



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

## **RESPUESTA OVULATORIA Y EMBRIONARIA CON FSH Y FSH/LH EN COMBINACIÓN DE eCG EN OVEJAS PELIBUEY**

**ALEJANDRO GARCÍA SALAS**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2015**

La presente tesis titulada: **RESPUESTA OVULATORIA Y EMBRIONARIA CON FSH Y FSH/LH EN COMBINACIÓN DE eCG EN OVEJAS PELIBUEY**, realizada por el alumno: **ALEJANDRO GARCÍA SALAS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO



---

Dr. CÉSAR CORTEZ ROMERO

ASESOR



---

Dr. JUAN SALAZAR ORTIZ

ASESOR



---

Dr. JAIME ARROYO LEDEZMA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2015

## RESPUESTA OVULATORIA Y EMBRIONARIA CON FSH Y FSH/LH EN COMBINACIÓN DE eCG EN OVEJAS PELIBUEY

García Salas Alejandro, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la eCG al incluirla en protocolos de ovulación múltiple basados en la aplicación de FSH comercial y una combinación de FSH/LH comercial, para mejorar la respuesta ovulatoria y embrionaria en ovejas Pelibuey. El ensayo se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados campus Córdoba, Veracruz, durante los meses de junio y julio de 2013. Se utilizaron 24 ovejas de la raza Pelibuey, las cuales se sincronizaron al estro con la inserción de un dispositivo intravaginal (CIDR), por 9 días; en el día 7 se les aplicó 250 µg de cloprostenol. Las ovejas se asignaron aleatoriamente a cuatro tratamientos (n = 6): (T1; 200 mg FSH); (T2; 200 mg FSH + 300 UI eCG); (T3; 250 UI FSH/LH) y (T4; 250 UI FSH/LH + 300 UI eCG). Las horas al inicio del estro (HE) posterior al retiro del CIDR fueron menores ( $p < 0.05$ ) en las ovejas tratadas con eCG (T2 =  $8.0000 \pm 1.46$  y T4 =  $10.000 \pm 2.87$ ), que en aquellas donde no se aplicó (T1 =  $12.6667 \pm 0.67$  y T3 =  $20.6667 \pm 2.45$ ). La respuesta ovárica y la producción de embriones se evaluaron en el día 6 después del estro. La tasa ovulatoria (TO) fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos T1 =  $15.50 \pm 2.83$  y T2 =  $15.66 \pm 1.47$ , en comparación de T3 =  $8.16 \pm 3.21$  y T4 =  $11.83 \pm 2.83$ , pero la eCG no marcó diferencia significativa entre ellos (T1 vs. T2 y T3 vs. T4). La cantidad de ovocitos no fertilizados (ONF) fue menor ( $p < 0.05$ ) en T1 =  $0.83 \pm 0.40$  y T3 =  $1.83 \pm 1.83$ , comparados con los que incluyeron eCG (T2 =  $6.33 \pm 2.42$  y T4 =  $2.16 \pm 1.25$ ). La cantidad de embriones transferibles (ET) fue mayor ( $p < 0.05$ ) donde únicamente se aplicó FSH (T1 =  $5.83 \pm 1.13$ ), con respecto a T2 ( $2.66 \pm 1.17$ ), T3 ( $2.33 \pm 1.43$ ) y T4 ( $2.83 \pm 1.50$ ). En conclusión, la eCG no mejoró las variables TO, ONF y ET, aunque resultó con menor tiempo a IE. Sin embargo, el tratamiento exclusivo de FSH presentó una mayor TO, menor cantidad de ONF y mayor número de ET, lo que representa una buena alternativa adecuada para la ovulación múltiple en ovejas Pelibuey.

**PALABRAS CLAVE:** sincronización, gonadotropinas, ovulación múltiple, ovejas Pelibuey.

# OVULATORY AND EMBRYONIC RESPONSE WITH FSH AND FSH/LH IN COMBINATION WITH eCG IN EWES PELIBUEY

García Salas Alejandro, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

The objective of this study was to evaluate the effect of eCG to include it in multiple ovulation protocols based on the application of commercial FSH and a combination of FSH / LH trade to improve ovulation and embryo response in sheep Pelibuey. The test was conducted on the premises of the Graduate College campus Córdoba, Veracruz, during the months of June and July 2013. 24 Pelibuey sheep were used, which were synchronized estrus with insertion of an intravaginal device (CIDR) for 9 days; on day 7 were administered 250 µg of cloprostenol. The sheep were randomly assigned to four treatments (n = 6) assigned: (T1; 200 mg FSH); (T2; 200 mg FSH + 300 IU eCG); (T3; 250 IU FSH / LH) and (T4; 250 IU FSH / LH + 300 IU eCG). The hours to estrus (HE) after the removal of CIDR were lower ( $p < 0.05$ ) in cells treated with eCG (T2 =  $8.0000 \pm 1.46$  and T4 =  $10.000 \pm 2.87$ ) sheep, than in those where it was not applied (T1 =  $12.6667 \pm 0.67$  and T3 =  $20.6667 \pm 2.45$ ). Ovarian response and the production of embryos were evaluated 6 days after oestrus. The ovulation rate (TO) was greater ( $p < 0.05$ ) in T1 =  $15.50 \pm 2.83$  and  $15.66 \pm 1.47 = T2$  treatments, compared to T3 =  $8.16 \pm 3.21$  and  $11.83 \pm 2.83 = T4$ , but not marked significant difference eCG including (T1 vs. T2 vs. T3 and T4). The amount of unfertilized oocytes (ONF) was lower ( $p < 0.05$ ) in T1 =  $0.83 \pm 0.40$  and  $1.83 \pm T3 = 1.83$ , compared to those included eCG (T2 =  $6.33 \pm 2.42$  and  $2.16 \pm T4 = 1.25$ ). The amount of transferable embryos (ET) was higher ( $p < 0.05$ ) where only FSH (T1 =  $5.83 \pm 1.13$ ) was applied with respect to T2 ( $2.66 \pm 1.17$ ), T3 ( $2.33 \pm 1.43$ ) and T4 ( $2.83 \pm 1.50$ ). In conclusion, the eCG did not improve TO, ONF and ET variables, although it was less time to IE. However, the exclusive FSH treatment showed greater TO, ONF fewer and larger number of ET, which is a good suitable alternative for multiple ovulation in ewes Pelibuey.

KEYWORDS: synchronization, gonadotropins, multiple ovulation, ovejas Pelibuey.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por el financiamiento a mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por el financiamiento otorgado a través del fideicomiso No. 167304 para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (Modalidad financiamiento a proyectos de investigación de tesis 2013).

A la **Línea Prioritaria de Investigación número 5** (LPI-5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal) por el financiamiento para la investigación.

Al **Dr. César Cortez Romero**, por la dedicación y tiempo invertido para la realización, dirección y redacción de esta tesis y principalmente por sus enseñanzas, confianza, apoyo y amistad.

Al **Dr. Juan Salazar Ortiz** y al **Dr. Jaime Arroyo Ledezma**, por su tiempo, dedicación y valiosas observaciones para la redacción final de esta tesis.

Al **Dr. Humberto Vaquera Huerta**, por su valioso apoyo y paciencia en el análisis estadístico de esta investigación.

Al **Dr. Jaime Gallegos Sánchez**, por su confianza, orientación y oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A los buenos amigos de la Universidad Autónoma de Chiapas, **Abi Matuz**, **Ediriel Pérez**, **Duvier Domínguez Hernández**, **Juan Carlos Sánchez** y a mis compañeros **Miguel Conde** y **Miguel Ángel Pérez López**, por su apoyo brindado durante la fase experimental de esta investigación.

A todas las personas que me brindaron su amistad durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A todo el personal académico y administrativo del programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados.

## DEDICATORIA

**A Dios** por darme la oportunidad de concluir una meta más en mi vida.

**A mis padres, Juan Miguel García Gutiérrez y Gabriela Juana Salas Márquez**, por darme su confianza y apoyo, ya que ustedes son parte fundamental en mi vida, este logro es también de Ustedes.

**A mi esposa Crisel Allende Bastida**, gracias por confiar en mí y por todo tu apoyo que me has dado incondicionalmente, pero sobre todo porque has estado a mi lado en las buenas y en las malas.

**A mis hijos** que son el motor que me impulsa a seguirme superando.

**A mis hermanos Rubén y María†** porque siempre he encontrado en ustedes un apoyo, amistad y comprensión en los momentos buenos y malos que la vida nos ha presentado.

# CONTENIDO

	Página.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	3
2.1. Objetivo .....	4
2.2. Hipótesis .....	4
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
3.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA OVINOCULTURA EN MÉXICO .....	5
3.2. Ciclo estral .....	6
3.3. Foliculogénesis .....	6
3.3.1. Folículos con respuesta a las gonadotropinas .....	7
3.3.2. Folículos dependientes de gonadotropinas .....	7
3.3.3. Folículos ovulatorios .....	8
3.4. Principios del tratamiento de ovulación múltiple .....	9
3.5. Hormonas utilizadas para inducir ovulación múltiple .....	9
3.5.1. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) .....	9
3.5.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH) .....	10
3.5.3. Combinación de FSH-eCG .....	11
3.6. Protocolos utilizados para inducir ovulación múltiple .....	12
3.6.1. Protocolos con progestágenos, GnRH y LH .....	12
3.6.2. Protocolos con prostaglandinas, GnRH y LH .....	13
3.7. Factores que afectan los programas de ovulación múltiple .....	14
3.7.1. Factores asociados a la raza .....	14
3.7.2. Factores asociados a la edad .....	14
3.7.3. Factores hormonales .....	15
3.7.4. Factores ambientales .....	15
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
4.1. Ubicación .....	17
4.2. Animales .....	17
4.3. Alimentación .....	17
4.4. Protocolos de ovulación múltiple .....	18

4.5. Detección de estros y monta natural .....	19
4.6. Colecta de embriones.....	19
4.7. Análisis hormonal- Estradiol (E2) .....	24
4.8. Variables evaluadas.....	24
4.9. Análisis estadístico.....	25
V. RESULTADOS.....	26
5.1. Inicio (h) y porcentaje de ovejas que presentaron estro .....	26
5.2. Tasa ovulatoria (TO) .....	27
5.3. Tasa de recuperación (TR) .....	28
5.4. Ovocitos no fertilizados (ONF) .....	29
5.5. Embriones transferibles (ET).....	29
5.6. Análisis hormonal Estradiol (E2) .....	30
VI. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES .....	34
VIII. LITERATURA CITADA .....	35



## CONTENIDO DE CUADROS

Página.

<b>Cuadro 1.</b> Porcentaje de estros e inicio del mismo (media $\pm$ error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de superovulación. ....	26
<b>Cuadro 2.</b> Tasa ovulatoria (media $\pm$ error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de superovulación.....	28
<b>Cuadro 3.</b> Tasa de recuperación (%) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de superovulación. ....	28
<b>Cuadro 4.</b> Ovocitos no fertilizados (media $\pm$ error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de superovulación. ....	29
<b>Cuadro 5.</b> Embriones transferibles (media $\pm$ error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de superovulación.....	29

## CONTENIDO DE FIGURAS

	<b>Página.</b>
<b>Figura 1.</b> Principales estados con población ovina en México durante el año 2012. (SIAP-SAGARPA, 2014). .....	5
<b>Figura 2.</b> Ilustración esquemática del desarrollo folicular (Modificado de Scaramuzzi <i>et al.</i> , 2011). .....	8
<b>Figura 3.</b> Posición de cúbito dorsal en un plano inclinado de 30-45° .....	20
<b>Figura 4.</b> Exteriorización del aparato reproductor. ....	21
<b>Figura 5.</b> Colocación de la sonda Foley. ....	21
<b>Figura 6.</b> Colocación del catéter e inyección del medio de lavado. ....	22
<b>Figura 7.</b> Evaluación embrionaria con ayuda de un microscopio estereoscópico. ....	24
<b>Figura 8.</b> Curva de supervivencia del inicio al estro en ovejas Pelibuey bajo los siguientes protocolos de superovulación: trat 1 = 200 mg de FSH, trat 2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, trat 3 = 250 UI de FSH/LH y trat 4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG. ....	27
<b>Figura 9.</b> Concentraciones séricas de Estradiol. ....	30

## I. INTRODUCCIÓN

En los próximos 50 años, el desarrollo de nuevas biotecnologías jugará un papel clave en el aumento de la generación de alimentos. Así, la industria pecuaria, en especial la ovina, tendrá que hacer frente a dos retos principales, al mismo tiempo: 1) aumentar la productividad y la eficiencia, contemplando la diferencia entre productos, agregando valor y consistencia y, 2) aumentar la velocidad de los logros tecnológicos y la puesta en marcha de los mismos, con el fin de competir con éxito en el mercado con las otras carnes alternativas. Estos retos no son fáciles de alcanzar, dado el tamaño, el tipo de negocio y la inversión de capital que las industrias de aves de corral, carne de cerdo y carne de res tienen que hacer. Por otra parte, la ovinocultura tendrá que trascender y aumentar su productividad y rentabilidad, sin disminuir la calidad sensorial de la carne de ovino (Montossi *et al.*, 2013). Los retos y las necesidades que la población demanda para satisfacer las necesidades de carne ovina son de gran interés, por lo tanto; se han desarrollado nuevas biotecnologías para el mejoramiento genético de las explotaciones de esta especie y una de ellas es la producción y transferencia de embriones. Hace más de 50 años, Warwick *et al.* (1934) realizaron los primeros trabajos llevados a cabo en caprinos y ovinos. Posteriormente, a principios de la década de los 60, se hicieron algunos ensayos en Australia, por parte de Moore y Rowson (1960), y en Nueva Zelanda, a cargo de Tervit y Havick (1976), quienes contribuyeron a mejorar los procesos y las posibilidades del desarrollo de esta biotecnología. Sin embargo, hay mucho por hacer, ya que es necesario aumentar la producción y supervivencia embrionaria. La técnica de producción *in vivo* de embriones va asociada siempre a ovulación múltiple, con el objetivo de obtener una elevada tasa ovulatoria y, aunado a esto, un buen porcentaje de fertilización, para luego recuperar los embriones que se transferirán directamente o se conservarán (Forcada *et al.*, 2009). La ovulación múltiple en ovinos se ha inducido mediante la aplicación de diferentes fuentes hormonales; entre las hormonas más empleadas se hallan la eCG (gonadotropina coriónica equina) y la FSH (hormona folículo estimulante) (Simonetti *et al.*, 2008). En las últimas tres décadas se ha hecho una gran mejora en la eficacia de los procedimientos de ovulación múltiple para producción de embriones *in vivo*, mediante la sustitución de eCG con preparaciones de FSH, principalmente de origen porcino (Armstrong y Evans, 1983; Martemucci *et al.*, 1988;

Jabbour y Evans. 1991). Por otra parte, se ha buscado mejorar los resultados en cuanto a la producción de embriones mediante protocolos de ovulación múltiple, aplicando una combinación de FSH/eCG (Simonetti *et al.*, 2008; Menchaca *et al.*, 2009; Forcada *et al.*, 2011). La producción de embriones *in vivo* en los pequeños rumiantes se ha mejorado con los años. Sin embargo, debido a la variabilidad de la respuesta a la estimulación de ovulación múltiple en ovejas todavía sigue siendo necesario mejorar las técnicas (Cognié *et al.*, 2003) y además, debido a la variación en la respuesta a la estimulación de ovulación múltiple derivada de las diferencias marcadas entre razas ovinas, es de suma importancia establecer un protocolo de ovulación múltiple para cada una de ellas en específico. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que ejerce la eCG en las variables de respuesta; horas al inicio del estro post retiro del CIDR (IE), tasa ovulatoria (TO), ovocitos no fertilizados (ONF), embriones transferibles (ET), al combinarla en los protocolos tradicionales de ovulación múltiple a base de FSH y FSH/LH comercial en ovejas Pelibuey.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta al tratamiento hormonal para inducir ovulación múltiple se ve afectada por los factores intrínsecos de la donante, como la raza, la edad, estado reproductivo, así como los factores extrínsecos tales como tipo de gonadotropinas, su pureza y su horario de tratamiento (Naqvi, *et al.*, 2001; D'Alessandro, *et al.*, 2005). Hoy en día los tratamientos hormonales para lograr una ovulación múltiple (MO) y con ello la transferencia de embriones (ET) dan lugar a utilizar intensivamente a las hembras con un alto valor genético. En los últimos años se han logrado avances considerables en el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas (MOET) aplicadas principalmente para el mejoramiento genético y mejorar el potencial de producción de ovinos y caprinos (Nicholas, 1996; Naqvi, *et al.*, 2001), siendo aún necesario aumentar el número de embriones transferibles (Gibbons y Cueto, 2013). La mayoría de los estudios de ovulación múltiple y transferencia de embriones más recientes se enfocan a la variabilidad de la tasa ovulatoria y la máxima cantidad de embriones transferibles en respuesta al tratamiento hormonal a base de FSH exógena. Las mejoras en los protocolos de ovulación múltiple con base en la administración de diferentes preparados de gonadotropinas no han logrado evitar estas diferencias entre los animales donantes (González-Bulnes, *et al.*, 2000; Cognié *et al.*, 2003). Los recientes estudios de la investigación están dirigidos a mejorar la eficiencia de la ovulación múltiple (embriones transferibles). Algunos métodos de ovulación múltiple se han mejorado mediante el uso de regímenes que combinan tanto la hormona folículo estimulante (FSH) y gonadotropina coriónica equina (eCG) (Simonetti *et al.*, 2008; Fuerst, *et al.*, 2009; Menchaca *et al.*, 2009; Salehi *et al.*, 2010; Mohammad, *et al.*, 2012; Lehloenya *et al.*, 2013).

## **2.1. Objetivo**

Evaluar el efecto de la eCG al incluirla en protocolos de ovulación múltiple basados en la aplicación de FSH y una combinación de FSH/LH comerciales, para incrementar la tasa ovulatoria y el número de embriones transferibles en ovejas Pelibuey.

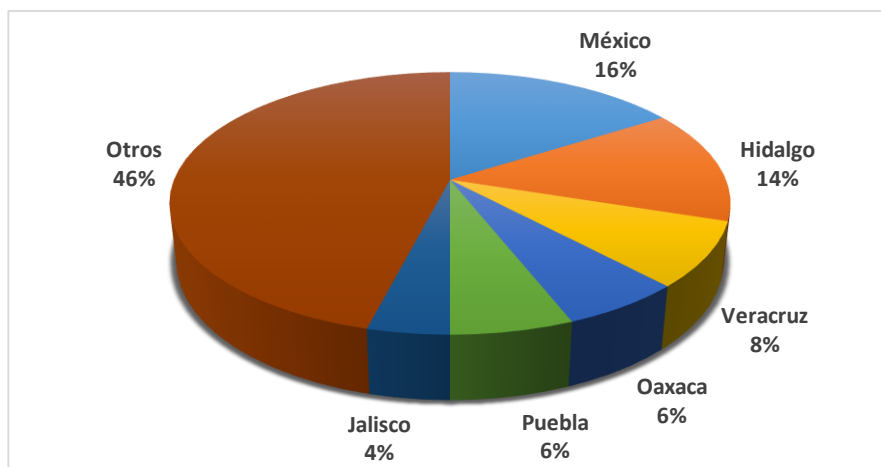
## **2.2. Hipótesis**

La adición de gonadotropina coriónica equina (eCG) en protocolos de ovulación múltiple a base de FSH y FSH/LH comerciales, incrementa la tasa ovulatoria y el número de embriones transferibles en ovejas Pelibuey.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA OVINOCULTURA EN MÉXICO

Para el año 2050, el sector agrícola tiene el reto de aumentar la producción de más del 60% para alimentar al mundo (Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO), 2012). Hoy en día la actividad de la ovinocultura en nuestro país es deficiente ya que sigue sin satisfacer las necesidades de carne, leche y lana que demanda la población mexicana (Cuellar, 2006; SIAP-SAGARPA, 2014). Entre los problemas más comunes que afectan el buen desarrollo y productividad de las explotaciones ovinas son: la baja productividad que integran los factores de manejo, principalmente en reproducción, nutrición y sanitario. La población de ovinos en México para los últimos 10 años ha tenido un ligero aumento, ya que del 2004 al 2012 solo se reporta un incremento de aproximadamente 1,323,126 de cabezas (SIAP-SAGARPA, 2014). Según cifras que reporta el SIAP (2014), se tiene que para el año 2012 la población era de 8,405,902 cabezas de ganado, representando el 12.95% del inventario nacional ganadero. En los estados de la región centro se concentra la mayor cantidad de la población ovina (Figura 1), siendo el Estado de México el primer lugar contando con 1,326,982 de cabezas, seguido de Hidalgo con 1,162,556 cabezas y en tercer lugar tenemos a Veracruz con 664,258 cabezas respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2014).



**Figura 1.** Principales estados con población ovina en México durante el año 2012. (SIAP-SAGARPA, 2014).

### 3.2. Ciclo estral

La oveja es un rumiante poliéstrico estacional, la cual presenta anualmente dos etapas fisiológicas bien definidas (Barrell *et al.*, 1992). Una época reproductiva (días cortos) y otra de anestro (días largos); en la primera se tiene una actividad ovárica con un ciclo estral de 16 a 17 días; sin embargo Cruz *et al.* (1994) reportan una duración de  $17.8 \pm 0.9$  días en ovejas de la raza Tabasco. En relación a las razas, no existen diferencias en este factor; ya que, tanto en las razas de lana como en las de pelo, este se ha descrito con una duración media de  $16.8 \pm 0.3$  (Acritopoulou *et al.*, 1977) y  $17.5 \pm 1.6$  días (Navarro y Torres, 1985), respectivamente. En la segunda etapa se manifiesta la ausencia de ciclicidad, receptividad y como consiguiente ovulación; sin embargo Arroyo (2011) menciona que más del 60% de los ovinos de pelo presentan actividad ovulatoria durante todo el año. La mayor parte del ciclo estral está comprendida por las fases denominadas metaestro y diestro (fase lútea) que tiene una duración aproximada de 12-14 días (Goodman e Inskeep, 2006), y se caracteriza por la presencia de uno ó más cuerpos lúteos, que secretan progesterona ( $P_4$ ); el cuerpo lúteo continua funcional en caso de gestación o sufre una lisis por acción de las prostaglandinas para así iniciarse una nueva fase folicular (Fernández, 1993). Las fases de proestro y estro (fase folicular) está definida como el intervalo que existe entre la luteólisis y la ovulación, con una duración de 3-4 días (Karsch, 1997), donde se produce un periodo de receptividad sexual denominado estro, con una duración media de 36 h (Cruz *et al.*, 1994), ocurriendo la ovulación de 24 a 30 h, después de iniciado el estro (Driancourt *et al.*, 1991). La regulación del ciclo estral de la hembra, se lleva a cabo mediante el eje hipotálamo-adenohipófisis, a través de la liberación de diferentes tipos de hormonas que controlan la función gonadal.

### 3.3. Foliculogénesis

La cantidad de ovocitos en el ovario adulto son originados a partir de un número definitivo de células germinales primordiales derivadas de la masa celular interna del blastocisto



en desarrollo (Picton, 2001). El proceso de la foliculogénesis está definido como la evolución de los folículos primordiales hasta el estadio de preantral y antral, concluyendo con la atresia y, rara vez, en la ovulación (López *et al.*, 1993), el cual tiene una duración de 4 a 6 meses (Scaramuzzi *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 2003), pasando por diferentes etapas de desarrollo: primordiales, comprometidos, sensibles a las gonadotropinas, dependientes de las gonadotropinas y folículos ovulatorios (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

### **3.3.1. Folículos con respuesta a las gonadotropinas**

Cada 16-17 días se presenta el ciclo ovárico y es reclutado un grupo de folículos primordiales (figura 2), que van desarrollándose de manera continua debido al incremento en las concentraciones de FSH en la circulación sanguínea (Webb *et al.*, 2003). Este proceso dura de 1, 2 ó 3 días en ovejas y es aquí donde responden a las gonadotropinas, principalmente a la hormona folículo estimulante (FSH) y adquieren su capacidad esteroidogénica, (Driancourt, 2001; Uribe-Velazquez *et al.*, 2009; Scaramuzzi *et al.*, 2011), y únicamente sobreviven un número limitado y el destino del resto es la atresia. Los ovocitos presentes en el folículo que han sobrevivido dan continuidad a su crecimiento y forman su zona pelúcida y son capaces de reiniciar la meiosis (Trounson *et al.*, 1998).

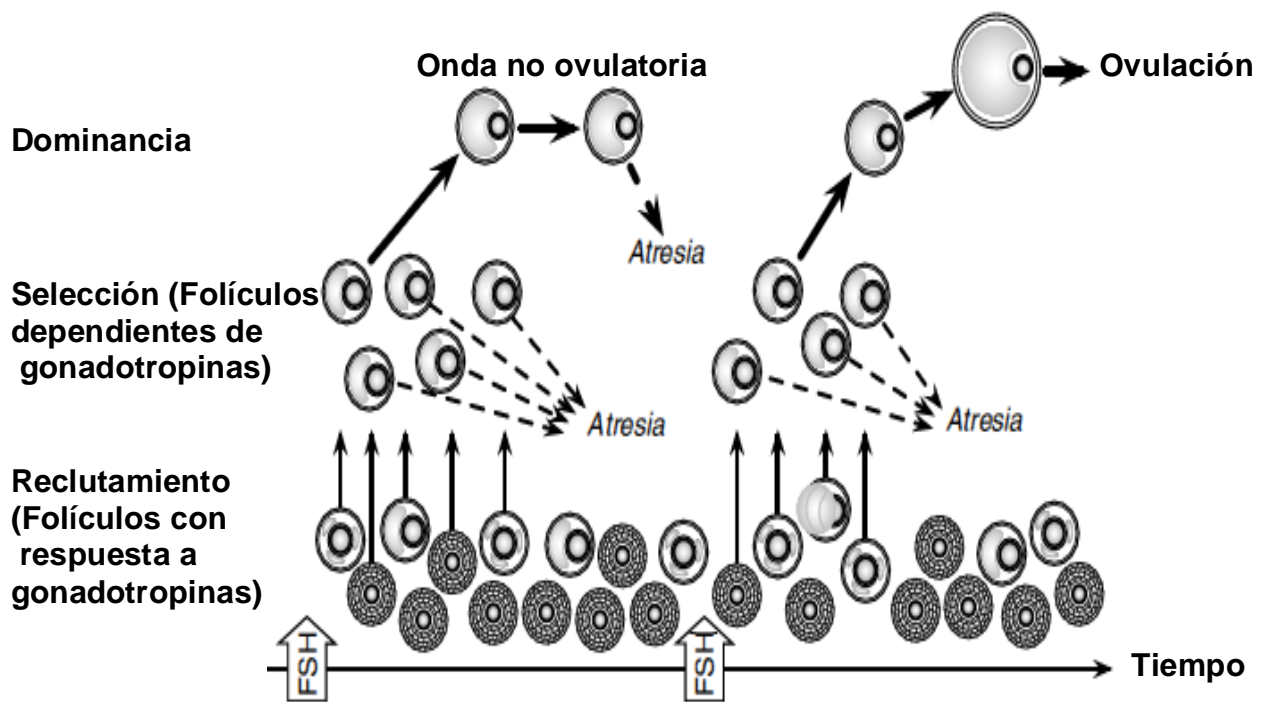
### **3.3.2. Folículos dependientes de gonadotropinas**

Durante el desarrollo folicular, algunos de los folículos que han sido reclutados (figura 2), son seleccionados para continuar su crecimiento hasta estadios preovulatorio. Seguido de esto se establece una fase de dominancia dada por los folículos más desarrollados (López *et al.*, 1993). Los folículos seleccionados son dependientes de gonadotropinas (Scaramuzzi, *et al.*, 2011) y presentan en las células de la teca y granulosa la mayor cantidad de receptores para LH y FSH, así mismo poseen los mayores niveles de

estradiol intrafolículo, sobre todo cuando alcanzan los 4 mm de diámetro (Driancourt, 2001).

### 3.3.3. Folículos ovulatorios

La magnitud de la dominancia está marcado por el tamaño del folículo dominante con respecto al subordinado más grande (Figura 2), que en ovejas es aproximadamente de 2-3 mm (Driancourt. 2001). El folículo dominante tiene la capacidad de inhibir a otros folículos que compiten entre sí dentro de ambos ovarios (Evans. 2003); este fenómeno está dado por la producción de estradiol e inhibina, que por efecto de retroalimentación negativa a nivel de Hipotálamo-Hipófisis, suprime la secreción de FSH a un nivel inferior al requerido para activar el desarrollo de nuevos folículos (Baird and Campbell, 1998). Así mismo, se incrementa la estimulación de aromatización y aumentan aún más los niveles de estradiol, así como los receptores a LH y las concentraciones de FSH son muy bajas; de esta forma prevalece el mantenimiento de dominancia (Driancourt *et al.*, 1991; Scaramuzzi *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Ilustración esquemática del desarrollo folicular (Modificado de Scaramuzzi *et al.*, 2011).

### **3.4. Principios del tratamiento de ovulación múltiple**

La ovulación múltiple y transferencia de embriones, han sido usadas en pequeños rumiantes en especial en ovinos, ya que representan una herramienta esencial tanto en programas de conservación de recursos genéticos como en programas de mejora genética destinados a aumentar las producciones ganaderas. Su fundamento está basado en incrementar el número de ovulaciones y como consiguiente, el número de embriones viables transferibles por hembra seleccionada, sometida a algún tratamiento hormonal. Los principios de los tratamientos de ovulación múltiple están enfocados a superar los efectos inhibitorios establecidos por el folículo dominante, para ello se requiere el aporte de altas concentraciones de FSH exógena (González-Bulnes *et al.*, 2002).

### **3.5. Hormonas utilizadas para inducir ovulación múltiple**

#### **3.5.1. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)**

La gonadotropina coriónica equina (eCG), originalmente denominada gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG), fue descubierta por Cole y Hart en 1930, es una hormona de origen glucoprotéico, teniendo su fuente de origen en las copas endometriales de la yegua gestante, es secretada a partir del día 40 hasta el 75, periodo durante el cual alcanza sus máximas concentraciones en suero. Posteriormente, da inicio a un descenso, esto paralelo a la degeneración de las mismas copas endometriales (Allen, 2001). La eCG presenta actividad biológica similar a la ejercida por la FSH y LH, siendo de mayor dominancia las acciones de FSH (Hafez y Hafez, 2000). Debido a las funciones que logra presentar la eCG, en los ovinos ha sido empleada en dosis bajas (200 a 500 UI), para inducir el desarrollo folicular y la ovulación especialmente en la época de anestro (Catalano *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007). La eCG presenta un largo periodo de vida media (21 h), debido a la gran cantidad de ácido siálico que la protege de la degradación hepática (McIntosh *et al.*, 1975), esto permite que sea aplicada en una sola inyección (Murphy, 2012). La eCG fue una de las primeras hormonas

comercialmente disponibles para inducir la ovulación múltiple en los animales domésticos. En los ovinos y caprinos se ha inducido la ovulación múltiple (OM) mediante la aplicación de 1000 a 2000 UI de eCG, 48 horas antes de concluir en tratamiento a base de progestágenos (González-Reyna *et al.*, 1999; Gibbons y Cueto 2013).

Referente a la administración en dosis elevadas empleadas en los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones, la literatura menciona que se han reportado efectos negativos, ya que la eCG estimula el crecimiento folicular por un periodo de tiempo más prolongado: esto originado por su largo periodo de vida en la circulación sanguínea, provocando que las ovulaciones se presenten de manera dispersa (Cameron *et al.*, 1988). Asimismo, la constante estimulación en el proceso de foliculogénesis, conduce a la formación de folículos persistentes anovulatorios, los cuales segregan grandes cantidades de estradiol (Martemucci *et al.*, 1995; Chagas e Silva *et al.*, 2003). Estas alteraciones tendrán consecuencias negativas en cuanto al proceso de fertilización y por ende en la recuperación, de tal manera que es muy baja la cantidad y calidad de embriones que se logren colectar por hembra donante (Martemucci *et al.*, 1995; Chagas e Silva *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de todas las desventajas, la eCG sigue siendo utilizada por su amplia disponibilidad en el mercado, bajo costo y su fácil administración.

### **3.5.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH)**

La FSH (hormona folículo estimulante) es una hormona glucoprotéica producida en las células gonadotrofas de la adenohipófisis, la cual está formada por dos subunidades peptídicas denominadas alfa y beta (Vegetti y Alagna, 2006). En la oveja, durante el ciclo estral se han observado que existe un incremento en la secreción de FSH, coincidiendo al momento que surge el pico preovulatorio de LH y una segunda elevación 24 a 28 h posteriores, cuando las concentraciones de LH han disminuido (Miller *et al.*, 1981). La FSH a diferencia de la eCG, está tiene una vida media más corta (3-5 h), por tal motivo, en los protocolos de ovulación múltiple, su aplicación es de 6-8 dosis cada 12 h y de manera decreciente (Walker *et al.*, 1986; Demoustier *et al.*, 1988; Cognié 1999).

Dado que el uso la eCG presenta más alteraciones negativas, se ha utilizado como alternativa el empleo de la FSH para la ovulación múltiple. La administración de la FSH ha mostrado una menor variabilidad en la tasa ovulatoria y así mismo, un menor número de folículos anovulatorios (Jabbour y Evans 1991; Chagas e Silva *et al.*, 2003). De igual forma, se ha reportado que la FSH ha sido superior a la eCG en términos de ovulaciones, tasa de fertilización y número de embriones de buena calidad (Cognié, 1999).

Las preparaciones comerciales de gonadotropinas se componen en su mayoría de la hormona folículo estimulante (FSH), pero contienen una pequeña cantidad de hormona luteinizante (LH), la cual puede variar de acuerdo a los diferentes preparados farmacéuticos (Lindsell *et al.*, 1986), afectando así la respuesta al tratamiento. Se ha observado que un mayor contenido de LH disminuye los rendimientos de los protocolos de estimulación ovárica debido a que gran parte de los folículos que se desarrollan en respuesta al tratamiento entran en atresia a lo largo de su desarrollo o no llegan a la ovulación (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000).

### **3.5.3. Combinación de FSH-eCG**

Desde los años 1960 se ha utilizado en ovejas la gonadotropina corionica equina (eCG), para la estimular la ovulación múltiple, sola o en combinación con la hormona folículo estimulante (FSH). Los primeros estudios demostraron que la respuesta a la estimulación de ovulación múltiple a base de eCG es menor en comparación de la FSH (Armiridis y Cseh, 2012). Tratamientos donde se combinan FSH y eCG, aumentan la respuesta a la estimulación ovárica con respecto a solo emplear eCG (Salehi *et al.*, 2010).

El “tratamiento tradicional” que más se ha utilizado en ovinos de la raza Merino, durante la época otoñal, consiste en la combinación de (6-8) dosis decrecientes de FSH con una aplicación única de eCG (200-300 UI) hacia el final del tratamiento progestacional (Gibbons y Cueto, 2013).

### **3.6. Protocolos utilizados para inducir ovulación múltiple**

#### **3.6.1. Protocolos con progestágenos, GnRH y LH**

El protocolo más común para la sincronización del estro en el ganado ovino está basado en el tratamiento a base de progestagenos (progesterona), la cual es suministrada mediante implantes intravaginales (esponjas/CIDR) (Abecia *et al.*, 2011). El uso de la progesterona o sus análogos se basan en sus efectos en la fase lútea del ciclo estral (metaestro y diestro), la simulación de la acción de la progesterona natural producida en el cuerpo lúteo después de la ovulación, que es responsable de controlar la secreción de LH. Por lo tanto, el control de la vida del cuerpo lúteo o manipulación de las concentraciones circulantes de progesterona permite la regulación del celo y la ovulación (Abecia *et al.*, 2012). Esta manipulación hormonal puede ser utilizada tanto en época reproductiva como en el anestro estacional.

En el mercado los compuestos disponibles que son empleados más comúnmente en los ovinos, destacan la progesterona (en dosis de 0.3 g), acetato de flourogestona (FGA; en dosis de 20 a 40 mg) y el acetato de medroxiprogesterona (MAP; en dosis de 60 mg). Todos los compuestos son suministrados por vía intravaginal, la P<sub>4</sub> es liberada por medio de un dispositivo (CIDR), el MAP y FGA por esponjas de poliuretano.

Los protocolos tradicionales para superestimulación ovárica, consisten en 14 días de exposición a los progestágenos, y la FSH se inicia a administrar aproximadamente 2 días antes de la remoción del dispositivo liberador de P<sub>4</sub> (simulación de las fases lútea y folicular); sin embargo, la exposición a corto plazo de progesterona puede sostener tasas de sincronización y la respuesta a la ovulación múltiple aceptables, ya que permite mayores concentraciones séricas de progesterona, lo que evita la presencia de folículos persistentes (Menchaca *et al.*, 2009). En este mismo estudio de Menchaca *et al.* (2009) se demostró que el uso de GnRH 24 h posteriores al retiro del progestágeno mejoró la tasa de fertilización y el número de embriones transferibles. Así mismo, en otra investigación realizada en ovejas de la raza Santa Inés, encontraron que la administración de hormona luteinizante (LH) 48 h posteriores al retiro del progestágeno mejora la respuesta superovulatoria (Franco *et al.*, 2012). Por otra parte, para mejorar la

respuesta ovulación múltiple, se sugiere administrar LH en forma creciente hacia el final del tratamiento a una relación FSH/LH de 3:1 (1er a 3er aplicación), 1:1 (4ta aplicación) y 1:2 (5ta aplicación) (Gibbons y Cueto, 2013).

### **3.6.2. Protocolos con prostaglandinas, GnRH y LH**

Otra alternativa para la sincronización del estro, dentro de los ciclos estrales naturales, es la administración exógena de prostaglandinas o sus análogos, con la finalidad de inducir una luteólisis controlada (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005); y con esto, provocar una disminución de la secreción de progesterona y como consiguiente una sincronía en el desarrollo folicular. Para que las prostaglandinas ejerzan su efecto, es necesario la presencia de un cuerpo lúteo, basados en este concepto, estudios han encontrado que la administración de PGF<sub>2</sub>α a partir del día 3 después de la ovulación, induce luteolisis y ovulación (Rubianes *et al.*, 2003; Pope y Cárdenas 2004).

En algunas ocasiones existe la imposibilidad de conocer la fase del ciclo estral en las que se encuentran las ovejas, por lo que es necesaria la administración de dos inyecciones de PGF<sub>2</sub>α, con un intervalo de 9-10 días de diferencia; por lo tanto, casi todos los animales del grupo estarán en la mitad de la fase lútea al aplicarles la segunda dosis y responderán al tratamiento. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, es mejor administrar la segunda dosis de prostaglandina en el quinto día hipotético del ciclo estral; es decir, 7 días después de la primera dosis (Abecia *et al.*, 2012).

La sincronización del estro y la ovulación con análogos de progestágeno induce una menor calidad de folículos preovulatorios en comparación con la administración de dos aplicaciones prostaglandinas, lo que conduce a una función lútea deficiente y así mismo; la viabilidad de los embriones será de menor calidad (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005). Berlinguer *et al.* (2007) indican que en protocolos de ovulación múltiple, los progestágenos presentan efectos negativos con respecto a la aplicación de dos inyecciones de cloprostenol con un intervalo de 10 días entre dosis, en la producción de ovocitos.

### **3.7. Factores que afectan los programas de ovulación múltiple**

#### **3.7.1. Factores asociados a la raza**

La variabilidad a la respuesta de ovulación múltiple en ovinos está bien caracterizada entre razas; sin embargo, dentro de cada raza existe también una variabilidad individual entre ovejas donantes en respuesta a los fármacos superovulatorios (Naqvi *et al.*, 2001).

Los primeros estudios establecieron que la mayor parte de las diferencias en la respuesta a la ovulación múltiple estaban relacionados con factores genéticos, ya que razas de mayor prolificidad tienen una mejor respuesta a la estimulación exógena a base de gonadotropinas (Bidon *et al.*, 1986; Ammoum *et al.*, 2006). Picazo *et al.* (1996) reportaron que existen diferencias entre razas con respecto a la respuesta de estimulación a la ovulación múltiple, donde se emplea una interacción entre el tipo de gonadotrofina utilizada.

En un estudio efectuado por Ammoum *et al.* (2006) reportaron que las diferencias entre razas, en respuesta a la ovulación múltiple, son principalmente por la sensibilidad a la administración de FSH en el estado de la dinámica folicular. Así mismo, se encontró una alta variabilidad individual dentro de las razas. Debido a la variación en la respuesta superovulatoria derivada de las diferencias marcadas entre razas ovinas, es de suma importancia establecer un protocolo confiable de ovulación múltiple para cada raza.

#### **3.7.2. Factores asociados a la edad**

La edad de las ovejas es un factor determinante para los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones (OMTE), ya que algunos estudios han demostrado que ovejas adultas tienen una mayor respuesta a la tasa ovulatoria y producción embrionaria con respecto a ovejas prepúberes (Bari *et al.*, 2000). Chagas e Silva *et al.* (2003) en su estudio trabajaron con la raza portuguesa Saloia y encontraron que las ovejas múltiparas presentaron una mayor tasa ovulatoria con respecto a primíparas y nulíparas. Por otra parte, Forcada *et al.* (2000) utilizaron ovejas de raza Rasa Aragonesa, esto fue al final



de su vida reproductiva, encontraron que existe una disminución en el porcentaje de hembras ovuladas, cantidad de estructuras recuperadas y fertilizadas comparadas con las que normalmente se han observado en animales más jóvenes.

### **3.7.3. Factores hormonales**

Las preparaciones comerciales disponibles de FSH a partir de extractos de pituitaria de cerdo sufren inevitablemente una composición que no es uniforme. Los contenidos de LH en los productos comerciales de FSH son muy variables a partir de lote a lote, esto puede afectar significativamente el resultado de la respuesta a la ovulación múltiple en términos de la respuesta ovárica, la tasa de fertilización y calidad embrionaria (Guzik y Niemann, 1995; D'Alessandro *et al.*, 2005). Dado que las concentraciones de LH basales son esenciales para el crecimiento folicular inducido por FSH, incrementos sostenidos de las concentraciones de LH inhiben los mecanismos endógenos de prevención de atresia, pueden producir alteraciones al momento de la presentación y en la amplitud del pico preovulatorio de LH; así mismo, se afecta la ovulación y como consiguiente, la fertilización (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000; Armiridis y Cseh, 2012).

Como consecuencia, parecería razonable la utilización de preparaciones de FSH altamente purificada, aunque algunos autores mencionan que niveles muy bajos de LH también producen alteraciones en la respuesta de ovulación múltiple, por lo que recomiendan incluir cantidades conocidas de LH al final del tratamiento superovulatorio con FSH pura (Cognie, 1999; Franco *et al.*, 2012).

### **3.7.4. Factores ambientales**

Dentro de los factores ambientales, podemos considerar que la estación del año es un elemento que ha tenido relevancia en cuanto a la respuesta a la ovulación múltiple en ovejas, ya que diversos estudios mencionan que en la época reproductiva (Otoño) se han obtenido mejores resultados en cuanto a la tasa ovulatoria y producción embrionaria,

con respecto a la época de anestro (Primavera). En un estudio realizado por Bettencourt *et al.* (2008) en ovejas Merino Negro Portuguesa estimuladas a base de FSHo, reportaron una menor tasa de embriones congelables durante la estación de primavera. Este efecto lo atribuyeron a una mayor proporción de folículos pequeños, que si bien llegan a ovular, producen ovocitos menos competentes, que dan como resultado embriones de menor calidad. Así mismo, trabajos realizados en la India, indican que la respuesta a la ovulación múltiple estaría determinada por la estación del año en ovejas tratadas a base de FSH, sin embargo, no se tiene el mismo comportamiento cuando se emplea FSH en combinación de eCG (Naqvi *et al.*, 2001).

Otro de los factores que afecta la respuesta de ovulación múltiple es la nutrición de los animales, ya que este fenómeno se ve reflejado directamente en los resultados. Grazul-Bilska *et al.* (2012) reportan que una alimentación inadecuada (exceso de dieta o restricción) tuvo efectos negativos sobre la calidad de los ovocitos que se reflejó en una menor segmentación de ovocitos después de la fecundación *in vitro*. Por otra parte, Kakar *et al.* (2005) mencionan que la oveja es capaz de responder a los cambios agudos en la nutrición inmediatamente después del periodo de la ovulación y la formación del blastocisto, ya que esto influyó en el desarrollo del embrión. Así mismo, el peso vivo y la condición corporal están relacionados con la incidencia de regresión lútea prematura. Algunos estudios han demostrado que la mayor tasa de regresión lútea reportada durante el otoño en comparación con la primavera, en condiciones de pastoreo, ha sido atribuida a la menor calidad de los forrajes durante la estación de otoño (Jabbour y Evans, 1991; Ryan *et al.*, 1991).

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Ubicación**

El estudio se llevó a cabo durante los meses de junio y julio de 2013, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, campus Córdoba, ubicado en la carretera federal Córdoba-Veracruz km 348, congregación Manuel León, municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz. La localización geográfica es 18° 51' 20" N y 96° 51' 37" O, a una altitud de 720 m. El clima es templado-regular, con una temperatura promedio de 18 °C y precipitación promedio anual de 1807.3 mm. (Köppen, modificado por García, 1988).

### **4.2. Animales**

En el desarrollo del estudio se utilizaron 24 ovejas de la raza Pelibuey, con un peso de  $40.37 \pm 6.095$  kg, edad de  $2.23 \pm 0.322$  años y condición corporal  $2.375 \pm 0.462$  en escala 1-5, (1 = flaco; 5 = obeso) de acuerdo con Russel *et al.* (1969), aptas fisiológica y reproductivamente. Se mantuvieron en corrales con sombra, piso de cemento, comederos y bebederos. 15 días antes de iniciar el experimento se les aplicó un antiparasitario vitaminado, vía intramuscular profunda (PARMISOLE ADE+B®, laboratorio PARFARM, S.A.), 1 mL por cada 20 kg de peso vivo, de acuerdo a la recomendación del laboratorio para la especie. Los sementales se mantuvieron en corrales separados, con las mismas condiciones de alojamiento que las ovejas y se les dio el mismo manejo que a las hembras antes de iniciar el experimento.

### **4.3. Alimentación**

Las ovejas pastorearon diariamente en praderas de pasto estrella (*Cynodon dactylon*), durante 7-8 h d<sup>-1</sup>, y se les ofreció un suplemento en el corral de 400 g oveja<sup>-1</sup>, a base de maíz, pasta de soya, salvado y minerales, el cual les proporcionaba 16.9 % de proteína cruda (PC) y 2.95 Mcal de energía metabolizable (EM) kg<sup>-1</sup>. Se les proporcionó

agua limpia “*ad libitum*” todo el tiempo. Los sementales estuvieron alojados en los corrales todo el tiempo, su alimentación fue a base de caña picada y pasto estrella, además de una ración de 300 g animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de complemento, a base de maíz, pasta de soya, salvado y minerales, con 16.9 % de PC y 2.95 Mcal de EM kg<sup>-1</sup>. Se les proporcionó agua limpia “*ad libitum*” todo el tiempo.

#### **4.4. Protocolos de ovulación múltiple**

Se evaluaron 4 tratamientos, utilizando seis ovejas por grupo experimental (n = 6), las cuales se asignaron al azar en cuatro grupos, dando un total de 24 ovejas. La sincronización del estro fue mediante la inserción de un dispositivo intravaginal (día cero, por la tarde, CIDR®, Pfizer, Hamilton, Nueva Zelanda), impregnado con 0.3 g de progesterona P<sub>4</sub>, por un periodo de 9 días. Al séptimo día posterior a la inserción del CIDR, se les aplicó una dosis de 250 µg vía intramuscular de cloprostenol (Celosil®, Intervet Schering-Plough Animal Health) y al noveno día, se retiró el dispositivo intravaginal, esto fue para todos los grupos.

Tratamiento 1: al sexto día después de la colocación del dispositivo intravaginal, se inició la administración de 200 mg de NIH = National Institutes of Health-FSH-P1 (Folltropin®-V, Bioniche, Animal Health Canadá Inc.) vía intramuscular por oveja tratada, suministrados cada 12 h (mañana/tarde) en ocho dosis decrecientes, de la manera siguiente: día 6 (tarde; 40 mg), día 7 (mañana/tarde; 40/30 mg), día 8 (mañana/tarde; 30/20 mg), día 9 (mañana/tarde; 20/10 mg) y día 10 (mañana; 10 mg). La primera dosis se aplicó 72 h antes del retiro del dispositivo intravaginal y la última, 12 h después de retirado.

Tratamiento 2: Se realizó lo mismo que el tratamiento 1, más una dosis de 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, México); esta se aplicó en la tarde del día 7 cuando se administró la tercera dosis de FSH.

Tratamiento 3: al sexto día después de la colocación del dispositivo intravaginal se inició la administración de 250 UI de FSH/LH (D’Alessandro *et al.*, 1996; Pluset® Laboratorios Calier, Barcelona, España) vía intramuscular por oveja tratada, suministrados cada 12

horas (mañana/tarde) en ocho dosis decrecientes de la manera siguiente: día 6 (tarde; 60 UI), día 7 (mañana/tarde; 60/35 UI), día 8 (mañana/tarde; 35/20 UI), día 9 (mañana/tarde; 20/10 UI) y día 10 (mañana; 10 UI). La primera dosis se aplicó 72 h antes del retirar el dispositivo intravaginal y la última, 12 h después de retirado.

Tratamiento 4: Se realizó lo mismo que el tratamiento 3, más una dosis de 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, México); esta se aplicó en la tarde del día 7 cuando se administró la tercera dosis de FSH/LH.

#### **4.5. Detección de estros y monta natural**

Una vez retirado el dispositivo intravaginal, las ovejas se expusieron a los machos celadores; a estos se les colocó un mandil para evitar la cópula y realizar la detección de estros. El tiempo de exposición de las ovejas al macho fue de 30 min, cada 4 h. En el momento en que las ovejas manifestaran estro, se separaron y llevaron con otro macho, previamente evaluado en cuanto a su calidad seminal, para darles monta natural (MN); el servicio de MN fue al momento que la oveja presentó señales externas de estro y un segundo servicio a las 12 h posteriores.

#### **4.6. Colecta de embriones**

Los embriones se recolectaron seis días posteriores a la detección de estros (Cervantes *et al.*, 2011), mediante la técnica quirúrgica de laparotomía media ventral (Cortez *et al.*, 2011). Veinticuatro horas previas a la operación, se les restringió el alimento y agua a todas las ovejas. Los animales se anestesiaron en un plano general, administrándoles una combinación de xilazina (Procin®, Laboratorios PiSA), a razón de 0.25 mg kg<sup>-1</sup> P.V. de Clorhidrato de Xilazina + ketamina (Anesket®, Laboratorios PiSA) a razón de 1.25 mg kg<sup>-1</sup> P.V. de Clorhidrato de Ketamina vía intravenosa (I.V.). Consecutivamente, se colocaron las ovejas en posición decúbito esternal, con la cabeza y cuello extendidos hacia arriba; se procedió a intubar las ovejas usando una sonda endotraqueal conectada

a un tubo con suministro de óxido nitroso. Una vez aplicada la anestesia, cada una de las hembras se colocó en posición de cúbito dorsal en una camilla especial para procedimientos quirúrgicos en un plano inclinado de 30-45° (Figura 3). Se rasuró y desinfectó el campo operatorio, se colocaron los campos quirúrgicos para proceder a la cirugía, en la cual se hizo una abertura de 5 a 7 cm, a 3 cm por delante de la ubre, para exponer el útero y los ovarios (Figura 4).



**Figura 3.** Posición de cúbito dorsal en un plano inclinado de 30-45°.

Después de la exteriorización de los ovarios, se midió la respuesta ovulatoria, con el conteo de los cuerpos lúteos (CL).



**Figura 4.** Exteriorización del aparato reproductor.

El proceso de recuperación embrionaria consistió en la colocación de una sonda Foley calibre 10 fr. mediante una punción en la base del cuerno, a nivel del ligamento intercornual, donde se introdujo la sonda en el interior de la luz del cuerno uterino (1 cm) (Figura 5), fijando la misma con un globo, que se infla con una jeringa (3.5 a 5 mL de aire) para evitar el paso del medio de lavado al cuerpo del útero.



**Figura 5.** Colocación de la sonda Foley.

Enseguida, se colocó un catéter intravenoso (calibre 1,20 x 25 mm de longitud, Punzocat®) en la unión utero-tubárica, para la inyección de 40 mL del medio de lavado (VIGRO® Complete Flush Solution, Bioniche, Animal Health Canadá Inc.) precalentado a

37 °C (Figura 6). De esta manera se produce una corriente de arrastre en forma gravitacional e intermitente, que fluye hacia la curvatura mayor, donde está ubicada la sonda; dando ligeros masajes en el cuerno uterino. El medio de colecta se recuperó con la colocación de la parte distal de la sonda en un tubo colector graduado estéril previamente entibiado a 37 °C. Se procedió de igual manera con el otro cuerno uterino.



**Figura 6.** Colocación del catéter e inyección del medio de lavado.

Finalizada la recuperación embrionaria, el tubo colector con el líquido recuperado se colocó a baño María para mantener las estructuras colectadas hasta su evaluación. En seguida, el aparato genital se lavó con solución salina para evitar posibles adherencias y se introdujo en la cavidad abdominal para realizar la sutura de los planos quirúrgicos, utilizando Catgut® crómico de 2 ceros para peritoneo y musculo, y una sutura de Nylon de 2 ceros en piel. Al término de las suturas, inmediatamente, a las ovejas se les administró 1 mL 20 kg<sup>-1</sup> P.V. de antibiótico (Shotapen® L.A. Virbac, México), 1 mL 10 kg<sup>-1</sup> P.V. de analgésico (Biodipirona® Bio Zoo, México), para prevenir infecciones postoperatorias y contrarrestar la inflamación y el dolor y 1 mL de un análogo de PGF2a,



equivalente a 250 µg de Cloprostenol (Celosil®) para causar la lisis de los cuerpos lúteos existentes y evitar una posible gestación.

Una vez finalizada la colecta, el medio recuperado se dejó en reposo en baño maría, a una temperatura de 37 °C por un periodo de 20 min; concluido el tiempo de reposo, el contenido se colocó en cajas de Petri cuadrículadas sobre una platina térmica a 37°C. Enseguida, se realizó la búsqueda y evaluación morfológica de los embriones con ayuda de un microscopio estereoscópico (ampliación 40x; Figura 7), los cuales se clasificaron en función de su grado de desarrollo y morfología, de acuerdo con Winterberger-Torres y Sevellec (1987). Los embriones fueron evaluados siguiendo los siguientes criterios morfológicos: la membrana pelúcida no debe presentar fisuras, el grado de desarrollo embrionario por lo que se refiere al día de colecta, un embrión colectado el día 6 o 7 después de iniciado el estro normalmente debe estar en estadio de mórula compacta/blastocisto, todos los embriones deben tener una esfericidad bien definida. En el estadio de mórula compacta, los límites celulares se distinguen menos ya que los blastómeros están muy unidos entre sí y en el estadio de blastocisto, las diferentes estructuras (blastocelo, botón embrionario, trofoblasto) deben ser visibles y presentan contornos bien definidos. El nivel de calidad de los embriones fue de Grado 1 (excelente o bueno), Grado 2 (regular), Grado 3 (malo), y Grado 4 (muerto o degenerado); los Grados 1 y 2 fueron considerados embriones transferibles. Una vez identificada cada estructura embrionaria, se procedió a su aislamiento en una caja de 4 pocitos previamente preparada con 200 µL de medio de mantenimiento por pozo (Holding, Laboratorios BIONICHE), a temperatura de 37°C mantenida en platina térmica, para su posterior transferencia o congelación.



**Figura 7.** Evaluación embrionaria con ayuda de un microscopio estereoscópico.

#### **4.7. Análisis hormonal- Estradiol (E2)**

A todas las ovejas se les tomaron dos muestras de sangre; una al momento que presentaron estro y la segunda 12 h posteriores. Las muestras de sangre (5 mL) fueron extraídas vía punción de la vena yugular en tubos colectores. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 693 x g durante 20 min (2500 rpm en centrifuga Solbat® C-600) para la recogida del suero. El suero se almacenó a -20 °C hasta el día del análisis. La sensibilidad analítica del ensayo (Radioinmunoanálisis) fue de 8.0 pg / mL y el coeficiente de variación intraensayo fue del 12.7 %.

#### **4.8. Variables evaluadas**

- **Porcentaje de ovejas en estro (OE):** Número de ovejas que manifestaron signos externos de estro, detectadas con un semental marcador, con respecto al número total de ovejas dentro de cada tratamiento, después de retirar dispositivos y aplicar hormonas superovulatorias.
- **Inicio del estro (IE):** Tiempo (h) transcurrido después de haber retirado el dispositivo intravaginal (CIDR) hasta que la oveja manifiesta signos externos de estro.

- **Tasa ovulatoria (TO):** Número de cuerpos lúteos (CL) presentes en la superficie de cada ovario, contabilizados una vez que son exteriorizados los ovarios.
- **Tasa de recuperación (TR):** Número total de estructuras colectadas en las ovejas experimentales superovuladas, independientemente de su clasificación morfológica y de desarrollo entre el número de cuerpos lúteos presentes.
- **Ovocitos no fertilizados (ONF):** Número de óvulos recolectados sin fertilizar.
- **Embriones transferibles (ET):** Número de embriones con calidad 1 y 2, entre los cuales se encuentran las mórulas, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.

#### 4.9. Análisis estadístico

La variable de horas al inicio del estro fue analizada por el método de curvas de supervivencia Log-Rank, utilizando el procedimiento Life Test (SAS, 2002).

La tasa ovulatoria y el rendimiento de embriones se analizaron mediante el procedimiento de modelos generalizados (GENMOND) del paquete estadístico SAS (2002), utilizando una distribución Poisson y la comparación entre tratamientos, utilizando contrastes ortogonales. Para las concentraciones de Estradiol se analizó mediante análisis de varianza y posteriormente se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Duncan. El modelo del diseño experimental utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \epsilon_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Valor de la variable respuesta correspondiente al i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

$\mu$  = Media general.

$\epsilon_i$  = Efecto del i-ésimo nivel de tratamiento,  $i = 1, 2, 3, 4$ .

$E_{ij}$  = Error experimental.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Inicio (h) y porcentaje de ovejas que presentaron estro

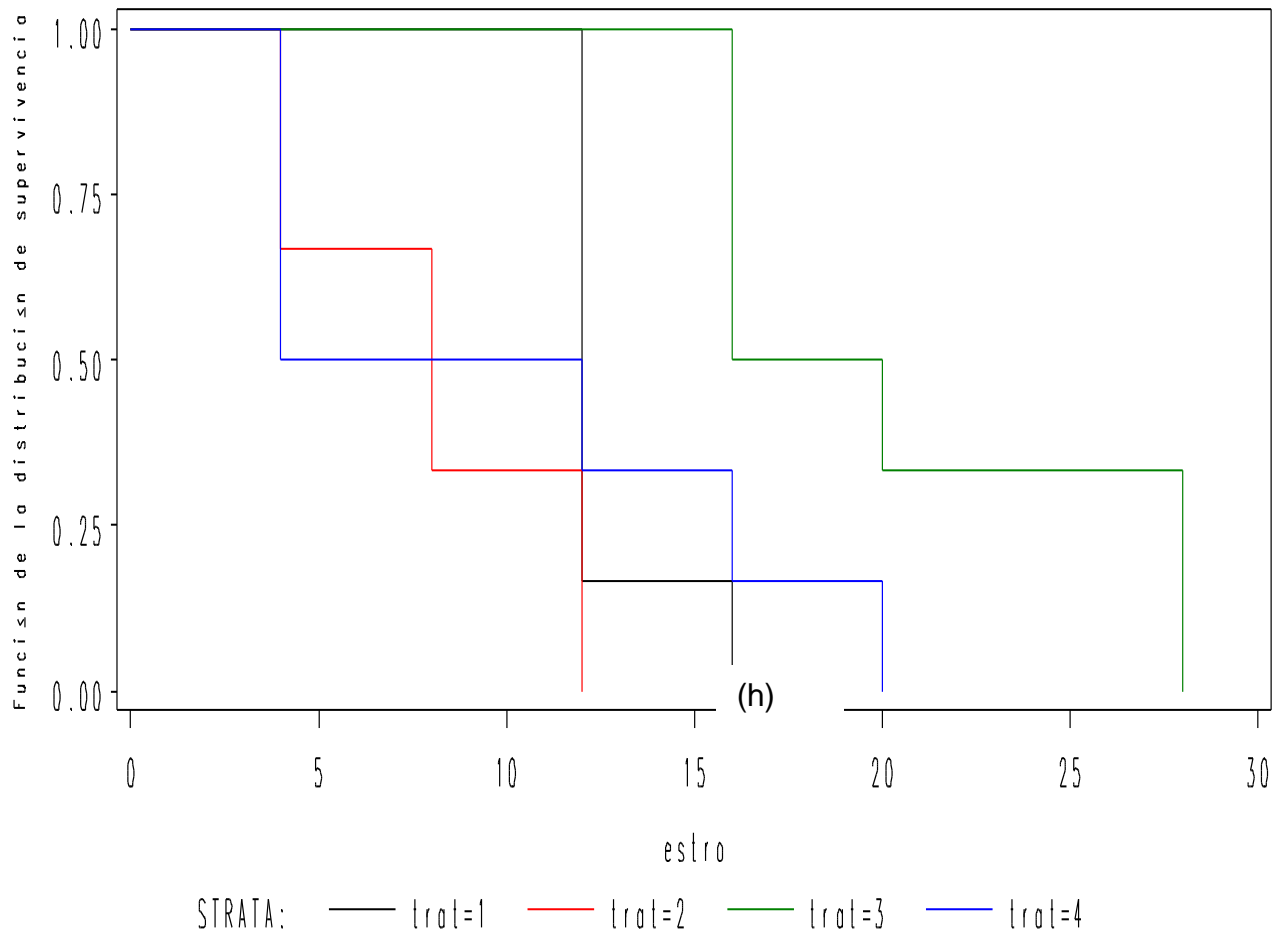
No se detectaron diferencias estadísticas en la manifestación de estro (Cuadro 1); ya que en este estudio un buen indicador fue que todos los animales manifestaron señales externas de estro, en respuesta a los tratamientos. El inicio del estro fue diferente ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos (Cuadro 1; Figura 8). Las ovejas de los tratamientos donde se incluye eCG (T2 y T4) presentaron estro en un tiempo más corto, con respecto a la retirada del dispositivo intravaginal, en comparación a donde no es incluida (T1 y T3). Las concentraciones de estradiol al momento del estro y 12 h posterior, se presentan en la Figura 9. Al momento del estro, las concentraciones de estradiol fueron más elevadas en los tratamientos donde se incluyó eCG (T2 y T4), en comparación a donde no fue incluida (T1 y T3). Lo anterior se relaciona con el inicio del estro, ya que los grupos con mayor concentración de estradiol (T2 y T3), fueron los que tuvieron un menor tiempo al inicio del estro con respecto a la retirada del dispositivo intravaginal. Se presenta una tendencia similar 12 h después de iniciado el celo, donde T2 y T4, muestran mayor concentración con respecto a T1 y T3.

**Cuadro 1.** Porcentaje de estros e inicio del mismo (media  $\pm$  error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de ovulación múltiple.

Tratamiento	(n)	Ovejas en estro (%)	Inicio del estro (h)*
T1 = FSH	6	100	12.66 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>
T2 = FSH + eCG	6	100	8.000 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>
T3 = FSH/LH	6	100	20.66 $\pm$ 2.45 <sup>c</sup>
T4 = FSH/LH + eCG	6	100	10.00 $\pm$ 2.87 <sup>ab</sup>

<sup>a b c</sup> Valores con distinta literal en columna, son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ )

\* Medias  $\pm$  EE. T1 = 200 mg de FSH, T2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, T3 = 250 UI de FSH/LH y T4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG.



**Figura 8.** Curva de supervivencia del inicio al estro en ovejas Pelibuey bajo los siguientes protocolos de ovulación múltiple: trat 1 = 200 mg de FSH, trat 2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, trat 3 = 250 UI de FSH/LH y trat 4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG.

## 5.2. Tasa ovulatoria (TO)

La tasa ovulatoria (TO) fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con FSH (T1 y T2), con respecto a los de FSH/LH (T3 y T4).

**Cuadro 2.** Tasa ovulatoria (media  $\pm$  error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de ovulación múltiple.

Tratamiento	(n)	Tasa ovulatoria (TO)
T1 = FSH	6	15.50 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup>
T2 = FSH + eCG	6	15.66 $\pm$ 1.47 <sup>ac</sup>
T3 = FSH/LH	6	8.160 $\pm$ 3.21 <sup>b</sup>
T4 = FSH/LH + eCG	6	11.83 $\pm$ 2.83 <sup>bc</sup>

<sup>abc</sup>Valores con distinta literal en columna, son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ). T1 = 200 mg de FSH, T2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, T3 = 250 UI de FSH/LH y T4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG.

### 5.3. Tasa de recuperación (TR)

La tasa de recuperación fue similar entre tratamientos, de tal manera que no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

**Cuadro 3.** Tasa de recuperación (%) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de ovulación múltiple.

Tratamiento	(n)	Tasa de recuperación (%)
T1 = FSH	6	53.61 <sup>a</sup>
T2 = FSH + eCG	6	62.78 <sup>a</sup>
T3 = FSH/LH	6	58.19 <sup>a</sup>
T4 = FSH/LH + eCG	6	52.98 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valores con misma literal en columna no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ). T1 = 200 mg de FSH, T2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, T3 = 250 UI de FSH/LH y T4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG.

#### 5.4. Ovocitos no fertilizados (ONF)

La cantidad de ovocitos no fertilizados fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos donde se incluyó eCG (T2 y T4) en comparación a cuando no se utilizó (T1 y T3).

**Cuadro 4.** Ovocitos no fertilizados (media  $\pm$  error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de ovulación múltiple.

Tratamiento	(n)	Ovocitos no fertilizados (ONF)
T1 = FSH	6	0.83 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
T2 = FSH + eCG	6	5.00 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>
T3 = FSH/LH	6	1.83 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>
T4 = FSH/LH + eCG	6	2.66 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>

<sup>a b c</sup>Valores con distinta literal en columna, son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ). T1 = 200 mg de FSH, T2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, T3 = 250 UI de FSH/LH y T4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG.

#### 5.5. Embriones transferibles (ET)

El número de embriones transferibles (ET) fue mayor ( $p < 0.05$ ) en el tratamiento a base de FSH (T1) en comparación con los tratamientos T2, T3 y T4.

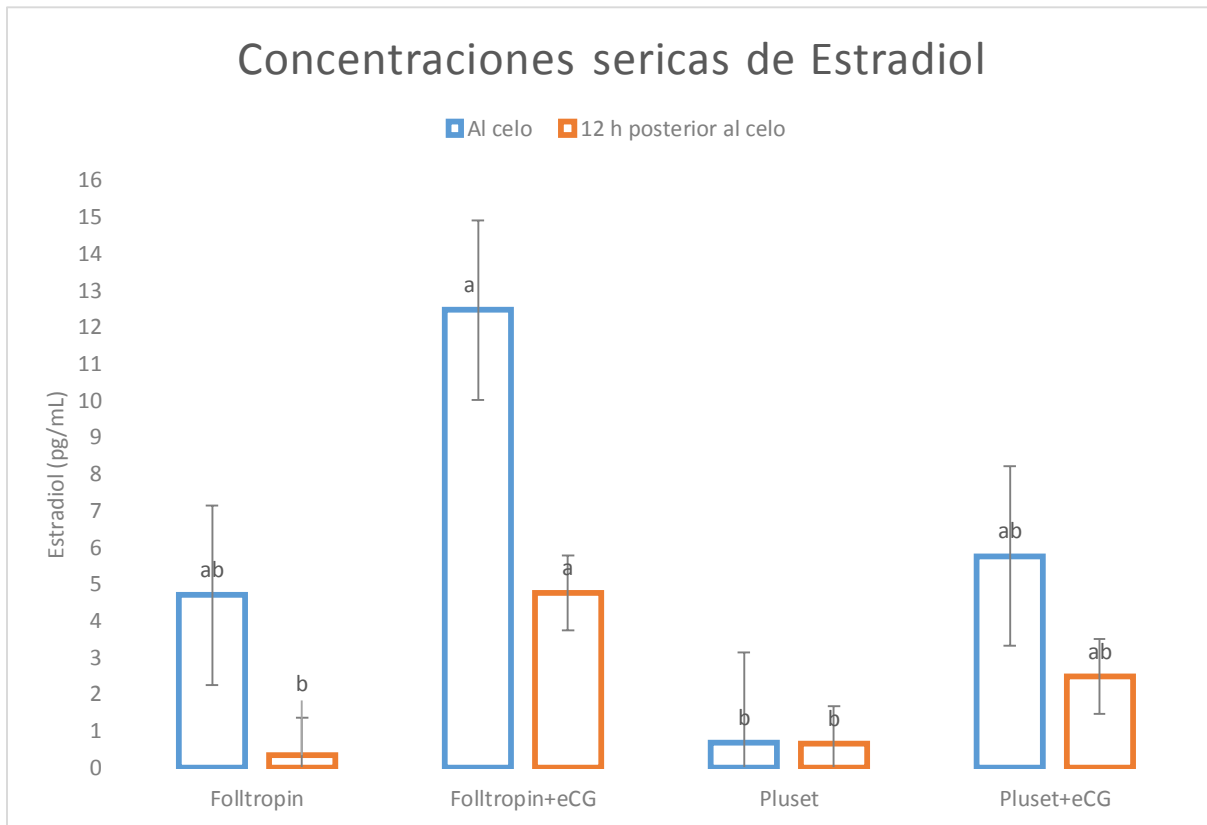
**Cuadro 5.** Embriones transferibles (media  $\pm$  error estándar) en ovejas Pelibuey sometidas a distintos protocolos de ovulación múltiple.

Tratamiento	(n)	Embriones transferibles (ET)
T1 = FSH	6	5.83 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>
T2 = FSH + eCG	6	2.66 $\pm$ 1.17 <sup>b</sup>
T3 = FSH/LH	6	2.33 $\pm$ 1.43 <sup>b</sup>
T4 = FSH/LH + eCG	6	2.83 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>

<sup>a b c</sup>Valores con distinta literal en columna, son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ). T1 = 200 mg de FSH, T2 = 200 mg de FSH + 300 UI de eCG, T3 = 250 UI de FSH/LH y T4 = 250 UI de FSH/LH + 300 UI de eCG.

## 5.6. Análisis hormonal Estradiol (E2)

Las concentraciones de Estradiol al momento del estro y 12 h posteriores, se presentan en la figura 9. Al momento del celo, existen diferencias ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de estradiol en los tratamientos donde se incluye eCG (T2 y T4), en comparación a donde no fue incluida (T1 y T3). Así mismo, se presenta la misma tendencia a las 12 h posteriores donde T2 y T4, muestran diferencia ( $p < 0.05$ ) con respecto a T1 y T3.



**Figura 9.** Concentraciones séricas de Estradiol.

Letras distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



## VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la inclusión de gonadotropina coriónica equina (eCG) en los protocolos de superovulación que se evaluaron, acortó el tiempo a la manifestación externa de estro. Ali (2007) reportó que el tiempo a la manifestación del estro es más corto cuando se aplica eCG, 48 h antes de retirar la esponja, en comparación con la aplicación al momento del retiro. Así mismo, se ha encontrado el mismo efecto cuando se incorpora eCG en diferentes protocolos de superovulación (Jabbour y Evans, 1991; Riesenber *et al.*, 2001; Simonetti *et al.*, 2008; Menchaca *et al.*, 2009). El menor tiempo a la presencia del estro, se relaciona con la mayor concentración de estradiol en sangre, Jabbour y Evans (1991) reportaron que la combinación de FSH más PMSG presenta niveles más elevados de estradiol con respecto a la sola aplicación de FSH, en estos hallazgos se menciona que la eCG tiende a ser más esteroidogénica con respecto a la FSH. Por otra parte, la eCG tiene una vida media más prolongada y esto provoca un reclutamiento continuo de folículos, lo cual resulta en una mayor producción de estradiol, por tal motivo la eCG por si sola induce niveles mayores de estradiol con respecto a la FSH (Jabbour y Evans, 1991), en cabras (Riesenber *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003). Por lo tanto, se concluye que la administración de eCG acorta el tiempo a la presentación del estro, mas sin embargo, en este estudio se presentó una mejor sincronía en el tratamiento 1 donde solo se aplicó FSH.

Los valores de TO del T1: FSH y T2: FSH + 300 UI eCG ( $15.50 \pm 2.83$  y  $15.66 \pm 1.47$ ) fueron mayores en relación con los reportados por Menchaca *et al.* (2009), en ovejas de la raza Merino, en donde aplicaron 240 mg de NIH-FSH-P1 y en combinación de 300 y 200 UI eCG ( $9.9 \pm 0.4$ ,  $11.3 \pm 0.8$  y  $10.7 \pm 0.7$ ), la eCG suministrada al momento del retiro del progestágeno, aunque la respuesta a la TO fue similar entre los tratamientos dentro de cada estudios, la eCG logra tener un ligero aumento, con respecto a solo aplicar FSH. Sin embargo, Jabbour y Evans (1991) trabajando con ovejas de la raza Merino, reportaron valores ligeramente inferiores a los obtenidos en este estudio, y hacen mención de la diferencia que ejerce la eCG al combinarla con FSH, ya que aumenta significativamente en los resultados de TO comparado con el tratamiento donde solo se aplica FSH. En cambio, resultados de los tratamientos T3: FSH/LH y T4 FSH/LH + eCG,

fueron similares a los encontrados por D'Alessandro *et al.* (1996), quienes usaron las mismas dosis de FSH/LH en ovejas de la raza Altamurana ( $8.16 \pm 3.21$  y  $11.83 \pm 2.83$  vs.  $8.0 \pm 1.5$ ). Por otra parte, Aké-López *et al.* (2003) encontraron un ligero aumento en el número de cuerpos lúteos ( $12.41 \pm 8.1$ ), administrando 500 UI de FSH/LH en ovejas pelibuey. Probablemente estas diferencias encontradas con respecto a la tasa ovulatoria, son causadas por el grado de pureza de las gonadotropinas. Por su parte, Gonzalez-Bulnes *et al.* (2000), mencionaron que en los protocolos de superovulación con un alto contenido de LH, disminuye el número de ovulaciones; debido a que gran parte de los folículos que en un principio responden al tratamiento pueden presentar atresia durante su crecimiento o bien no llegan a ovular, esto causado por la suministración de altas concentraciones de LH durante periodos prolongados antes de que ocurra el pico preovulatorio de LH. En los protocolos evaluados en el presente estudio, la aplicación de 300 UI de eCG no marco diferencia dentro de tratamientos. Así mismo, en este presente estudio los resultados obtenidos referentes a la tasa de recuperación, se encuentran muy similares a los reportados por otros autores (Naqvi *et al.*, 2002; Simonetti *et al.*, 2008; Forcada *et al.*, 2011).

En cuanto a la producción de ovocitos no fertilizados, en este estudio, existe un mayor número de ONF en los tratamientos donde se incluyó eCG. En algunos estudios, la mayor cantidad de ONF se ha determinado por la inclusión de eCG en los protocolos para ovulación múltiple, ya que el periodo de vida de la eCG puede provocar el envejecimiento prematuro de los ovocitos antes de la ovulación, lo que resulta en una disminución de la tasa de fertilización. Además, genera el desarrollo de folículos grandes anovulatorios y, por consiguiente, se tendrán mayores concentraciones de estradiol, como sucedió en los tratamientos de este estudio donde se aplicó eCG, las cuales pueden afectar el medio ambiente uterino y, por lo tanto, interferir con la captura de óvulos por la fimbria o con el transporte de los óvulos y espermatozoides a través del tracto genital femenino, lo cual disminuye la respuesta a la superovulación y producción de embriones (Barrett *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2007; Simonetti *et al.*, 2008; Salehi *et al.*, 2010).

En este estudio, los niveles más elevados de estradiol al momento del celo y 12 h después, se presentaron en los tratamientos donde se incluyó eCG, lo cual influye en la

respuesta embrionaria, pues los niveles altos de estradiol afectan el transporte de los gametos, provocando una baja fertilidad (Kumar *et al.*, 2003; Veiga-López *et al.*, 2006; Simonetti *et al.*, 2008; Fuerst *et al.*, 2009); dadas estas aseveraciones, se logran entender los resultados encontrados de este estudio ya que los tratamientos donde se incluyó eCG presentaron el mayor número de ONF (T2 =  $6.33 \pm 2.42$  y T4 =  $2.16 \pm 1.25$ ), con respecto a donde no se incluye (T1 =  $0.83 \pm 0.40$  y T3 =  $1.83 \pm 1.83$ ).

En relación con los embriones transferibles para este estudio, se observó diferencia en el resultado del T1 ( $5.83 \pm 1.13$ ) comparado con todos los demás (T2:  $2.66 \pm 1.17$ ; T3:  $2.33 \pm 1.43$  y T4:  $2.83 \pm 1.50$ ), valor similar al reportado por Aké-López *et al.* (2003;  $6.28 \pm 4.79$ ). Asimismo, Menchaca *et al.* (2009) mostraron similares resultados en ovejas de la raza Merino, para la estimulación ovárica solo con FSH ( $5.2 \pm 0.5$ ), FSH + 200 UI eCG ( $3.4 \pm 0.4$ ) y FSH+300 UI eCG ( $3.0 \pm 0.4$ ). De igual forma, aunque en la especie caprina, Lehloenya (2013) reportó una mejor respuesta al administrar la misma dosis de FSH que la de este estudio en múltiples aplicaciones ( $9.56 \pm 1.19$ ), con respecto a cuándo combina FSH + 350 UI eCG y esta es aplicada en una sola dosis, a un tiempo de 48 h antes de retirar el progestágeno ( $0.22 \pm 0.2$ ). Con esto se demuestra lo antes mencionado y es evidente la superioridad en la respuesta a la ovulación múltiple y calidad embrionaria con solo emplear FSH, ya que la adición de eCG presentó resultados inferiores a los esperados.

## **VI. CONCLUSIONES**

La inclusión de eCG (gonadotropina coriónica equina) en diferentes protocolos de ovulación múltiple con base a la variación de gonadotropinas no mejoró las variables de tasa ovulatoria (TO), ovocitos no fertilizados (ONF) y embriones transferibles (ET), aunque resultó con menor tiempo en horas al inicio del estro. Sin embargo, el tratamiento exclusivo con FSH presentó mayor tasa ovulatoria (TO), menor cantidad de ovocitos no fertilizados (ONF) y un número superior de embriones transferibles (ET), lo que representa una buena alternativa para la ovulación múltiple en ovejas Pelibuey.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abecia, J.A., F. Forcada and A. Gonzalez-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130: 173-179.
- Abecia, J.A., F. Forcada and A. Gonzalez-Bulnes. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 27, 67–79.
- Acritopoulou, S., W. Haresign, J.P. Foster and G.E. Lamming. 1977. Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of an analogue of prostaglandin F-2alpha. *J. Reprod. Fertil.* 49: 337-340.
- Aké-López, J.R., H.M. Aguilar, M. Alfaro-Gamboa, F. Centurión-Castro y C. Rojas-Rodríguez. 2003. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. *Vet. Méx.* 34:225-233.
- Ali, A. 2007. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. *Small Rumin. Res.* 72: 33–37.
- Ammoun, I., T. Encinas, A. Veiga-Lopez, J.M. Ros, I. Contreras, P. Gonzalez-Añover, M.J. Cocero, A.S. McNeilly and A. Gonzalez-Bulnes. 2006. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. *Theriogenology* 66: 896–905.
- Armstrong, D.T. and G. Evans 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.

- Armirisidis, G.S. and S. Cseh. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130: 152-161.
- Arroyo, J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 829-845.
- Baird, T.D. and K.B. Campbell. 1998. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Molecular and cellular Endocrinology* 145: 89-95.
- Bari, F., M. Khalid, W. Haresign, A. Murray and B. Merrell. 2000. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. *Theriogenology*. 53: 727-742.
- Barrell, G.K., M.S. Moenter, A. Caraty and J.F. Karsch. 1992. Seasonal changes of gonadotropin – releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of Reproduction*. 46: 1130-1135.
- Barrett, D.M.W., P.M. Bartlewski, M. Batista-Arteaga, A. Symington and N.C. Rawlings. 2004. Ul-trasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology* 61:311–27.
- Berlinguer, F., A. Gonzalez-Bulnes, S. Succu, G. Leoni, F. Mossa, D. Bebbere, C. Ariznavarreta, J.A.F. Tresguerres, A. Veiga-Lopez and S. Naitana. 2007. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domestic Animal Endocrinology* 32: 303–314.

- Bettencourt, E.M., C.M. Bettencourt, J. Chagas e Silva, P. Ferreira, C.I. Manito, C.M. Matos, R.J. Romão and A. Rocha. 2008. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Rumin. Res.* 74, 134-139.
- Bindon, B.M., L.R. Piper, L.P. Cahill, M.A. Driancourt and T. O'Shea. 1986. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 25, 53-70.
- Catalano, R., M. Teruel, J. Cabodevila and S. Callejas. 2007. Efecto de diferentes dosis de gonadotrofina coriónica equina sobre la respuesta reproductiva de hembras ovinas con un tratamiento para inducción de celos. *InVet.* 9: 1117
- Cameron, A.W., K.M. Battye and A.O. Trounson. 1988. Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. *J. Reprod. Fertil.* 83: 747-752.
- Campbell, B.K., C. Souza, J. Gong, R. Webb, N. Kendall, P. Marsters, G. Robinson, A. Mitchell, E.E. Telfer and D.T. Baird. 2003. Domestic ruminants as models for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction* 61: 429–443.
- Cognié, Y., G. Baril, N. Poulin and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology.* 59:171–188.
- Cognié, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology.* 51: 105-116.
- Cuellar. O.J.A. 2006. La producción ovina en México. Memorias “Primer Semana Nacional de la Ovinocultura,” Tulancingo, Hidalgo, pp 11-15.

- Cruz, L.C., S. Fernández-Baca, L.J.A. Álvarez y R.H. Pérez. 1994. Variaciones estacionales en presentación de ovulación, fertilización y sobrevivencia embrionaria de ovejas Tabasco en el trópico húmedo. *Vet. Méx.* 25: 23-27.
- Chagas e Silva, J., L. Lopes da Costa, R. Cidadao and J. Robalo Silva. 2003. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology* 60: 521-532.
- D'Alessandro, A.G., G. Martemucci, F. Totoda, M. Gambacorta and A. Manchisi. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial pFSH. *Small Ruminant Res.* 19: 255-261.
- Driancourt, M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 35: 55-79.
- Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology.* 55: 1211-1239.
- Demoustier, M.M., J.F. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J.L. Gillard and F. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30, 379-386.
- Evans, A.C.O. 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 289–306.
- Fernández, A.D.H. 1993. .Principios de Fisiología Reproductiva Ovina. Ed. Hemisferio Sur & Universidad de la República. Montevideo. p 247.



- Forcada, F., J.M. Lozano, J.A. Abecia and O. Zúñiga. 2000. Repeated superovulation of high prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high quality embryos. *Livest. Prod. Sci.* 66: 263-269.
- Forcada, M.F., G.A. Casao and M.J. Abecia. 2009. Producción "*in vivo*" de embriones ovinos: implicaciones de I+D. *Pequeños Rumiantes* 10:14-19.
- Forcada, F., M. Ait Amer-Meziane, J.A. Abecia, M.C. Maurel, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, B. Asenjo, M.I. Vázquez and A. Casao. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. *Theriogenology* 75:769–776.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2012). *OECD-FAO agricultural outlook 2012–2021*.
- Fuerst, K.J., P.M. Bartlewski and W.A. King. 2009. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. *Small Ruminant Res.* 82:144–148.
- Franco, O.M.E., C.M. Freitas, F.R. Machado, S.S. Figueirêdo, P.S.J. Pinto, R.F.L. De Souza, F.J. Ferreira and V.R.W. Russiano. 2012. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? *Ciencia Rural, Santa Ma-ria.* 42: 1077-1082.
- García, E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Ed. México. 194 p.

- Gibbons, A.E. y M.I. Cueto. 2013. Manual de Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. 2da Edición 3-12 p. INTA EEA Bariloche. Argentina.
- Gonzalez-Bulnes, A., R.M. Garcia-Garcia, J. Santiago-Moreno, A. López-Sebastian and M.J. Cocero. 2002. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*. 58: 1607-1614.
- Gonzalez-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero and A. López-Sebastian. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 54:1055–1064.
- Gonzalez-Bulnes, A., A. Veiga-Lopez, P. Garcia, R.M. Garcia-Garcia, C. Ariznavarreta, M.A. Sánchez, J.A.F. Tresguerres, M.J. Cocero and J.M. Flores. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63: 2523–2534.
- González-Reyna, A., E. Márquez-García, H. Lizárraga-Tracy and J.C. Martínez-González. 1999. Dose response effects of PMSG on ovulation rate and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncro-mate-B implants. *Small Ruminant Res.* 31: 149-155.
- Goodman, R. L. and E.K. Inskeep. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. in: Jimmy D. Neill (Ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition. Raven Press, New York, New York. 2006: 2389–2447.
- Guzik, A. and H. Niemann. 1995. Superovulation and recovery of zygotes suitable for microinjection in different breeds of sheep. *Anim Reprod Sci.* 40: 215-227.

- Grazul-Bilska, A.T., E. Borowczyk, J.J. Bilski, L.P. Reynolds, D.A. Redmer, J.S. Caton and K.A. Vonnahme. 2012. Overfeeding and underfeeding have detrimental effects on oocyte quality measured by in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*. 43: 289–298.
- Hafez E.S.E., M.R. Jainudeen e Y. Rosnina. 2006. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. *In: Hafez E.S.E. y B. Hafez. Ed. McGraw Hill. Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7th ed. Kiawah Island, South Carolina, USA.
- Jabbour, H.N. and G. Evans. 1991. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Anim Reprod Sci*. 26:93–106.
- Karsch, F.J., J.M. Bowen, A. Caraty, N.P. Evans and S.M. Moenter. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod*. 56: 303-309.
- Kumar, P.S., D. Saravanan, R.C. Rajasundaram, M. Selvaraju and D. Kathiresan. 2003. Serum oestradiol and progesterone profiles and their relationship with superovulatory responses in Tellicherry goats treated with eCG and FSH. *Small Ruminant Res*. 49:69–77.
- Kakar, M.A., S. Maddocks, M.F. Lorimer, D.O. Kleemann, S.R. Rudiger, K.M. Hartwich and S.K. Walker. 2005. The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Theriogenology*. 64: 1090–1103.
- Lehloenya, K.C. 2013. Preliminary results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goats. *Small Ruminant Res*. 113:171– 174.

- Lindsell, C.E., B.D. Murphy and R.J. Mapletoft. 1986. Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26, 209-219.
- López, S.A., M.A. Santiago, G. A. de Bulnes y L.A. García. 1993. Aspectos Característicos de la fisiología reproductiva de la oveja. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. III, No. 2.*
- Martínez, T.J.J., F.F. Izaguirre, O.L. Sánchez, C.C.G. García, P.G. Martínez y H.G. Torres. 2007. Comportamiento reproductivo de ovejas Barbados Barriga Negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. *FCV-LUZ / Vol. XVII, N° 1, 47-52.*
- Martemucci, G, M. Gambacorta, F. Toteda, A. Manchisi and E. Bellitti. 1988. Induzione della superovulazione nella pecora con PMSG, FSH-P, hMG, per il trapianto di embrioni (Superovulation by PMSG, FSH-P, hMG for embryo transfer in ewes). *Zoot. Nutr. Anim.* 15:379–86.
- Martemucci, G., A. D'Alessandro, F. Toteda, A.M. Facciolongo and M. Gambacorta. 1995. Embryo production and endocrine response in ewes superovulated with PMSG, with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. *Theriogenology* 44: 691-703.
- Menchaca, A., M. Vilariño, A. Pinczak, S. Kmaid and J.M. Saldaña. 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72: 477–483.

- Menchaca, A., V. Miller, V. Salveraglio and E. Rubianes. 2007. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 102:76–87.
- Moore, N.W. and L.E.A. Rowson. 1960. Egg transfer in sheep factors affecting the survival and development of transferred eggs. *J. Reprod. Fertil.* 1: 332.
- Montossi, F., M. Font-i-Furnols, M. del Campo, R. San Juliána, C. Brito and R. Sañudo. 2013. Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat Science* 95: 772–789.
- Murphy, B. D. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod.* 9: 223-230.
- McIntosh, J. E., R.M. Moor and W.R. Allen. 1975. Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 44, 95-100.
- Miller, K. F., E. V. Nordheim and O.J. Ginther. 1981. Periodic fluctuations in FSH concentrations during ovine estrous cycle. *Theriogenology* 16: 669-679.
- Navarro, L. y A. Torres. 1985. Duración, frecuencia e incidencia natural del estro en ovejas West African en la mesa de Guanipa. *Zoot. Trop.* 2: 39-49.
- Naqvi, S.M.K., A. Joshi, G.K. Das and J.P. Mittal. 2001. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Res.* 39: 199-208.

- Naqvi, S.M.K., R. Gulyani, Anil Joshi, G.K. Das and J.P. Mittal. 2002. Effect of dietary regimens on ovarian response and embryo production of sheep in tropics. *Small Ruminant Res.* 46: 167–171.
- Nicholas, F.W. 1996. Genetic improvement through technology reproductive. *Anim. Reprod. Scie.* 42: 205-214.
- Picazo, R.A., M.J. Cocero, M.L. Barragan and A.L. Sebastian. 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology.* 45, 1065-1073.
- Picton, H.M. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55: 1193-1210.
- Pope, W.F. and H. Cárdenas. 2004. Sensitivity of sheep to exogenous prostaglandin  $F_{2\alpha}$  early in the estrous cycle. *Small Ruminant Res.* 55: 245–248.
- Riesenberg, S., S. Meinecke-Tillmann and B. Meinecke. 2001. Estradiol-17b and progesterone in the peripheral blood plasma of goats following superovulation with a single dose of pFSH, hMG or eCG. *Small Ruminant Res.* 40:73-82.
- Rubianes, E., A. Menchaca and B. Carbajal. 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *Anim. Reprod. Sci.* 78: 47–55.
- Russel, A.J.F., J.M. Doney and R.G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72:451-454.

- Ryan, J.P., J.R. Hunton and W.M.C. Maxwell. 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 551-560.
- SAS. 2002. JMP. Statistic Visual. Version 9.2. Institute Inc. Campus Drive. Cary. NC 27517.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) – Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca (SIAP), 2014. <http://infosiap.siap.gob.mx>.
- Salehi, R., H. Kohram, A. Towhidi, H.M. Kermani and M. Honarvar. 2010. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. *Small Ruminant Res.* 93: 213–217.
- Simonetti, L., F. Forcada, O.E. Rivera, N. Carou, R.H. Alberio, J.A. Abecia and I. Palacín. 2008. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 227-237.
- Scaramuzzi, R.J., N.R. Adams, D.T. Baird, B.K. Campbell, J.A. Downing, J.K. Findlay, K.M. Henderson, G.B. Martin, K.P. McNatty, A.S. McNeilly and C.G. Tsonis. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 459-478.

- Scaramuzzi, R.J., D.T. Baird, B.K. Campbell, M.A. Driancourt, J. Dupont, J.E. Fortune, R.B. Gilchrist, G.B. Martin, K.P. McNatty, A.S. McNeilly, P. Monget, D. Monniaux, C. Viñoles and R. Webb. 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod, Fertil and Dev.* 23: 444–467.
- Tervit, H.R. and P.G. Havick. 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zealand Vet. J.* 24: 138. (abstr.).
- Trounson, A., C. Anderiesz, G.M. Kaushe and L.N. Wood. 1998. Oocyte maturation. *Human Reprod.* 3: 52-62.
- Uribe-Velásquez, L. F., A. Correa-Orozco y H.J. Osorio. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud, Volumen 8*, págs. 117 – 131.
- Vegetti, W. and F. Alagna. 2006. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol 12. No 6. 684–694; [www.rbmonline.com/Article/2155](http://www.rbmonline.com/Article/2155).
- Veiga-Lopez, A., A. Gonzalez-Bulnes, J.A.F. Tresguerres, V. Domínguez, C. Ariznavarreta and M.J. Cocero. 2006. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domes. Anim. Endocrinol.* 30: 76–87.
- Walker, S.K., D.H. Smith and R.F. Seamark. 1986. Timing of multiple ovulation in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J. Reprod. Fertil.* 77: 135-142.



Warwick, B.L., R.O. Berry and W.R. Horlachwer. 1934. Results of mating rams to Angora females goats. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 225 (abstr.).

Webb, R., B. Nicholas, J.G. Gong, B.K. Campbell, C.G. Gutiérrez, H.A. Garverick and D.G. Armstrong. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. Reproduction 61: 71-90.

Winterberger-Torres, S. and C. Sevellec. 1987. Atlas of the Early Development of Sheep Embryos. INRA, Paris.