aunque la mayoría de los estudios han sido enfocados en los espermatozoides (Sanocka y Kurpisz, 2004; Whates *et al.*, 2007), se sugiere que su uso en la hembra está relacionado con una mejor fluidez de la membrana, facilitando el intercambio de nutrientes y metabolitos requeridos en el desarrollo del ovocito y del propio embrión (Zeron *et al.*, 2001).

Respecto a las concentraciones de P_4 en suero en las ovejas donadoras no se vieron influenciadas por efecto de la adición de harina y aceite de pescado en la dieta, no obstante, presentaron concentraciones elevadas, por lo que son necesarias investigaciones futuras para determinar posibles cambios o alteraciones en la ciclicidad de la hembra. Por otra parte, las ovejas receptoras, presentaron variaciones en la concentración de P_4 antes del estro y posterior al mismo, lo cual indica un posible desarrollo de cuerpos lúteos de mayor tamaño en el grupo de ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado.

En este contexto, Childs *et al.* (2008) evaluaron el efecto de los AGP n-3 presente en el aceite de pescado (FO) en algunas variables reproductivas en vacas, utilizaron cuatro niveles de FO parcialmente protegido: 0 g o grupo testigo (CON); 65 g grupo bajo (LOW; 39 g EPA, 26 g DHA); 140 g o grupo medio (MED; 84 g EPA, 56 g DHA); 275 g o alto (HIGH; 165 g EPA, 110 g DHA); en general no encontraron diferencias por efecto de las dietas en las concentraciones de P₄ y estradiol; sin embargo, el tamaño del cuerpo lúteo (CL) si fue diferente conforme incrementaba el nivel de FO en la dieta (CON 17.5 ± 1.17; LOW 19.8 ± 1.17; MED 25.7 ± 1.17; HIGH 24.1 ± 1.05) en el día 7 posterior del estro sincronizado.

En las concentraciones de INS se encontraron diferencias entre tratamientos (HAP y TES), presentándose una mayor concentración para el grupo TES (0.29 ± 0.02 ng mL⁻¹) en las ovejas donadoras, sin embargo, en las ovejas receptoras el grupo con mayor concentración fue el grupo HAP (0.30 ± 0.01 ng mL⁻¹). La relación entre INS y la actividad reproductiva en rumiantes es compleja y varía acorde a la etapa de su ciclo reproductivo, sexo, consumo y balance de energía, además del estado fisiológico del animal (Becu-Villalobos *et al.*, 2007; Garnsworthy *et al.*, 2009); no obstante, en ésta investigación las ovejas tanto donadoras como receptoras adicionadas con harina y aceite de pescado presentaron resultados contradictorios, posiblemente esta variación en las concentraciones de INS se deban a los tratamientos hormonales y la disponibilidad de energía, aunque esto no está determinado y requiere investigaciones futuras.

Por otra parte, se ha reportado que la suplementación con grasa protegida (Megalac[®]) en ovejas Pelibuey y vacas Holstein disminuye las concentraciones de INS en suero (Espinoza *et al.*, 1997; Garnsworthy *et al.*, 2008), esto podría deberse al bajo consumo de materia seca ocasionado por el efecto negativo de las grasas en la fermentación ruminal, por lo tanto, se sugiere que el bajo consumo de carbohidratos estructurales ocasiona la disminución del

porcentaje molar de propionato, un potente liberador de INS en rumiantes, lo cual posiblemente explica el decremento de INS en suero, posterior al consumo de las grasas (Choi *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000).

Referente a la prolificidad no existió diferencias entre tratamientos, sin embargo, el porcentaje de gestación fue mayor en el grupo de ovejas adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP). En diversas investigaciones se ha observado que los AGP Ω -3 pueden disminuir la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, esto a través de la disponibilidad de su precursor el AA o en cierta forma por la competencia enzimática de las enzimas PGHS con ácidos grasos como el EPA y DHA. Por ejemplo, en un estudio realizado por Mattos *et al.* (2002) en donde alimentaron a vacas lecheras durante 34 d con diferentes niveles de harina de pescado (FM) en la dieta (0, 2.6, 5.2 y 7.8 % FM) enriquecida con AGP EPA y DHA, antes de la sincronización del estro (con inyecciones de 100 μg GnRH y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los días 7 y 8 con 25 y 15 mg respectivamente), observaron que en el día 15 del ciclo estral sincronizado, posterior a las inyecciones vía intravenosa de 17- β estradiol (0.5 mg mL^{-1}) y oxitocina (100 UI), los grupos de vacas alimentadas con FM (2.6, 5.2 y 7.8 % FM) presentaron una disminución considerable en las concentraciones de los metabolitos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (13-14 dihidro-15 keto-prostaglandina, PGFM) comparado con el grupo testigo (0% FM).

Por su parte, Burns *et al.* (2003), alimentaron a vacas Angus con harina de pescado (FM) enriquecida con EPA y DHA (FM, 5.1 % de la dieta) comparado con otro grupo de vacas alimentado con harina de gluten de maíz (CGM, 8.5% de la dieta), se observó que el grupo de FM presentaba una mayor concentración de EPA y DHA en plasma respecto al grupo con CGM a los 35 d de alimentación con las dietas, de igual forma, se presentó una mayor cantidad de EPA

en el endometrio para el grupo FM comparado con el grupo CGM, concluyendo que la harina de pescado en la dieta altera la composición de AGP Ω -3 tanto en el plasma como en el endometrio.

En general, el uso de AGP Ω -3 en la dieta se ve reflejado en el plasma y endometrio uterino, este proceso inhibe la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, por lo que puede ayudar a la supervivencia embrionaria y mejorar la fertilidad de la hembra.

8.6 Conclusión

Se concluye que la adición de harina y aceite de pescado en la dieta no modifica la tasa ovulatoria ni el desarrollo embrionario en sus diferentes estructuras, sin embargo incrementa la tasa de gestación probablemente debido a una disminución en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante el periodo del reconocimiento materno. Por otra parte, presenta variaciones en las concentraciones de P_4 e INS por lo que son necesarias investigaciones futuras que determinen los efectos de los AGP en estos procesos reproductivos.

Cuadro 4. Contenido de ingredientes y nutrientes de las dietas experimentales, harina y aceite de pescado (HAP) y testigo (TES), en ovejas superovuladas

Composición	Dieta experimental	
	HAP	TES
Ingredientes	% MS^a	
Maíz entero	33.64	25.09
Sorgo molido	10.13	10.15
Pasta de soya	7.43	13.75
Harina de pescado	4.01	-
Aceite de pescado	0.84	-
Heno de avena	37.40	44.46
Melaza	4.75	4.76
Mezcla mineral ^b	1.80	1.79
Análisis determinado		
Proteína cruda (%)	14.20	14.45
Energía bruta (Mcal kg ⁻¹)	2.64	2.61
Calcio (%)	0.45	0.42
Fosforo (%)	0.36	0.31

^a MS: Materia seca. ^b Mezcla mineral: Fosforo 10%, Calcio 12%, Hierro 0.5%, Magnesio 0.1%, Cobre 0.15%, Zinc 0.12%, Manganeso 0.055%, Cobalto 0.05%, Yodo 0.02%, Selenio 200 ppb, Vitamina A 50000 UI.

Cuadro 5. Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas experimentales adicionadas con harina y aceite de pescado (HAP) y grupo testigo (TES), en ovejas superovuladas

Esteres metílicos de ácidos grasos (%)	Dieta experimental	
	HAP	TES
Palmítico	9.18	14.23
Palmitoleico	0.41	1.13
Heptadecanoico	N.D.	2.86
Estearico	3.15	4.29
Oleico	25.60	28.05
Linoleico	52.20	40.12
α -Linolénico	4.28	2.64
Araquídico	0.65	0.46
Eicosenoico	0.28	1.23
Eicosapentanoico	0.89	0.30
Erúcico	1.16	1.09
Lignocérico	0.14	0.16
Otros	2.15	2.85
Saturados	13.12	22.63
Monoinsaturados	27.45	31.50
Poliinsaturados	59.52	45.91

N. D: No detectable

Cuadro 6. Respuesta de las variables reproductivas y características embrionarias en ovejas suplementadas con harina y aceite de pescado

Variables reproductivas	Tratamientos	
	TES (n=27)	HAP (n=27)
Respuesta del estro (%)	100	100
Inicio del estro (h) ^{†1}	36.1 ± 2.1	38 ± 1.3
Gestante (%) ²	31.5 ^b	53.6 ^a
Índice de prolificidad ³	1.25	1.31
Estructuras recuperadas [†]	11.2 ± 8.5	8.5 ± 3.5
Cuerpos lúteos [†]	17.5 ± 9.1	14.8 ± 8.6
Ovoocito [†]	0.71 ± 0.9	0
Mórula temprana [†]	0 ± 0	0.14 ± 0.3
Mórula compacta [†]	4.57 ± 5.5	3.0 ± 1.8
Mórula madura [†]	0.28 ± 0.4	0 ± 0
Blastocito temprano [†]	2.57 ± 3.9	2.14 ± 1.5
Blastocito maduro [†]	3.85 ± 3.8	2.14 ± 2.3
Blastocito expandido [†]	1.0 ± 0.3	0.85 ± 1.4

HAP: Grupo suplementado con harina y aceite de pescado. TES: Grupo testigo.

¹ Tiempo referido al retiro de la esponja de FGA. ² Basado en los perfiles de P₄ en suero y ultrasonografía en el día 30. ³ Número de corderos nacidos por oveja parida. ^{a, b} Valores con distinta literal entre columnas son diferentes (P < 0,05). [†] Medias ± error estándar.

8.7 Literatura citada

- Ambrose D.J, Kastelic J.P, Corbertt R, Pitney P.A, Petit H.V, Small J.A, Zalkovic P. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J Dairy Sci.*89:3066-3074.
- AOAC., 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington (VA): Association of Official Analytical Chemist. p: 1298.
- AOAC., 2000. Official methods of analysis. 17th ed. Arlington, D.C: Association of Official Analytical Chemist. p: 556.
- Becú-Villalobos, D.; García-Tornadú, I.; Shroeder, G.; Salado, E.E; Gagliostro, G.; Delavaud, C.; Chilliard, Y.; Lacau-Mengido, I.M. 2007. Effect of fat supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 71: 218–225.
- Bilby, T.R., J. Block, B.C. do Amaral, O.S. Filho, F.T. Silvestre, P.J. Hansen, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *J. Dairy. Sci.* 89: 3891-3903.
- Burns, P.D., T.E. Engle, M.A. Harris, R.M. Enns, and J.C. Whittier. 2003. Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in nonlactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 81: 2840-2846.
- Childs, S., A.A. Hennessy, J. M. Sreenan, D.C. Wathes, Z. Cheng, C. Stanton, M.G. Diskin, and D.A. Kenny. 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology.* 70: 595-611.
- Choi, B.R. Palmquist, D.L. 1996. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic peptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *J. Nutr.* 126: 2913–2919.
- Choi, B.R., Palmquist, D.L., Allen, M.S. 2000. Cholecystokinin mediates depression of feed intake in dairy cattle fed high fat diets. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19: 159–175.

- CIOMS (Council for international Organizations of Medical Sciences)., 1986. “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”. CIOMS, Geneva, Switzerland.
- DOF (Diario Oficial de la Federación)., 2001. “Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. México, D.F.
- Espinoza, J.L., Ramírez–Godínez, J.A., Simental, S.S., Jiménez, J., Ramirez, R., Palacios, A., De Lun, R. 1997. Effects of calcium soaps of fatty acids on serum hormones and lipid metabolites in Pelibuey ewes. *Small Rum. Res.* 26: 61–68.
- Fouladi-Nashta A.A, Gutierrez C.G, Gong J.G, Garnsworthy P.C, Webb R. 2007. Impact of dietary fatty acids quality and development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction.* 77: 9-17.
- Garnsworthy, P.C., Fouladi-Nashta, A.A.; Mann, G.E.; Sinclair, K.D.; Webb, R. 2009. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentration during the early postpartum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reprod.* 137: 759-768.
- Garnsworthy, P.C., Lock, A.; Mann, G.E.; Sinclair, K.D.; Webb, R. 2008. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 2. Dietary fatty acids and ovarian function. *J. Dairy. Sci.* 91: 3824-3833.
- Herrera-Camacho, J., J.R. Aké-López., J.C. Ku-Vera., G.L. Williams., y J.A. Quintal-Franco. 2008. Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. *Téc. Pec. Méx.* 46(2): 107-117.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216-1231.
- Mattos, R., C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5: 38-45.

- Mattos, R., C.R. Staples., J. Williams., A. Amorocho., M.A. McGuire, and W.W. Thatcher. 2002. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J. Dairy. Sci.* 85: 755-764.
- National Research Council (NRC). 2007. Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press, Washington D.C.
- Sanocka, D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinology.* 2 (12): 1-7.
- Statistical Analysis System Institute (SAS). 2009. SAS User's Guide: Statistics (Version 5). Cary, N.C. U.S.A. Inst. Inc. 584 pp.
- Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. 2009. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Dom Anim.* 44: 50-58.
- Thomas, M.G., B. Bao, and G.L. Williams. 1997. Dietary fats in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. *J. Anim. Sci.* 75: 2512-2519.
- Wathes, D.C., D.R.E. Abayasekera, and R.J. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Bio. Reprod.* 77: 190-201.
- Zachut, M., A. Arieli., H. Lehrer., N. Argov, and U. Moallem. 2008. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction.* 135: 683-692.
- Zeron Y., Sklan D., Arav A. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev.* 61:271-278.

9 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

9.1 Conclusiones

Bajo las condiciones en las que se realizó la presente investigación se concluye que:

- ❖ La adición de HAP como fuente de AGP Ω -3 en la dieta durante un periodo corto en ovejas primaras inseminadas por laparoscopia no modificó las variables reproductivas presentación del estro y tasa de gestación, no obstante, si influyó sobre el inicio del estro y la prolificidad.
- ❖ La adición de harina y aceite de pescado en la dieta durante un periodo prolongado no modifica la tasa ovulatoria ni el desarrollo embrionario en sus diferentes estructuras, sin embargo incrementa la tasa de gestación probablemente debido a una disminución en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante el periodo del reconocimiento materno.
- ❖ Por otra parte, las concentraciones de P_4 e INS presentaron pequeñas variaciones por efecto de los AGP, aunque estas no fueron concluyentes, se requieren más investigaciones para determinar sus efectos en los procesos reproductivos de la oveja.

9.2 Recomendaciones

La adición de harina y aceite de pescado en la dieta como fuente de $\Omega - 3$ puede ser utilizada como una alternativa en la alimentación de ovejas reproductoras, no obstante, durante un periodo corto es necesario tomar en cuenta que solo tendremos un efecto sobre el estado metabólico del animal y esto puede causar variaciones en algunas variables reproductivas; sin embargo, durante un periodo prolongado podemos tener un efecto a nivel celular, lo que nos modificaría la secreción de hormonas como la P_4 y las $PGF_{2\alpha}$ lo que favorece el reconocimiento materno y reduce la mortalidad embrionaria.

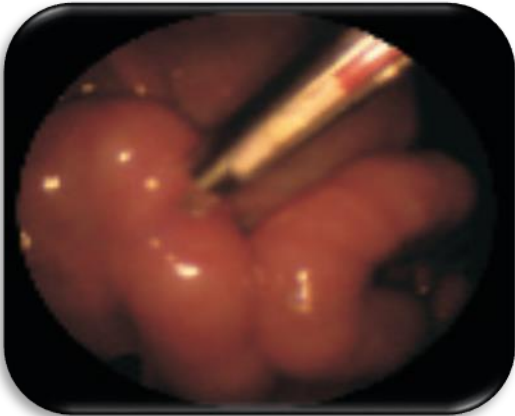
Por otra parte, es necesario tener en cuenta la proporción de AGP en relación a los $\Omega - 3$ y 6, debido a que la concentración de uno u otro grupo puede causar variabilidad en los resultados, por lo tanto, son necesarias investigaciones futuras enfocadas a resolver los efectos que tienen los AGP en los procesos reproductivos, con el objetivo de mejorar la fertilidad de la hembra.

10 ANEXOS

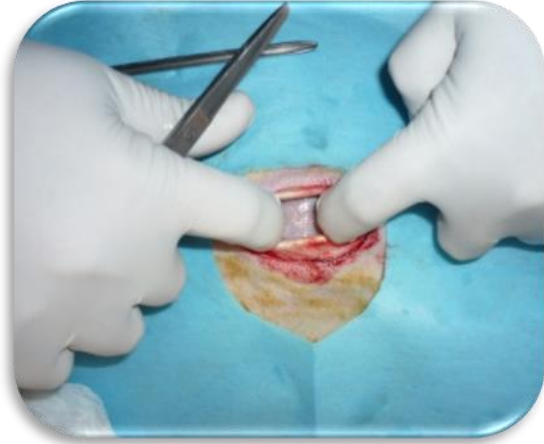
Inserción y retiro de la esponja intravaginal en ovejas para la sincronización del estro

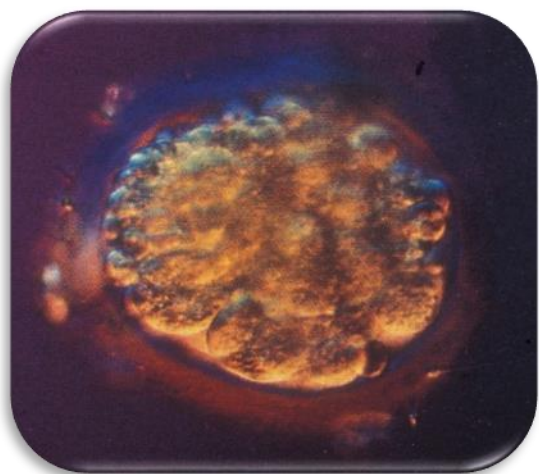


Procedimiento de la Inseminación Artificial por la técnica de Laparoscopia



Conteo de cuerpos lúteos, recolección y evaluación de embriones





Procedimiento para la transferencia de embriones en ovejas receptoras

