



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**“ADICIÓN DE AGONISTAS DE GNRH
EN LA RESPUESTA EMBRIONARIA Y EL
COSTO DE PRODUCCIÓN EN LA
OVULACIÓN MÚLTIPLE DE OVEJAS
PELIBUEY”**

FERNANDO ROMERO SANTILLAN

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: **"ADICIÓN DE AGONISTAS DE GNRH EN LA RESPUESTA EMBRIONARIA Y EL COSTO DE PRODUCCIÓN EN LA OVULACIÓN MÚLTIPLE DE OVEJAS PELIBUEY"** realizada por el alumno: FERNANDO ROMERO SANTILLÁN, 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

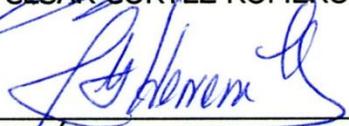
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. CÉSAR CORTÉZ ROMERO

ASESOR



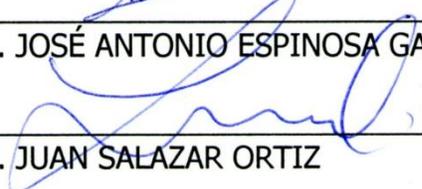
DR. JOSÉ GUADALUPE HERRERA HARO

ASESOR



DR. JOSÉ ANTONIO ESPINOSA GARCÍA

ASESOR



DR. JUAN SALAZAR ORTIZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

“ADICIÓN DE AGONISTAS DE GNRH EN LA RESPUESTA EMBRIONARIA Y EL COSTO DE PRODUCCIÓN EN LA OVULACIÓN MÚLTIPLE DE OVEJAS PELIBUEY”

Romero Santillán Fernando, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

Se realizaron dos experimentos para evaluar la adición de agonistas de GnRH en protocolos de ovulación múltiple, con la medición de niveles de LH, respuesta embrionaria y costo de producción, usando inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). En el experimento 1 se asignaron tres tratamientos con seis ovejas cada uno, para un total de 18 hembras; se usó CIDR por 9 días y aplicación de PGF_{2α} el día 7, a partir del día 6 se inició el tratamiento de ovulación múltiple con FSHp en ocho dosis decrecientes cada 12 h. Se aplicó agonistas de GnRH 24 h posteriores al retiro de CIDR (Triptorelina, Gonadorelina) y Testigo, las hembras se inseminaron por IATF a las 36 y 48 h. Se tomaron muestras de sangre cada 4 h a partir del retiro de CIDR por 72 h para determinar niveles de LH. La Triptorelina indujo el pico preovulatorio a la 28 h post retiro CIDR, encontrando diferencias entre el pico de LH comparando Triptorelina y el grupo testigo ($P < 0.05$). Además, hubo diferencias ($P < 0.05$) en el número de embriones calidad 1 y transferibles con Triptorelina (3.75 ± 0.62 y 6.00 ± 1.47 , respectivamente) comparado con Gonadorelina (1.00 ± 0.54 y 2.6 ± 0.81 , respectivamente); la adición de Triptorelina tiene efecto en la liberación de LH, favoreciendo el número de embriones calidad 1 y transferibles. En el experimento 2 se usaron 24 hembras distribuidas en cuatro grupos, se aplicó un protocolo de sincronización de celos y ovulación múltiple con CIDR, FSH+ PGF_{2α} similares al aplicado en el experimento 1, los tratamientos se dividieron por el uso de monta natural (MN) o de la IATF, así como de la adición de Triptorelina (TRIP) quedando de la siguiente manera, FSH-MN, FSH-IATF, FSH-TRIP-MN Y FSH-TRIP-IATF. Las ovejas del grupo MN se inseminaron al inicio de celo y dos montas posteriores en un intervalo de 6 h, las ovejas del grupo restante mediante laparoscopia con semen fresco a las 36 y 48 h. La adición de Triptorelina aumentó la tasa ovulatoria entre los tratamientos FSH-MN y FSH-TRIP-MN ($P < 0.05$) y entre FSH-MN y FSH-TRIP-IATF ($P < 0.05$). El costo de un embrión es más bajo con la adición de TRIP y el uso de IATF. La adición de TRIP y la IATF es una alternativa en programas de mejoramiento genético de ovejas Pelibuey.

Palabra clave: Triptorelina, ovulación, laparoscopia, costo embrión, Pelibuey.

"GNRH AGONISTS ADDITION IN EMBRYONIC RESPONSE AND THE PRODUCTION COST IN MULTIPLE OVULATION IN PELIBUEY EWE"

Romero Santillán Fernando, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

Two experiments to evaluate the addition of GnRH agonist in multiple ovulation protocols, levels of LH, embryonic response and the production cost with artificial insemination at fixed time (AIFT) were done. In Experiment 1 three treatments with six sheep each were assigned, for a total of 18 females; CIDR was used for 9 days and PGF_{2α} was applied on day 7, from the 6th day, the multiple ovulation treatment with FSHp began in eight decreasing doses every 12 h. GnRH agonists was applied 24 h after CIDR removal (Triptorelin, Gonadorelin) and Control, the females were artificially inseminated at fixed time (AIFT) at 36 and 48 h. Blood samples were taken every 4 h since CIDR removal for 72 h to determine levels of LH. The Triptorelin induced the preovulatory peak at 28 h after CIDR removal, finding differences between the LH peak comparing Triptorelin and the control group ($P < 0.05$). In addition, there were differences ($P < 0.05$) in the number of embryos quality 1 and transferable with Triptorelin (3.75 ± 0.62 and 6.00 ± 1.47 , respectively) compared to Gonadorelin (1.00 ± 0.54 and 2.6 ± 0.81 , respectively); the addition of Triptorelin has effect on LH release, favoring the number of embryos quality 1 and transferables. In experiment 2, 24 females were used and divided into four groups, a synchronization estrus protocol and multiple ovulation with CIDR, FSH+ PGF_{2α} was applied similar to that used in experiment 1, the treatments were divided by the use of natural mating (NM) or AIFT, and also with the addition of Triptorelin (TRIP) remaining as follows, FSH-NM, FSH-AIFT, FSH-TRIP-NM Y FSH-TRIP-AIFT. The NM sheep group was inseminated at the beginning of estrus and two more matings in an interval of 6 h, sheep from the remaining group were inseminated using laparoscopy with fresh semen at 36 and 48 h. The addition of Triptorelin increased the ovulation rate between FSH-NM and FSH-TRIP-NM ($P < 0.05$) and between FSH-NM and FSH-TRIP-AIFT ($P < 0.05$). The cost of an embryo is lower with the addition of TRIP and the use of AIFT. The addition of TRIP and the AIFT is an alternative in genetic improvement programs of Pelibuey sheep.

Keyword: Triptorelin, ovulation, laparoscopy, embryo cost, Pelibuey.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por brindarme la oportunidad y el apoyo para la realización de los estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por darme la oportunidad de realizar los estudios de maestría.

A la línea de investigación 5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal (LPI5); así como, a los Campus Córdoba y San Luis Potosí por el recurso aportado para la realización de la presente investigación.

Al Dr. César Cortez Romero, gracias por su incondicional apoyo y disponibilidad para la organización, dirección y realización del presente trabajo. Por su confianza y amistad.

Al Dr. José Guadalupe Herrera Haro, por su apoyo en la revisión de la presente, por sus valiosos comentarios para la mejora de este documento.

Al Dr. José Antonio Espinosa García, por su contribución para la realización del presente estudio, comentarios y sugerencias al documento y sobre todo por su amistad y confianza.

Al Dr. Juan Salazar Ortiz por las facilidades otorgadas para la realización de la fase de campo, por los comentarios y observaciones a esta investigación, por su amistad y confianza.

A la MVZ Clara Murcia Mejía de la UNAM, por su apoyo en el análisis de laboratorio de LH.

A todas aquellas personas que apoyaron en la fase de campo, gracias por su apoyo y amistad, en especial a M.C. Francisco Cruz E. y Dr. José Antonio Hernández M.

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la oportunidad de llegar a esta etapa de mi vida y lograr una meta mas.

A MI FAMILIA

A mi esposa Ana Areli, por su amor, apoyo incondicional y comprensión, gracias por estar a mi lado. A mis hijos, Marco Antonio, Fernando y Eduardo, gracias por darle felicidad a mi vida, fuente de inspiración para seguir adelante, gracias hijos por todos los bellos momentos que hemos vivido y lo que nos queda por vivir.

A mis hermanos, por la unión familiar que hemos mantenido a lo largo de los años, por su invaluable apoyo, muchas gracias.

A mi tía Rosa, gracias por todo el cariño y apoyo incondicional que me has brindado a lo largo de mi vida, gracias tía.

A mi cuñado, por su amistad, confianza y apoyo, gracias por todo.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	- 1 -
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 2 -
2.1. Objetivo General	- 3 -
2.2. Hipótesis planteada	- 3 -
III. REVISION DE LITERATURA	- 4 -
3.1. Ciclo Estral	- 4 -
3.2. Control hormonal del ciclo estral	- 6 -
3.3. Dinámica folicular	- 8 -
3.3.1. Reclutamiento	- 9 -
3.3.2. Selección	- 10 -
3.3.3. Dominancia	- 10 -
3.4. Tratamiento de sincronización de celos	- 11 -
3.4.1. Progesterona	- 12 -
3.4.2. Prostaglandinas	- 13 -
3.5. Tratamientos de ovulación múltiple	- 14 -
3.5.1. FSH	- 15 -
3.5.2. eCG	- 16 -
3.6. Agonistas de GnRH	- 16 -
3.7. Fertilización	- 18 -
3.7.1. Monta natural (MN)	- 19 -
3.7.2. Inseminación artificial (IA)	- 20 -
3.7.2.1. Cervical o Pericervical	- 20 -
3.7.2.2. Transcervical	- 21 -
3.7.2.3. Intrauterina por laparoscopia	- 21 -
3.8. Literatura citada	- 23 -
IV. EXPERIMENTO 1. ADICIÓN DE AGONISTA DE GnRH EN NIVELES DE LH Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN OVEJAS PELIBUEY	- 32 -
4.1. Resumen	- 32 -
4.2. Introducción	- 33 -
4.3. Materiales y métodos	- 34 -
4.3.1. Animales	- 34 -
4.3.2. Sincronización de celo	- 35 -
4.3.3. Inducción de ovulación múltiple	- 35 -

4.3.4. Aplicación de agonistas de GnRH.....	35 -
4.3.5. Detección de celos y empadre.....	36 -
4.3.6. Colección de embriones	36 -
4.3.7. Perfil hormonal de LH.....	37 -
4.3.8. Análisis estadístico	38 -
4.4. Resultados.....	39 -
4.4.1. Concentración hormonal de LH.....	39 -
4.4.2. Comportamiento estral	40 -
4.4.3. Respuesta a la ovulación múltiple	40 -
4.5. Discusión	42 -
4.6. Conclusión	45 -
4.7. Referencias.....	46 -
V. EXPERIMENTO 2. ADICION DE TRIPTORELINA E INSEMINACION ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN RESPUESTA EMBRIONARIA Y COSTO DE PRODUCCIÓN EN OVEJAS PELIBUEY.....	50 -
5.1. Resumen.....	50 -
5.2. Introducción	51 -
5.3. Materiales y métodos.	52 -
5.3.1. Animales	52 -
5.3.2. Sincronización de celo.....	53 -
5.3.3. Inducción de ovulación múltiple	53 -
5.3.4. Tratamientos	53 -
5.3.5. Detección de celos e inseminación	54 -
5.3.6. Colección de embriones	54 -
5.3.7. Análisis estadístico	56 -
5.3.8. Determinación de costo de producción	56 -
5.4. Resultados.....	57 -
5.4.1. Comportamiento estral	57 -
5.4.2. Respuesta a la ovulación múltiple	57 -
5.4.3. Costo de producción.....	59 -
5.5. Discusión	60 -
5.6. Conclusión	63 -
5.7. Referencias.....	64 -
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	67 -

6.1. Conclusiones	- 67 -
6.2. Recomendaciones	- 67 -
ANEXOS	- 68 -
Anexo 1. Secuencia gráfica del proceso de inseminación y proceso quirúrgico de la colecta de embriones	- 68 -
Anexo 2. Costo de material, hormonales y medicamentos empleados en tratamientos de IATF por laparoscopia	- 73 -
Anexo 3. Costo de material, hormonales y medicamentos empleados en tratamientos de MN...-	75 -

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Respuesta a la adición de agonistas de GnRH en la ovulación múltiple de ovejas Pelibuey con IATF - 41 -

Cuadro 2. Respuesta a la adición de GnRH y tipo de inseminación en la ovulación múltiple de ovejas Pelibuey - 58 -

Cuadro 3. Costo de producción por embrión, con la adición de GnRH y tipo de inseminación en ovejas Pelibuey - 60 -

Lista de Figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos en agonistas de GnRH..... - 18 -

Figura 2. Valores medios en el perfil hormonal de LH - 39 -

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La aplicación de la transferencia de embriones (TE) a nivel comercial está limitada por varios factores como: el costo elevado de la técnica, bajos índices de respuesta a la ovulación y de producción de corderos en relación al número de embriones colectados (Neves, 1989). El éxito en los programas de TE es variado, debido a la gran variabilidad en la respuesta de la aplicación de protocolos de ovulación múltiple; sin embargo, se han explorado varias alternativas en combinación de hormonas con la finalidad de evaluar el potencial de la técnica y producir una gran cantidad de embriones transferibles.

La mayoría de los protocolos de ovulación múltiple se basa en el uso de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), debido a la menor variabilidad de sus resultados en comparación a otras gonadotropinas; sin embargo, aún existe diferencia en la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados. Con la finalidad de reducir estas variables se han buscado alternativas para mejorar la sincronía de la ovulación, aumentar la tasa de fertilización y la producción de embriones a través de la adición de agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).

Otra alternativa que se ha empleado es la inseminación artificial vía intrauterina a tiempo fijo con la finalidad de evitar la barrera cervical y la dificultad de los espermatozoides para atravesarla, ya que en protocolos hormonales de sincronización estral y ovulación múltiple el problema de transporte se incrementa.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los programas de mejoramiento genético se basan principalmente en la multiplicación de animales superiores genéticamente, una de las más empleadas es la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE). Sin embargo, a pesar del gran avance en la aplicación de estas dos herramientas en los ovinos, el desarrollo ha sido lento, derivado de la gran variabilidad que existe en la respuesta del ovario a los programas de ovulación múltiple (Cognie, 1999), causada por factores intrínsecos y extrínsecos (González-Bulnes *et al.*, 2004).

Muchos de los factores que afectan la respuesta han tratado de ser minimizados o eliminados, pero la respuesta a la aplicación de las gonadotropinas sigue siendo variable por la diferencia en la respuesta folicular, la regresión temprana del cuerpo lúteo y deficiencias en la fertilización del ovocito (Menchaca *et al.*, 2009b).

Walker *et al.*, (1986) mencionan que existen ovulaciones prematuras y diferencias en el momento de ovulación entre las ovejas; lo anterior es debido a variables como el inicio de estro, el pico de la hormona luteinizante (LH) y el momento de la ovulación que afectan la respuesta ovulatoria y embrionaria (Veiga-López *et al.*, 2008). Lo antes mencionado tiene efecto en la tasa de fertilización y el número de embriones obtenidos, los cuales deben ser controlados cuando se desea emplear la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) como método de fecundación. Los agonistas de GnRH se han usado como alternativas para reducir el tiempo en el inicio de la ovulación, mejorar la sincronía de las ovulaciones e incrementar la tasa ovulatoria (Azawi y Al-Mola, 2011).

2.1. Objetivo General

Evaluar los niveles de LH, la respuesta embrionaria y estimar el costo de producción de un embrión con la adición de agonistas de GnRH e inseminación artificial a tiempo fijo en protocolos de ovulación múltiple basados en la estimulación ovárica con la hormona folículo estimulante (FSH).

2.2. Hipótesis planteada

La adición de agonistas de GnRH y la inseminación artificial a tiempo fijo, en protocolos de ovulación múltiple con FSH, mejora la respuesta ovárica, el número de embriones transferibles y el costo de producción de un embrión.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1. Ciclo Estral

La oveja es considerada un rumiante poliéstrico estacional con un patrón reproductivo diferenciado en dos épocas; una reproductiva, en la cual se manifiesta la conducta sexual (celo, aceptación de monta) y ovulación de forma cíclica y, la otra es el anestro, etapa en la cual no hay conducta sexual ni ovulación. La estación reproductiva de la oveja consiste en una serie de ciclos estrales que inician por lo general en verano o principio de otoño y finalizan al terminar el invierno o inicios de la primavera (Abecia *et al.*, 2012). Las variaciones estacionales están contraladas por dos mecanismos principales: el ritmo anual circanual y los cambios de la duración del día y su captación por parte del sistema nervioso central (Karsch *et al.*, 1989).

El ciclo estral es definido como el tiempo transcurrido entre dos celos con receptividad sexual por parte de la hembra y asociado con la ovulación y la liberación de óvulos en capacidad de ser fecundados (Galina *et al.*, 1986). El ciclo tiene una duración de 16 a 18 días con promedio de 17, en corderas tiene un promedio de 16.8 y de 17.2 en ovejas adultas (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009), caracterizado por dos fases: una lútea que va del día 2 al 13 y una folicular, la cual comprende desde el día 14 al día 1 (Rubianes, 2000). El ciclo está relacionado con hormonas hipotalámicas, gonadotropinas y esteroides y regulado por mecanismos de tipo endocrino y neuroendocrino (Hafez y Hafez, 2002).

La fase lútea tiene una duración de 12 a 14 días, comprende dos etapas: a) metaestro que es la fase que le sigue a la ovulación y se genera lo que es el cuerpo lúteo (Keyes *et al.*, 1983); b) diestro el cual ocurre a partir del día 5-7, durante este fase el cuerpo lúteo es funcional, secreta altas cantidades de progesterona (P4), si hay fecundación del ovulo este cuerpo lúteo permanece durante

toda la gestación, en caso contrario sufre una lisis alrededor del día 12 e inicia una fase folicular (Fernández Abella, 1993).

La fase folicular con una duración de 3 a 4 días, está caracterizado por la disminución de la retroalimentación negativa del estradiol y el aumento en los pulsos de LH (Kinder *et al.*, 1995), comprende las etapas de proestro y estro. La primera tiene una duración de 2 a 5 días a partir de la regresión lútea, esta etapa comprende la emergencia y desarrollo de los folículos (Fernández Abella, 1993), da inicio cuando la concentración de progesterona disminuye por niveles debajo de los 1 ng mL^{-1} como parte de la luteolisis provocada por la prostaglandina uterina; posterior a esta caída de P4 aumenta la concentración de LH y FSH, las cuales promueven el crecimiento folicular y la liberación de estradiol por parte de los folículos en la corriente sanguínea (Caraty y Skinner, 1999). El aumento en la concentración de estradiol da origen una serie de eventos neuroendocrinos que dan por finalizados con el pulso preovulatorio de LH (Evans *et al.*, 1997).

La etapa de estro o celo tiene una variación en la duración y va de 20 hasta 48 h (Lindsay, 1991), sin embargo este periodo puede variar de acuerdo a la raza y tasa de ovulación, alimentación, época, edad y contacto con los machos (Bindon *et al.*, 1979). La secreción de progesterona en la fase lútea tiene efecto durante el ciclo estral, ejerce un *priming* sobre el cerebro ejerciendo un incremento en la concentración de estrógenos lo que dará lugar al comportamiento del estro (Rubianes, 2000). La ovulación es espontánea y ocurre al final del estro, alrededor de las 24 a 30 h después de iniciado (Hafez y Hafez, 2000), cuando existen ovulaciones múltiples se dan horas posteriores a la primera ovulación (Lindsay, 1991).

3.2. Control hormonal del ciclo estral

Los ovinos presentan una estacionalidad reproductiva como parte de un proceso de adaptación para reducir los efectos de los cambios anuales de temperatura y la disponibilidad de alimento, este patrón estacional es regulado por el fotoperiodo (Karsch, *et al.*, 1984).

Todos los procesos relacionados en las dos fases, lútea y folicular son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis, los cuales interactúan con los ovarios y el útero mediante la secreción de hormonas. A nivel hipotálamo-hipófisis es liberado al sistema porta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), esta hormona ejerce acción a nivel de la hipófisis y regula la producción de la LH y FSH (Goodman y Karsch, 1980). Estas gonadotropinas actúan en el ovario e inducen la liberación de estradiol (E2) y progesterona (P4) y, estas a su vez, mediante el mecanismo de retroalimentación regulan la liberación de las gonadotropinas.

En la fase lútea se da el proceso llamado luteinización, a partir del pico preovulatorio de LH se desarrolla un proceso mediante el cual se desarrolla el CL posterior al folículo preovulatorio (Baird, 1992). La formación de un CL da inicio a la secreción a los dos días de una cantidad importante de P4, la cantidad de esta hormona sirve como indicador de la funcionalidad del cuerpo lúteo (Rosell Pardo *et al.*, 2004). Las concentraciones máximas de P4 se detectan en los días 10 a 12 y se mantienen alrededor de los días 13-14 (Stellflug *et al.*, 1997). El aumento en las concentraciones de P4 da origen a una reducción en la frecuencia y amplitud del pulso de LH (McNeilly y Fraser, 1987), esta hormona presenta un patrón pulsátil en la secreción que impide el desarrollo folicular y, por lo tanto la ovulación (Goodman y Karsch, 1980; Karsch *et al.*, 1984).

Con el descenso de la concentración de P4 se favorece la secreción tónica de LH, aumentando la frecuencia de los pulsos progresivamente, este aumento estimula la secreción de E2 por parte de

los folículos que se encuentran en la etapa de maduración, este aumento progresivo estimula la secreción hormonal y da origen a las descargas preovulatorias de GnRH/LH (Barrell *et al.*, 1992; Gallegos-Sánchez *et al.*, 1999). El aumento de E2 estimula en el endometrio la síntesis de receptores para oxitocina y la producción de enzimas involucradas en la síntesis de PGF2 α (Silvia *et al.*, 1991; Beard y Lamming, 1994).

Cuando los niveles de P4 son altos, se inhibe la formación de receptores para E2 y, este a su vez la síntesis de receptores de oxitocina; este efecto inhibitorio de la P4 finaliza después de un periodo de exposición del útero a esta hormona debido a que se vuelve refractario a la P4 por el agotamiento de sus propios receptores, provocando con ello así que la P4 ya no pueda inhibir receptores de E2; por lo tanto, el E2 estimula la formación de receptores de oxitocina y ocurre la secreción de PGF2 α (Vallet *et al.*, 1990). La secreción de PGF2 α continúa hasta la regresión del cuerpo lúteo dando origen a lo que se le conoce como luteólisis. En este proceso de la luteólisis y la disminución casi total en los niveles de P4, la inhibición de la producción de GnRH finaliza y de inicio al incremento de los pulsos de esta hormona y las gonadotropinas (Goodman y Karsch, 1980).

Las gonadotropinas FSH y LH son reguladas a partir de la GnRH que es la principal señal neuroendocrina (Bauer-Dantoin *et al.*, 1995), la concentración de FSH incrementa en forma de ondas foliculares, en la ovejas se han detectado tres ondas a los días 0, 6 y 11 del ciclo (Viñoles *et al.*, 2000). La función principal de la FSH es el crecimiento y maduración de los folículos y ovocitos, además de mantener la secreción de los estrógenos e inducir la aparición de receptores de LH en los folículos. Durante el pico preovulatorio de LH, hay un pico de FSH, un segundo pico de esta hormona se da entre las 18 y 24 h después del primero; sin embargo, de menor intensidad al primero (Salamonsen *et al.*, 1973). La secreción de FSH está afectada por la retroalimentación negativa del E2, pero el factor más importante es la inhibina folicular mediante un mecanismo de

retroalimentación negativa a nivel hipofisario para la inhibición de la secreción de la FSH (Baird *et al.*, 1991). Bajo el estímulo de la FSH ocurre un crecimiento de folículos, así mismo se lleva a cabo la expresión de receptores de LH, este incremento da lugar al incremento de los pulsos de LH estimulando el crecimiento folicular y, posteriormente la ovulación de los folículos preovulatorios (Gordon, 1997). El FSH es importante para el mantenimiento en la función del ovario y necesario en el crecimiento folicular, la concentración puede llegar a ser un factor limitante en la maduración folicular (Saraiva *et al.*, 2010). La variación en la concentración a lo largo del ciclo estral está relacionado con el crecimiento folicular, el aumento transitorio de FSH es uno de los factores que desencadena la emergencia de una onda folicular (Evans, 2003a).

Durante el crecimiento de los folículos existe producción de estrógeno, siendo mayor en cuanto avanza el desarrollo y el tamaño de los folículos, en la fase final del crecimiento folicular el aumento en la concentración de E2 estimula el hipotálamo y se libera un gran cantidad de GnRH, dando lugar a un pico preovulatorio de LH, la cual desencadena la ovulación 18-24 h después, la misma concentración elevada de E2 induce el inicio de estro (Gordon, 1997).

3.3. Dinámica folicular

La formación, crecimiento y desarrollo de folículos se lleva a cabo a través del proceso llamado foliculogénesis, este proceso envuelve una relación compleja de eventos entre el sistema nervioso central y el ovario (Fabre *et al.*, 2006), inicia desde la vida embrionaria de la oveja, la cual al nacer cuenta con un *pool* de folículos primordiales que iniciaran su etapa de crecimiento a lo largo de la vida reproductiva, estos ovocitos presentes no tiene zona pelúcida y se encuentran formados por una sola capa de células de la pregranulosa, conformando así los folículos primordiales (Picazo y López, 1995), un ovario de la oveja pre-púber contiene entre 40,000 a 300,000 folículos

primordiales (Scaramuzzi *et al.*, 1993), esta cantidad no se renueva y durante la vida del animal hasta llegar a la ovulación se desarrollan en folículos primarios, secundarios y terciarios (Evans, 2003b).

El crecimiento de los folículos primordiales a preantrales y a la ovulación va de meses a semanas (Driancourt, 2001), el tiempo en una oveja adulta para que un folículo llegue hasta la ovulación es de aproximadamente 6 meses (Cahill, 1981). Los folículos que entran a una etapa de crecimiento tienen dos alternativas, entrar a un proceso degenerativo llamado atresia o la ovulación, más del 99% de los folículos en el ovario sufren atresia (Hsueh *et al.*, 1994).

Cuando inicia la pubertad y hasta finalizar la vida reproductiva de la oveja los folículos antrales que abandonan la reserva continúan el desarrollo bajo la influencia de las gonadotropinas lo que da origen a que dependan de ellas (Eppig, 2001), este desarrollo folicular gobernado por las gonadotropinas ocurre de manera cíclica y organizada, llamadas “ondas foliculares (Evans, 2003b).

Fisiológicamente en una onda folicular se presentan tres eventos: reclutamiento, selección y dominancia (Ginther *et al.*, 1996),

3.3.1. Reclutamiento

El reclutamiento es el inicio de una onda folicular, marcada por el crecimiento sincronizado de pequeños folículos (Menchaca y Rubianes, 2002), es el crecimiento de folículos que se han convertido en dependientes de gonadotropinas (Driancourt, 2001), un grupo limitado de folículos antrales son capaces de responder al incremento de la FSH para continuar con su crecimiento (Driancourt y Fri, 1988). La FSH es clave en el inicio de esta etapa, la concentración debe ser mínima y estable en el mismo animal a lo largo de un tiempo (Brown, 1978), modula la liberación

de células de la granulosa y estimula la formación del antro, comenzando la actividad de la aromatasa, el tamaño de los folículos para ser reclutados es de 2 mm (Driancourt, 2001).

3.3.2. Selección

Durante esta fase el folículo dominante crece a una tasa elevada y el resto de los folículos subordinados se desarrollan a una tasa menor, para posteriormente detener su crecimiento; se considera que el folículo dominante es el seleccionado para ovular (Ginther *et al.*, 1997), caracterizado por la diferencia de tamaño con relación al resto, los cuales se consideran subordinados y retroceden en presencia del dominante (Evans, 2003b). El crecimiento diferenciado que se mencionó anteriormente se le llama desviación (Ginther *et al.*, 1997). El folículo seleccionado al alcanzar un tamaño aproximado de 4 mm desarrolla receptores a la LH en las células de la granulosa (Driancourt, 2001). Los mecanismos por los cuales es seleccionado el folículo es incierto; sin embargo, pueden estar involucrados factores endocrinos, en los ovinos el folículo que es seleccionado presenta cantidad y calidad de células de la granulosa y capacidad de estas de dividirse o diferenciarse en receptores para gonadotropinas (Driancourt *et al.*, 1985).

El proceso de selección consta de dos etapas, una pasiva en donde el folículo dominante reduce los niveles basales de FSH y LH por la acción de la inhibina y E2, lo que provoca la limitación de gonadotropinas a los folículos subordinados en una etapa crítica de su desarrollo y, una etapa activa, donde el folículo que ha sido seleccionado inhibe el crecimiento de los folículos menores por la secreción de otras sustancias (Driancourt, 1991).

3.3.3. Dominancia

En la etapa de dominancia se lleva a cabo el crecimiento final del folículo preovulatorio y su maduración hasta la ovulación en esta misma etapa los folículos subordinados sufren atresia

(Hunter *et al.*, 2004). Puede haber aparición de nuevos folículos en crecimiento, el cual puede estar disminuido y, posteriormente, inhibido su desarrollo (González-Bulnes *et al.*, 2004).

Los folículos dominantes en cada una de las ondas foliculares no solo siguen creciendo, además se diferencian por su función como parte de la preparación para la ovulación y la posible gestación de la hembra (Fortune, 1994). La dominancia del folículo es determinada por la diferencia en tamaño con los folículos subordinados, la cual es de 2 a 3 mm (Driancourt, 2001).

En el momento que un folículo dominante es ovulado o sufre atresia deja de ejercer la dominancia y permite con ello la emergencia de una nueva oleada folicular (Menchaca y Rubianes, 2012), en ovejas lo más frecuente es observar 3 ondas de desarrollo folicular, con n diferencias en relación al número de ondas foliculares durante un ciclo, o incluso entre la misma hembra, estas ondas emergen a los 0, 6 y 11 del ciclo sexual (Viñoles *et al.*, 2000). La emergencia de las ondas foliculares presenta una estrecha relación con la FSH, un aumento en las concentraciones de esta hormona precede a la emergencia de cada onda seguido por el descenso de esta misma hormona y negativamente correlacionado con las concentraciones de E2 producido por el folículo dominante de la onda folicular (Baird *et al.*, 1991).

3.4. Tratamiento de sincronización de celos

La sincronización de celos es uno de las primeras acciones en la ovulación múltiple, esto es con la finalidad de tener control en la ovulación de la oveja, conocer de manera predeterminada el momento de la ovulación permite saber el momento más oportuno para iniciar el tratamiento de ovulación múltiple y la fecundación de la oveja donante (Neves, 1989). Los tratamientos permiten inducir y sincronizar el momento del inicio del estro y sincronizar el momento de la ovulación en hembras anéstricas (Uribe *et al.*, 2008).

Los programas de sincronización de celos se basan principalmente en la simulación de aquellos eventos que ocurren de manera natural en la oveja y que regulan el ciclo sexual, están enfocados a manipular la fase lútea o folicular; por tener mayor duración, la fase lútea es más fácil de manipular en las ovejas, además de tener mejor respuesta (Wildeus, 2000). Deben inducir la atresia de folículos grandes, fomentar el desarrollo de una nueva oleada folicular, sincronizar el desarrollo de un nuevo folículo dominante y la ovulación en un periodo predecible (Driancourt, 2001)

Los métodos más empleados en la inducción y/o sincronización del celo son aquellos que se basan en el uso de P4, progestágenos y prostaglandinas (Uribe, *et al.*, 2008).

3.4.1. Progesterona

El uso de la progesterona o sus análogos, tiene por objetivo simular la fase lútea del ciclo sexual, simulando la acción natural de la progesterona que se produce en el cuerpo lúteo después de la ovulación, controlando la secreción de LH (Hansel y Convey, 1983).

Comercialmente los métodos empleados son las esponjas de poliuretano impregnadas con progestágenos, acetato de medroxiprogesterona (MAP) y acetato de fluorogestona (FGA), y los CIDR impregnados con progesterona natural; son insertados intravaginalmente por un periodo entre los 12 y 14 días, la respuesta a estro ocurre aproximadamente a las 48 h después del retiro, estos tratamientos pueden incluir la aplicación de eCG en dosis variadas de acuerdo a la edad del animal, estación y la raza (Abecia *et al.*, 2011).

La reducción de los tratamientos a periodos de 5 a 9 días has sido empleados como alternativas en periodo de anestro y durante la estación reproductiva (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Knights *et al.*, 2001; Viñoles *et al.*, 2001), debido a que los tratamientos largos, de 12 a 14 días, puede presentar resultados con un número elevado de animales en estro, pero fertilidad más baja comparado con

animales de estro natural (Menchaca y Rubianes, 2004). Además de lo anterior, puede ocurrir una baja concentración de progesterona al final del tratamiento afectando el patrón de liberación de la LH provocando alteraciones en el crecimiento folicular, la calidad de los ovocitos que ovulan, el proceso de fecundación y el transporte y sobrevivencia de los espermatozoides (Bari *et al.*, 2000; González- Bulnes *et al.*, 2005; Uribe-Velázquez *et al.*, 2009).

3.4.2. Prostaglandinas

El uso de prostaglandinas (PGF2 α) es un método alternativo en el control de la reproducción de ovejas mediante la eliminación del cuerpo lúteo por medio de la luteólisis, lo que conduce a la inducción de una fase folicular seguida de la ovulación; sin embargo, la desventaja del uso de las PGF2 α es que debe ser aplicada cuando esté presente un cuerpo lúteo activo y sensible a PGF2 α exógenas (Abecia *et al.*, 2012), sensibilidad que se da a partir del día 3 del ciclo estral (Rubianes *et al.*, 2003). Derivado de esta sensibilidad del cuerpo lúteo, los animales en anestro y aquellos que se encuentran en una etapa temprana o tardía de la fase lútea o folicular no tendrán respuesta al tratamiento, por tal motivo es necesaria la aplicación de dos dosis de PGF2 α entre 9-10 días de diferencia (Abecia *et al.*, 2012).

Otra desventaja con el uso de PGF2 α es el porcentaje de fertilidad obtenido, comparado con el uso de progestágenos y con estro natural, esto puede ser derivado a que el protocolo de dos aplicaciones en un intervalo de 9-10 días, hay presencia de un cuerpo lúteo con la segunda aplicación y que altera la funcionalidad y la maduración final de los folículos preovulatorios (Abecia *et al.*, 2012). Por su parte, Fierro *et al.* (2013) mencionan que la refractariedad del cuerpo lúteo a la dosis de PGF2 α ocurre después del día 2 post ovulación, por lo tanto, es necesario aplicar altas dosis para promover la luteólisis durante la fase temprana lútea.

En los tratamientos de sincronización de celos, la combinación de progestágenos con prostaglandinas, surgió como una posibilidad para acortar el tiempo de tratamiento del progestágeno, de 18 a 11 días; una manera de reducir dicho periodo es la eliminación del cuerpo lúteo mediante la administración de PGF2 α , esta aplicación se realiza dos días antes de retirado el progestágeno, este protocolo puede modificarse con la inserción de la esponja o CIDR por un periodo de 9 días y la inyección de PGF2 α el día 7 (Abecia *et al.*, 2011). Los análogos sintéticos de prostaglandina más comunes que se emplean son Cloprostenol, Delprostenate y Luprostiol (Abecia *et al.*, 2011; Fierro *et al.*, 2013).

3.5. Tratamientos de ovulación múltiple

Un tratamiento de ovulación múltiple tiene como objetivo que la aplicación de gonadotropina incremente el número de folículos y que estos lleguen a la ovulación y sean fertilizados, ya que del número de embriones transferibles depende el éxito de un programa de ovulación múltiple. Para esto, el principio de un protocolo de ovulación múltiple es lograr mantener concentraciones altas de FSH para lograr ovulaciones múltiples (Fonseca *et al.*, 2008). El incremento de la tasa ovulatoria es derivado de la combinación de varios factores, entre ellos, el reclutamiento de folículos más pequeños y la disminución del tamaño de los folículos preovulatorios (Driancourt, 2001). Lo anterior se ha logrado mediante la aplicación de gonadotropinas.

La gonadotropinas exógenas más comúnmente empleadas en los tratamientos de ovulación múltiple son la FSH y la eCG, las cuales tienen variaciones en el número de aplicaciones y dosis usadas, respuesta en la tasa ovulatoria obtenida y el número de embriones que se recuperan (Oliveira, 2011)

3.5.1. FSH

La FSH es una glucoproteína que se produce en las células gonadotrofas de la adenohipófisis, posee un bajo contenido de ácido siálico, lo que hace que la vida media de esta hormona en la circulación sanguínea sea de 3 a 5 h (Laster, 1972). En los protocolos de ovulación múltiple para obtener un creciente continuo y la sobrevivencia de un número elevado de pequeños y medianos folículos, es necesario mantener una cantidad elevada de FSH y constante, por lo cual la aplicación de múltiples inyecciones de FSH es el tratamiento hormonal con mayor ventaja en la ovulación múltiple (Cueto *et al.*, 2011).

Debido a la vida media de la FSH, la administración de esta hormona debe ser frecuente, debe ser administrada dos veces al día en lapsos que pueden ir desde los 2 hasta los 4 días (Chagas e Silva *et al.*, 2003; D'Alessandro *et al.*, 2005; Bettencourt *et al.*, 2008); así mismo, la administración de dosis decrecientes incrementa el número de folículos preovulatorios sensibles a la gonadotropinas y la posterior ovulación (González-Bulnes *et al.*, 2002).

Los productos comerciales de FSH se comportan de manera diferente incluso entre la misma marca, la vida media de las preparaciones son muy variables (Phillips *et al.*, 1993); la pureza de presente en los productos es factor que puede afectar los resultados de respuesta ovárica, calidad embrionaria y tasa de fertilización, debido a la cantidad de LH, la variabilidad por lote (Wu *et al.*, 2011). Un contenido de LH menor al 10 % es la más ideal, debido a que la relación FSH:LH es crítica en el desarrollo preovulatorio de los folículos y la posterior ovulación (Boscos *et al.*, 2002; D'Alessandro *et al.*, 2005).

La FSH puede ser extraída por medio de orina de mujeres en la post menopausia (gonadotropina menopáusica humana, hMG), FSH urinaria altamente purificada (FSHu), de extracto de hipófisis

de animales (Cerdos FSHp; ovejas FSHo) y por medio de DNA recombinante (FSHr), en reproducción animal los productos comerciales comúnmente usados son Folltropin®, Pluset®, Ovagen® y Stimulfoll® (Magalhães *et al.*, 2009).

3.5.2. eCG

La eCG (Gonadotropina Coriónica Equina) o también denominada PMSG (Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada) es una gonadotropina que se produce naturalmente por las capas endometriales de la yegua gestante en el periodo de 40 a 120 días (Allen y Moor, 1972). La vida media de esta hormona es larga (72 h), lo que, a altas dosis empleadas para producir la ovulación múltiple tiene efectos negativos en relación a la liberación de hormonas esteroides y las tasas de ovulación (Evans y Robinson, 1980). Las cantidades elevadas de estradiol pueden interferir modificando el ambiente del útero, comprometen la captación de los ovocitos por las fimbrias y el transporte de los embriones a lo largo del tracto reproductivo de la hembra (Evans y Robinson, 1980; Cownie, 1999) también se han reportado el desarrollo de quiste foliculares (Viñoles *et al.*, 2001) y la producción de anticuerpos anti-eCG en ovejas (Maurel *et al.*, 2003). Otro de los factores que ponen en desventaja a la eCG es por estimula un crecimiento folicular en un tiempo más largo y provocando con esto que el periodo de ovulación tenga menos sincronización entre las hembras en tratamiento (Cameron *et al.*, 1988).

3.6. Agonistas de GnRH

La GnRH es un decapeptido que se sintetiza en los cuerpos celulares de las neuronas hipotalámicas y secretado directamente a la circulación por el sistema porta hipofisario, estimula las células gonadotropas de la adenohipófisis activando la secreción de FSH y LH (Conn y Crowley, 1991).

En la etapa reproductiva de los rumiantes su actividad es importante para una función reproductiva exitosa, la oleada de GnRH tiene un papel determinante en la inducción de la oleada de LH, para provocar esta oleada deberá darse un incremento repentino de GnRH, la magnitud de la oleada de LH tiene una relación dosis-respuesta significativa con el tamaño de la oleada de LH (Karsch *et al.*, 1997). Las fluctuaciones en la liberación de la GnRH dan origen a una reproducción normal; sin embargo, altos niveles pueden dar origen a una supresión en la liberación de las gonadotropinas. Considerando estas alteraciones se han estudiado los receptores de la GnRH para desarrollar tratamientos que resuelvan los problemas reproductivos (Conn y Crowley, 1994) y mejorar la reproducción, por lo que ha dado origen al desarrollo de análogos sintético o agonistas de la GnRH para manipular la reproducción (Douglas, 1998).

El diseño de los agonistas ha sido con la finalidad de estabilizar la molécula contra la degradación de las enzimas, aumentar la unión a las proteínas y las membranas, y mejorar la afinidad con el receptor (Conn y Crowley, 1994). En el caso de la GnRH natural, la degradación se produce en el aminoácido Gly, posición 6 de la cadena; por lo cual, los agonistas han sido modificados a este nivel y se caracterizan por la presencia de un D-aminoácido en esta posición, o la sustitución de la Gly-amina en la posición 10 por una etilamina (Tabla 1). Estas modificaciones hace que los agonistas sean sustancias más potentes, aumenten la unión de la proteína con el receptor y aumente la vida media en la circulación (Ortmann *et al.*, 2002).

Los agonistas que se emplean comúnmente en el manejo reproductivo en animales domésticos están: Gonadorelina (GnRH natural), Buserelina, Cistorelina, Acetato de Fertirelina, Licerelina (Thatcher *et al.*, 1993); en el caso de ovinos se han empleado en esquemas de sincronización de celos y ovulación múltiple para mejorar la sincronía de la ovulación, aumentar la tasa de

fertilización y mejorar la cantidad y calidad de los embriones (Gonzales Bulnes *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2009b; Azawi y Al-Mola, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2012).

Sin embargo, existen otros agonistas de GnRH que se emplean con mayor frecuencia en tratamientos reproductivos en humanos y que han sido poco explorados su efecto en animales domésticos, como es el caso de Deslorelina, Goserelina, Histrelina, Nafarelina y Triptorelina (Lahlou *et al.*, 2000).

En particular, la Triptorelina se ha empleado principalmente para uso humano, su estructura esta diferenciada de la Gonadorelina por la sustitución del aminoácido glicina por el D-triptófano en la posición 6 (Figura 1). Se ha evaluado su aplicación para bloquear la secreción de FSH en ovejitas prepúberes (Recabarren *et al.*, 2006). Este análogo de GnRH en otros estudios *in vitro* se reporta que tiene una liberación de LH hasta de 100 veces más que la GnRH natural (Lahlou *et al.*, 2000).

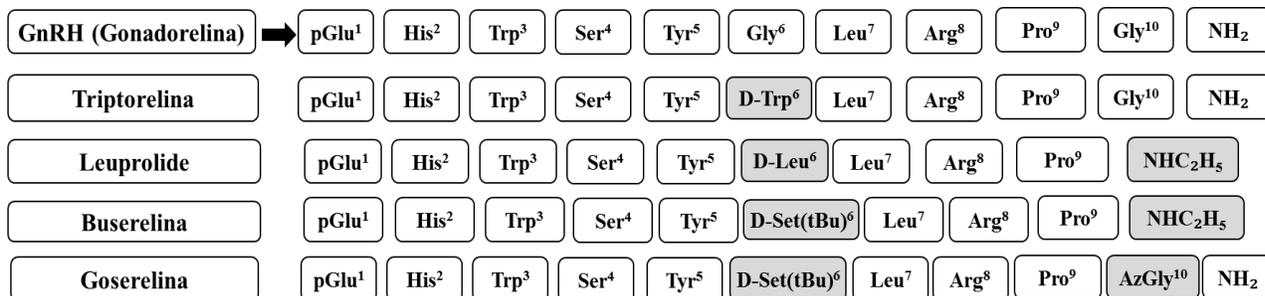


Figura 1. Secuencia de aminoácidos en agonistas de GnRH. Modificado de Ortmann *et al.* (2002).

3.7. Fertilización

En los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones (OMTE) la fecundación de las hembras puede ser por monta natural (MN) o por inseminación artificial (IA), el uso de alguna de ellas dependerá de varios factores entre ellos el sistema de producción donde será aplicada, la necesidad de introducir animales genéticamente superiores y cuya disponibilidad sea únicamente

vía semen. Sin embargo, el más importante es la necesidad de obtener resultados satisfactorios en la fertilización de las hembras destinadas como donadoras.

3.7.1. Monta natural (MN)

En esquemas de ovulación múltiple y transferencia de embriones, los resultados en tasas de fertilización con monta natural son variados y, por lo tanto, la variabilidad en relación a la producción de embriones puede ser asociado a estas fallas de fertilización (Cognie *et al.*, 2003).

Este fenómeno de la baja fertilidad con monta natural puede ser afectado por factores relacionados al transporte espermático dentro de la cavidad uterina, la captación de los ovocitos por las fimbrias en las hembras superestimuladas, grandes cantidades de estrógenos que se producen por los folículos anovulatorios o la maduración anormal de los ovocitos que llegan a ser inviábiles para ser fertilizados (Naqvi *et al.*, 2000).

La fertilidad puede estar comprometida por los tratamientos hormonales relacionados con la ovulación múltiple (Bari *et al.*, 2000), la progesterona que se emplea en la sincronización de celos más la adición de gonadotropinas en altas dosis tienen un efecto de interferencia en el transporte de los espermatozoides a lo largo del cérvix cuando las ovejas se empadran por MN, lo que trae como consecuencia una disminución en la tasa de fertilización (Hawk *et al.*, 1987). La tasa de fertilización en protocolo de ovulación múltiple con monta natural son menores comparados con inseminación artificial por laparoscopia, 75% vs 82% respectivamente (Bari *et al.*, 2000). Por otra parte, Azawi y Al-Mola (2011) reportan tasa de fertilización de 91.5% con inseminación por laparoscopia y 44.8% con monta natural. En MN es recomendable que el semental sea introducido con las hembras al inicio del celo y cada 12 h a partir de ese momento dando tres montas por hembra (Cordeiro *etl al.*, 2003).

3.7.2. Inseminación artificial (IA)

La inseminación artificial es una de las biotecnologías de reproducción, consiste en la introducción del semen en el tracto genital de la hembra mediante medios artificiales, sin que se produzca la monta o coito, presenta varias ventajas con respecto a la MN, entre ellas es intensificar el uso masivo de reproductores genéticamente superiores, aumenta el número de hembras que pueden ser cubiertas con el mismo semental (Duran del Campo, 1980). Existen varios métodos de inseminación, cervical o pericervical, transcervical e intrauterina por laparoscopia, los cuales difieren por la complejidad y expectativa de cada una de ellas y el momento apropiado para realizar cada una de ellas considerando el tiempo de ovulación y el periodo de vida fértil del ovocito, que es de 12 a 24 h (Evans y Maxwell, 1987).

3.7.2.1. Cervical o Pericervical

La inseminación cervical puede llevarse a cabo mediante una pistola de inseminación multidosis, la oveja se coloca inclinada con la cabeza hacia abajo, con los cuartos traseros levantados y montados sobre un riel, se introduce un vaginoscopio hasta el fondo de la vaina y se localiza la entrada del útero (cérvix), se introduce la pistola de inseminación y se guía hasta la entrada del orificio uterino y mediante suaves movimientos es introducida hasta que se obtenga resistencia (Gibbons y Cueto, 1995). Las bajas tasas de fertilidad en esta técnica se deben principalmente al tipo de semen empleado y el recorrido del semen a lo largo del cérvix y la reducida viabilidad en el tracto genital (Neves, 1989), se han reportado resultados entre 10-30 % (Maxwell y Hewitt, 1986).

3.7.2.2. Transcervical

Esta inseminación es limitada por la anatomía del cérvix, las ovejas son colocadas en una camilla que permite su inmovilización en posición reclinada y dorsal, se introduce un vaginoscopio que permite la localización del cérvix y por medio de un fórceps se fija, con ayuda de este se retrae hacia arriba lo que facilita la introducción de una pipeta de inseminación en el canal cervical y hacia el lumen del útero, mediante esta técnica se puede trasponer el cérvix en un 80-90 % de las hembras pero con una fertilidad muy variable (19-53 %) que depende de la experiencia del técnico (Gibbons y Cueto, 1995). Dependiendo el sitio de deposición del semen los resultados de fertilidad pueden mejorar. Núñez *et al.* (2000) reportan porcentajes de gestación de 55, 58 y 64 %, con semen congelado y depositando el semen en entrada de cérvix, mitad del cérvix y en el útero, respectivamente.

3.7.2.3. Intrauterina por laparoscopia

Esta técnica surgió de la necesidad de obtener niveles de fertilidad altos al utilizar semen fresco o congelado, el semen con esta técnica se deposita directamente en los cuernos uterinos con la ayuda de un laparoscopio (Killen y Caffery, 1982); se ha reconocido como el método más efectivo para mejorar la fertilidad en la inseminación de ovejas (Salomon y Maxwell, 2000).

Para llevar a cabo el procedimiento de inseminación artificial por laparoscopia las ovejas deben mantenerse sin alimento y agua durante 24 h, se colocan en una camilla en posición decúbito dorsal y con una inclinación de 45° y se realiza una limpieza y desinfección de la piel en la región abdominal. Se insertan los trocares y cánulas a 7-10 cm en la región ventral de la ubre y a 5-10 cm de la línea media. Por el trocar de 7 mm se inserta la cánula que está conectada al CO₂ y se insufla para distender el abdomen y evitar riesgo de lesiones en los órganos. Posteriormente se

inserta el siguiente trocar de 5 mm por donde se coloca la pistola de inseminación con el áspic de inseminación y, una vez localizados los cuernos uterinos se lleva a cabo la inseminación mediante la inyección y depósito del semen en el tercio medio y en dorsal del cuerno uterino, se deposita la mitad de semen en cada uno de los cuernos uterinos. Posterior al depósito del semen se retira la pistola de inseminación, el laparoscopio y las cánulas. Finalmente, se aplica una solución desinfectante y antibiótico a cada animal (Gibbons y Cueto, 1995). La inseminación artificial por laparoscopia en hembras superovuladas deberá realizarse de 36 a 48 h con semen fresco y de 44 a 48 h con semen congelado (Evans y Maxwell, 1987).

En protocolos de ovulación múltiple y producción de embriones, esta técnica ha sido empleada y comparada con monta natural, se reportan tasas de fertilización del 82 % con inseminación artificial por laparoscopia contra 75 % con monta natural en protocolos de superovulación con FSH (Bari *et al.*, 2000).

Adicional a la inseminación por laparoscopia, se puede emplear inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), tiene un impacto en el costo-eficiencia por reducir el trabajo en la detección de celos y en algunos rebaños comerciales no es factible su detección, ya que requiere de una o hasta tres veces al día. Sin embargo, para la aplicación de esta alternativa debe contarse con tratamientos enfocados a la sincronización de celo y el tiempo de ovulación de las hembras (Menchaca y Rubianes, 2004). Los resultados exitosos con la aplicación de la IATF son relacionados principalmente con el tiempo en que se realiza la IATF posterior al retiro de progestágeno y este varía de acuerdo al tipo de semen empleado, el tipo de progestágeno y la gonadotropina empleada en combinación con el progestágeno (Fukui *et al.*, 1993).

3.8. Literatura citada

- Abecia, J. A., F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet Clin Food Anim Pract* 27:67-79.
- Abecia, J.A., F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130:173-179, 2012.
- Allen, W.R., and R.M. Moor. 1972. The origin of the equine endometrial cups. *J. Reprod. Fertil* 2: 313-316.
- Azawi, O.I., and M.K. Al-Mola. 2011. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. *Trop Anim Health Prod* 43: 1351–1355.
- Baird, D.T., 1992. Luteotropic control of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci* 28:95-102.
- Baird D.T., B.K. Campbell, G.E Mann, and A.S. Mc Neilly. 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil* 43:125-138.
- 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 GK, S. M. Moenter, A. Caraty, F.J. Karsch. 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol. Reprod* 46:1130-1135.
- Bauer-Dantoin, A. C., J. Weiss, and J.L. Jameson. 1995. Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* 136:1014-1019.
- Beard, A.P. and G.E. Lamming, 1994. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin induced PGF₂alpha release in ewes. *J Reprod Fertil* 100, 469-475.
- Bettencourt, E. M.; C. M. Bettencourt, J.C. Silva, P. Ferreira, C. I. Manito, C.M. Matos, R. J. Romão, A. Rocha. 2008. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Ruminant Res* 74:134 – 139.

- Bindon, B. M., M. R. Blanc, J. Pelletier, M. Terqui, M., and J. Thimonier. 1979. Periovulatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J Reprod Fertil* 55: 15-25.
- Boscós, C.M., F.C. Samartizi, S. Dellis, A. Rogge, A. Stefanakis, and E. Krambovitis. 2002. Use of progestagen-gonadotropin treatments of sheep. *Theriogenology* 58:1261-1272.
- Brown, J.B., 1978. Pituitary control of ovarian function. Concepts derived from gonadotropin therapy. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 18:47-54.
- Cahill, L. P. 1981. Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *J Reprod Fertil Suppl.* 30:135-142.
- Cameron A.,W., K. M. Battye, and O. A. Trounson. 1988. Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. *J. Reprod. Fertil.* 83: 747-752.
- Caraty, A., and D. C. Skinner. 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. *Endocrinol*, 140:165-170.
- Cavalcanti ADS, Brandão FZ, Nogueira LAG, Fonseca JFD. 2012. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 41: 1412-1418
- Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Cidadão R, Robalo Silva J. 2003. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology* 60: 521–532.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51: 105-116.
- Conn, PM, and W.F Crowley. 1991. Gonadotropin releasing hormone and its analogs. *New Engl J Med* 324:93–103.
- Conn, D, P. M., and W. F. Crowley. 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 45:391-405.
- Cordeiro, M. F., J. B. Lima-Verde, E. S. Lopes-Júnior, D. I. A. Teixeira, L. N. Farias, H. O. Salles, and V.J.F. Freitas. 2003. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Res* 49:19-23.
- Cueto, M. I.; A. E. Gibbons, F. Pereyra-Bonnet, P. Silvestre, A. González-Bulnes. 2011. Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in Merinos maintained under field conditions. *Reprod Domest Anim* 46:770 - 775.

- D'Alessandro, A.G., G. Martemucci, and L. Taibi. 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology* 63:1764-1774.
- Douglas, W. S. 1998. Use of GnRH to enhance pregnancy rates and shorten the postpartum interestus interval in dairy cattle. *Ohio Vet. Newsletter*, 25: 4-6.
- Driancourt MA. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*. 35:55-68.
- Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55:1211-1239.
- Driancourt M.A., W.R. Gibson, and L.P. Cahill. 1985. Follicular dynamics through the oestrus cycle in sheep. A review. *Reprod Nutr Develop* 25:1-15
- Driancourt, M.A., and R.C. Fry. 1988. Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.* 66(Suppl. 2): 9-20
- Durán del Campo A. 1980. Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo. Ed. Hemisferio Sur. 264 p.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829-838.
- Evans, A.C.O. 2003a. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 78:289-306.
- Evans A.C.O. 2003b. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reprod Domest Anim* 38:240-246.
- Evans, G., and J. T. Robinson 1980. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J Agric Sci* 94: 69-88.
- Evans, A.C.O., and W.M.C. Maxwell. 1987. Salomon's artificial insemination of sheep and goats. 1. ed. Sydney: Butterworths. 194 p.
- Evans, N. P., G. E. Dahl, V. Padmanabhan, L. A., Thruns, and F. J. Karsh. 1997. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: Implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138:5408-5414.

- Fabre S, A. Pierre, P. Mulsant, L. Bodin, E. Di Pasquale, and L. Persani. 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol.* 4:20-31.
- Fernández Abella, D., 1993. Principios de fisiología reproductiva ovina. Universidad de la República, pp. 247.
- Fierro, S., J. Gil, C. Viñoles, and J. Olivera-Muzante. 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology*, 79:399-408.
- Fonseca, J. F., J. M. G. de Souza, and J.H. Bruschi. 2008. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. Nota técnica (ALICE). Embrapa Caprinos e Ovinos.
- Fortune, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50: 225-232.
- Fukui, Y., H. Hirai, K. Honda, and K. Hayashi. 1993. Lambing Rates by Fixed-Time Intrauterine Insemination with Frozen Semen in Seasonally Anestrous Ewes Treated with a Progestogen-Impregnated Sponge or CIDR® Device. *J Reprod Dev* 39:1-5.
- Galina, H.C., C. A. Saltiel, M.J. Valencia, A.J. Becerril, C.G. Bustamante, Y. Calderon, B. A. Duchateau, B. S. Fernández, B. A. Olguín, M. R. Páramo, y L.Q. Zarco, 1986. En: Reproducción de animales domésticos. Ed. Limusa, México, pp. 348-358.
- Gallegos-Sánchez J, Hernández PP, Albarrán A (1999) Neuroendocrinología del ciclo reproductivo de la oveja. En Memorias del curso internacional en fisiología de la reproducción en rumiantes. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. pp. 1-26
- Gibbons, A., y M. Cueto. 1995. Manual de Inseminación Artificial en la Especie Ovina. INTA Bariloche. Pp, 281
- Ginther, O.J., M. C. Wiltbank, F.M. Friche, J.R. Gibbons, and K. Kot. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55:1187-1194.
- Ginther, O.J., K. Kot, L.J. Kulic, and M. C. Wiltbank. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48:75-87.
- González-Bulnes, A.; R.M. García-García, C.J.H. Souza, J. Santiago Moreno, A. López-Sebastián, M.J. Cocero, and D.T. Baird. 2002. Patterns of Follicular Growth in Superovulated Sheep and Influence on Endocrine and Ovarian Response. *Reprod Domest Anim* 37:357–361.

- González-Bulnes A., D.T. Baird., B. K. Campbell., J.M. Cocero, M. R. García-García, K.E. Inskoop, A. López-Sebastián, S. A. McNeilly, J. Santiago-Moreno, J.H.C. Souza, A. Veiga-López. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev* 16:421–435
- González-Bulnes, A., A. Veiga-López, P. García, R. M. García-García, C. Ariznavarreta, M.A. Sánchez, and J.M. Flores, J. M. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63:2523-2534.
- Goodman, R.L., and Karsch, F.J., 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone.: Differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 107:1286-1292.
- Gordon, I. 1997. *Controlled reproduction in sheep and goats*. Cab International. Pp. 475
- Hafez, E. S. E., y B. Hafez. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª Ed. McGraw Hill Interamericana editors
- Hansel, W., and E. M. Convey. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci* 57:404-424.
- Hawk, H. W., B. S. Cooper, and H. H. Conley. 1987. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology* 28:139-153.
- Hsueh, A.J., H. Billig, and A. Tsafiriri. 1994. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15:707-724.
- Hunter, M.G., H. Hudson, M. Mitchell, R. Walker, R. Webb. 2004. Resumption of follicle growth in gilts after ovarian autografting. *Anim Reprod Sci* 80:317-328.
- Karsch, F.J., E.L. Bittman, D.L. Foster, R.L. Goodman, S.J. Legan, J.E. Robinson. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec Prog Horm Res* 40:185-225.
- Karsch, F. J., J. E. Robinson, C. Woodfill, and M. B. Brown. 1989. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod* 41:1034-1046.
- 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.
- Keyes, P.L., J.E. Gadsby, K.C. Yuh, C.H. Bill. 1983. The corpus luteum. *Int Rev Physiol* 27:57-97.
- Killen, I. D., and G. J. Caffery. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Aust. Vet. J.*, 59:95-95.

- Kinder, J.E., E.G Bergfeld, M. E. Wehrman, K. E. Peters, F. N. Kojima. 1995. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J. Reprod Fertil Suppl* 49:393-407.
- Knights, M., T. Hoehn, P. E. Lewis, and E. K. Inskeep. 2001. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewes. *J. Anim. Sci* 79:1120-1131.
- Lahlou N, Carel JC, Chaussain JL, Roger M. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 13 (Suppl 1):723-738
- Laster, D. B. 1972. Disappearance and uptake of [125I] FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil* 30:407-415.
- Lindsay, D.R. Reproduction in the Sheep and Goat. 1991. In : CUPPS, P.T. Reproduction domestic animals. 4 ed. San Diego: Academic Press. p.491-515.
- Magalhães, D. M., D. D. Fernandes, V.R. Araujo, A.P. Almeida, M. H. T Matos, and J. R. Figueiredo. 2009. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. *Rev Bras Reprod Anim* 33:171-182.
- Maurel, M.C., F. Roy, V. Hervé, J. Bertin, D. Vaiman, E. Cribuu, E. Manfredi, F. Bouvier, I. Lantier, P. Boue, F. Guillou. 2003. Immune response to equine chorionic gonadotrophin used for the induction of ovulation in goats and ewes. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 31:766-769.
- Maxwell, W. M. C., and L. J. Hewitt. 1986. A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination in sheep. *J Agric Sci* 106:191-193.
- McNeilly, A.S., and H.M Fraser. 1987. Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocrinol* 115:273-282, 1987.
- Menchaca, A., and E. Rubianes. 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58:1713-1721.
- Menchaca, A., and E. Rubianes. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16:403-413.
- Menchaca, A. y E. Rubianes. 2012. Avances en el control ovárico en la oveja. *Memorias Reunión Bianual sobre Reproducción Animal. Estado de México.* 76-83 pp.

- Menchaca DA, Vilariño M, Crispo M, De Castro T, Rubianes E. 2009a. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 22:113–118.
- Menchaca, A., Vilariño, M., Pinczak, A., Kmaid, S., & Saldaña, J. M. 2009b. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, 72: 477-483.
- Naqvi, S. M., R. Gulyani, S.R. Pareek. 2000. Effect of superovulatory regimens on ovarian response and embryo production in fine wool sheep in tropics. *Asian Australasian J Anim Sci* 13:595-599.
- Neves, J.P. 1989. Transferência de embriões em ovinos. *Theriogenology* 31:721-730.
- Núñez, H. E. Y., S. R. Rangel, S. C. Apodaca, R. Rodríguez de Lara, M. J. G. García, O. J. Ayala, y M. J. Armendáriz. 2000. Inseminación transcervical en ovejas Suffolk. XXVIII Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal. Tapachula, Chiapas. 111-114.
- Oliveira, M.E.F. 2011. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Sci Vet* 39 Suppl 1:29-35.
- Ortmann, O., J. M., Weiss, and K. Diedrich. 2002. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. *Reproductive Biomedicine Online* 5:1-7.
- Phillips, D.J., Hudson, N.L., Lun, S., Condell, L.A., McNatty, K.P., 1993. Biopotency in vitro and metabolic clearance rates of five pituitary preparations of follicle stimulating hormone. *Reprod Fertil Dev* 5, 181-190.
- Picazo, A.R., y S. A. López, S.A., 1995. Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Producción y Sanidad Animal* 10:77-93.
- Rangel, S.R. 1997. Técnicas de inseminación. Memorias del curso Inseminación Artificial
- Recabarren SE, Muñoz P, Lobos A, Vilches C, Paril J. 2006. Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Arch Med Vet* 38: 39-46
- Rosell Pardo, R., R. Llorente Villa, A. Ramírez Rubio, M. Verdecia, E. Hernández Torres, 2004. Regulación neuroendocrina del ciclo estral en los animales domésticos. *Revista Electrónica de Veterinaria* 5: 7.
- Rubianes, E., A. Menchaca, and B. Carbajal. 2003. Response of the 1–5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . *Anim. Reprod. Sci* 78:47–55.

- Rubianes, E. 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología*, 6:93-103
- Salamon, S., and W.M.C Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77–111.
- Salamonsen, L.A., H. A. Jonas, H. G. Burger, J.M. Buckmaster, W. A. Chamley, I. A. Cumming, J. K. Findlay, and J. R. Goding. 1973. A heterologous radioimmunoassay for folliculo-stimulating hormone: application to measurement of FSH in the ovine estrous cycle and in several other species including man. *Endocrinology* 93:610-618.
- Saraiva, M. V. A.; M. H. T. Matos, L.R. Faustino, J. J. H. Celestino, J. R. V. Silva, and V. Figueiredo. 2010. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. *Rev Bras Reprod Anim.* 34:206 - 221.
- Scaramuzzi, R. J., N. R. Adams, D. T. Baird, B. K. Campbell, J. A. Downing, J.K. Findlay, 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.
- Silvia, W.J., G.S. Lewis, J. A. McCracken., W.W. Thatcher, and L. Wilson. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2alfa during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod* 45, 655-663.
- Stellflug, J.N., Y.S. Weems, C.W. Weems. 1997. Clinical reproductive physiology of ewes. *Current therapy in large animal. Theriogenology* 86: 594-598.
- Thatcher, W. W., M. Drost, J.D. Savio, K. L., Macmillan, K. W. Entwistle, E.J. Schmitt, and G. R. Morris. 1993. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim Reprod Sci* 33:27-49.
- Uribe-Velásquez LF, E. Oba, and M. I. L. Souza. 2008. Follicular population and progesterone (P4) plasma concentrations in sheep under different synchronization protocols. *Arch Med Vet* 40:83-88.
- Uribe-Velásquez, L.F., R. Restrepo, and J.H. Osorio. 2009. Respostas foliculares e endócrinas em ovelhas após sincronização do estro usando progesterona, prostaglandinas (PGF2 α) e gonadotrofinas. *Veterinária y Zootecnia.* 3:14-27.
- Vallet, J.L., G.E. Lamming, M. Batten. 1990. Control of endometrial oxytocin receptors and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J Reprod Fertil* 90:625-634.
- Veiga-López A, V Domínguez, C. J. Souza, R.M. García-García, C. Ariznavarreta, J.A. Tresguerres, A.S. McNeilly, and A. González-Bulnes. 2008. Features of follicle-stimulating

hormone stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles. *Fertil Steril* 89:1328-1337.

Viñoles C., M. Forsberg, G. Banchero, and E. Rubianes. 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*. 55:993-1004.

Viñoles, C., M. Forsberg, and E. Rubianes. 2000. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. *Proc. of the 14th International Congress on Animal Reproduction* 1: 26.

Walker, S. K., D. H. Smith, and R.F. Seamark. 1986. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J Reprod Fertil* 77:135-142.

Wildeus, S. 2000. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim. Sci* 77:1-14.

Wu, W. Hanikezi, M. Yang, P. Gong, F. Wang, Y. Tian, X. Xu, X. Fu, Haqikezi, K. Tian, and Z. Guo. 2011. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. *Afr J Biotechnol* 10:15834-15837.

IV. EXPERIMENTO 1. ADICIÓN DE AGONISTA DE GnRH EN NIVELES DE LH Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN OVEJAS PELIBUEY

4.1. Resumen

Se evaluó la adición de agonista de GnRH en niveles de LH y la producción embrionaria en protocolos de ovulación múltiple. Se utilizaron dieciocho (18) ovejas Pelibuey, las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en tres tratamientos y sincronizadas con CIDR durante 9 días, con la aplicación de PGF_{2α} en el día 7. A partir del día seis, se inició el tratamiento de ovulación múltiple con FSHp en 8 dosis decrecientes cada 12 h. Veinticuatro horas posterior al retiro de CIDR, se aplicaron Triptorelina (n=6), Gonadorelina (n=6) y sin aplicación (n=6; grupo testigo). Las hembras fueron inseminadas artificialmente a tiempo fijo (IATF) por laparoscopia a las 36 y 48 h posterior al retiro de CIDR y los embriones colectados seis días después del inicio del celo. Se tomaron muestras de sangre cada cuatro horas a partir del retiro de CIDR por un periodo de 72 h, para determinar los niveles de LH en plasma sanguíneo. La aplicación de Triptorelina indujo el pico preovulatorio a las 4 h posteriores de su aplicación; a las 28 h posteriores al retiro del CIDR se encontraron diferencias en el pico de LH entre Triptorelina y el Testigo ($P < 0.05$), no así con Gonadorelina. El número de embriones calidad 1 y transferibles fue mayor ($P < 0.05$) con Triptorelina (3.75 ± 0.62 y 6.00 ± 1.47 , respectivamente) que en el grupo Gonadorelina (1.00 ± 0.54 y 2.6 ± 0.81 , respectivamente). La adición de Triptorelina a las 24 h posterior al retiro de CIDR en protocolos de ovulación múltiple con FSH en ovejas Pelibuey, tiene un efecto en la liberación de LH, favoreciendo en el número de embriones calidad 1 y transferibles.

Palabras clave: Triptorelina, ovulación, embriones, Pelibuey.

4.2. Introducción

En el proceso de mejoramiento genético en los rebaños, el uso de biotecnologías reproductivas es de gran relevancia; entre ellas, la transferencia de embriones (TE) es una herramienta para la multiplicación de animales de alto valor genético. Sin embargo en este proceso, la ovulación múltiple es clave, ya que existen varios factores que afectan los resultados; entre ellos, la edad del animal, la raza, así como la respuesta del ovario al tratamiento hormonal, el uso de progestágenos y las hormonas empleadas para la ovulación múltiple (Cueto *et al.*, 2011).

Existe una gran variedad de protocolos que se emplean en la ovulación múltiple, cada uno de ellos tiene sus variantes en relación al uso de hormonas. Sin embargo, en la actualidad la mayoría se basa en el uso de Hormona Folículo Estimulante (FSH), debido a que diversos estudios han mostrado menor variabilidad en calidad y cantidad de embriones por donadora tratada; por lo cual, es la hormona más apropiada en la ovulación múltiple (Chagas e Silva *et al.*, 2003), a dosis decrecientes cada 12 h por un periodo de cuatro días, incrementando con ello la tasa de ovulación (Gonzales de Bulnes *et al.*, 2002; D'Alessandro *et al.*, 2005). Uno de los factores que aún se presentan en los protocolos de ovulación múltiple con el uso de FSH, es una gran variabilidad en la respuesta del ovario, incluso entre animales de la misma raza, en la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados, la cantidad de folículos anovulatorios y el número de folículos en crecimiento que no llegan a ovular. Ante esta situación, se ha buscado mejorar la sincronía de la ovulación, aumentar la tasa de fertilización y la producción de embriones, mediante la adición de agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2009a). Los agonistas comúnmente usados en esquemas de ovulación múltiple y programas de sincronización de celos en ovejas son Gonadorelina, Buserelina y Licerelina (Eppleston *et al.*, 1991; Gonzales Bulnes *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2009b; Azawi y Al-Mola,

2011; Cavalcanti *et al.*, 2012). Sin embargo, existen otros agonistas de menor uso en animales domésticos y que se han empleado en tratamientos reproductivos en humanos, como es el caso de Deslorelina, Goserelina, Histrelina, Nafarelina y Triptorelina (Lahlou *et al.*, 2000).

En particular, la Triptorelina es un agonista del GnRH, empleado principalmente en la industria farmacéutica para uso humano, su estructura esta diferenciada de la Gonadorelina por la sustitución del aminoácido glicina por el D-triptófano en la posición 6; en dosis únicas estimula la liberación de Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) de la hipófisis con una actividad biológica de efecto más intenso, debido que aumenta la vida media de la molécula y la protección de su degradación en sangre (Shapiro, 2003). En *in vitro* se menciona que tiene una liberación de LH hasta de 100 veces más que la GnRH (Lahlou *et al.*, 2000) y específicamente en ovejas, se ha empleado como un análogo de liberación lenta para bloquear la secreción de FSH en ovejas prepúberes (Recabarren *et al.*, 2006). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de Triptorelina, a las 24 h post retiro del CIDR, en el perfil de LH en plasma, en tasa ovulatoria, en respuesta al estro, número y calidad de embriones obtenidos de ovejas Pelibuey en época reproductiva.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Animales

El experimento se realizó en el Municipio Amatlán de los Reyes, Veracruz, México (18° 50' N y 96° 55' O) a 660 msnm. Se emplearon un total de 18 hembras multíparas de la raza Pelibuey, con peso y edad promedio de 43.46 ± 1.82 kg y 2.53 ± 0.11 años, respectivamente y mediana de 3 para condición corporal (escala de 1 a 5). Las hembras fueron mantenidas estabuladas durante la fase experimental y alimentadas a libre acceso en pasto Estrella de África (*Cynodon nlemfuensis*). Por

la tarde se les proporcionó 0.5 kg de un concentrado con 16 % de Proteína Cruda (PC). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo los criterios de la Norma Oficial Mexicana sobre las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el reglamento general del Colegio de Postgraduados.

4.3.2. Sincronización de celo

Las 18 hembras fueron agrupadas en tres tratamientos (n=6 por grupo), cada una de ellas fue sincronizada (día 0) mediante la inserción de un dispositivo intravaginal impregnado con 0.3 g de progesterona (CIDR[®]-Pfizer). El día 7 posterior a la inserción del CIDR, se realizó la aplicación intramuscular de una dosis de 250 µg de análogo de Prostaglandina F_{2α} (Cloprostenol, Celosil[®], Schering-Plough).

4.3.3. Inducción de ovulación múltiple

El tratamiento para inducir la ovulación múltiple inicio el día 6 y consistió en la aplicación de 8 dosis decrecientes de FSH porcina cada 12 h (40-40, 30-30, 20-20 y 10-10 mg), llegando a un total 200 mg (Folltropin-V[®], National Institutes of Health, Laboratorios Bioniche) para cada hembra; la séptima aplicación de FSH coincidió con el retiro del CIDR.

4.3.4. Aplicación de agonistas de GnRH

Los tres grupos experimentales fueron los siguientes; tratamiento Testigo consintió únicamente en la aplicación de CIDR-PGF_{2α} y FSH. A los siguientes dos grupos, se les realizó una aplicación vía intramuscular de análogo de GnRH 24 h posterior al retiro del CIDR (Azawi y Al-Mola, 2011) de la siguiente manera: tratamiento Gonadorelina, 50 µg de Gonadorelina (GnRH[®], Sanfer) y

tratamiento Triptorelina se aplicó 0.1 mg de Triptorelina (Gonapeptyl Daily[®], Ferring Pharmaceuticals).

4.3.5. Detección de celos y empadre

Posterior al retiro del CIDR, se llevó a cabo la detección de celos mediante la introducción de un macho provisto de mandil, en periodos de 30 min cada 4 h, hasta que el total de hembras mostraron celo. El empadre se realizó mediante la técnica de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) por laparoscopia descrito por Maxwell y Butler (1984), a las 36 y 48 h después del retiro del progestágeno. Se empleó semen fresco diluido en el diluyente Triladyl[®] (Minitüb, Germany), en pajillas de 0.25 mL a una concentración de 100×10^6 espermatozoides dosis⁻¹, depositando la mitad de la pajilla en la curvatura mayor de cada uno de los cuernos uterinos.

4.3.6. Colección de embriones

La recuperación de los embriones se realizó seis días después de iniciado el celo mediante la técnica quirúrgica de laparotomía abdominal (Tervit y Havik, 1976). Cada una de las ovejas fue anestesiada en un plano general, administrando una combinación de xilazina (Procin[®], Laboratorios PiSA Agropecuaria), a razón de 0.25 mg kg⁻¹ P.V. de Clorhidrato de Xilazina + ketamina (Anesket[®], Laboratorios PiSA Agropecuaria) a razón de 1.25 mg kg⁻¹ P.V. de Clorhidrato de Ketamina, aplicada 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°. 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.

Una vez expuestos los cuernos uterinos, se procedió a evaluar la tasa ovulatoria, contando el número de cuerpos lúteos en cada ovario. Posteriormente, se realizó el lavado a cada uno de ellos, iniciando con una punción a nivel de la base del cuerno, donde se introdujo una sonda Foley 10FR (NIPRO^{MR}); mediante el inflado de la ampolla del extremo de la sonda se obstruye la luz uterina y el paso hacia el cuello uterino. Posterior a la colocación de la sonda, en el oviducto se colocó un catéter 18G (Punzocat), mediante el cual se introdujo 40 mL de una mezcla de solución Hartmann y medio de colecta comercial (Vigro Complete Flush Solution[®], Bioniche). Finalmente, la solución se recuperó mediante la sonda de Foley 10FR en una caja de Petri cuadriculada.

Una vez lavados ambos cuernos y recuperada la solución, se realizó la sutura de la herida y se aplicó una dosis de 1 mL 10 kg PV⁻¹ de antibiótico (Shotapen L.A. [®], Virbac), así como una aplicación vía intramuscular de 25 mg kg⁻¹ PV de Dipirona (Alnex[®], Pisa Agropecuaria) durante tres días. La búsqueda y clasificación de los embriones se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio estereoscópico, evaluando los diferentes estados de desarrollo embrionario (Wintenberg-Torres y Sevellec, 1987).

4.3.7. Perfil hormonal de LH

Con la finalidad de evaluar la respuesta del agonista de GnRH en la liberación y su efecto en el pico de LH, se tomaron muestras de sangre a cada una de las ovejas vía punción de la vena yugular cada 4 h y un periodo de 72 h, iniciando al momento de retirar el CIDR. Se utilizaron tubos vacutainer sin anticoagulante, posterior a la toma de la muestra se centrifugó a 600 X g por 15 min,

se separó el suero por decantación y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

La concentración de LH inmunoreactiva se cuantificó con un radioinmunoensayo en fase líquida, validado para la LH bovina (Perera-Marín *et al.*, 2008). El trazador se formó con la incorporación del NaI125 al USDA-bLH-B5-AFP11743B, mediante el método del IODO-GEN (Perera-Marín *et al.*, 1996). La misma proteína se utilizó como referencia a las dosis de 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 ng/tubo en cuatro replicas. El anticuerpo primario (anti-oLH-26) se utilizó a una dilución de trabajo 1:60,000 en presencia de suero normal de conejo, 1:1,600 y la separación del complejo antígeno-anticuerpo se obtuvo en presencia del anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo generado en burro, 1:80), después de un tiempo de incubación de 120 h a 4 °C. La cantidad mínima detectable en el sistema fue 0.05 ng mL⁻¹ y el coeficiente de variación (CV) intra ensayo fue de 12.9 %.

4.3.8. Análisis estadístico

Las variables analizadas fueron: porcentaje de hembras en celo, tiempo transcurrido desde el retiro de CIDR a la presentación de celo (TC), tasa ovulatoria (TO), embriones calidad 1(EC1), embriones transferibles (ETR), ovocitos no fertilizados (ONF) y porcentaje de recuperación (PR). La variable TC se analizó mediante el método de curvas de supervivencia PROC Log-Rank y las variables TO, EC1, ETR, ONF y PR mediante una distribución de Poisson, empleando el procedimiento PROC GENMOD y entre tratamientos, se analizaron mediante la prueba de contrastes individuales (SAS, 2002). Las variables relacionadas con la concentración de LH, se analizaron mediante un modelo mixto empleando el procedimiento PROC MIXED (SAS, 2002). Las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$.

4.4. Resultados

4.4.1. Concentración hormonal de LH

Las concentraciones de LH en plasma mostraron niveles basales (menos de 2 ng mL⁻¹) a un máximo de 20.4 ng mL⁻¹. El pico de LH se dio a las 28 h post retiro del progestágeno en los tratamientos de Gonadorelina y Triptorelina, y a las 32 h en el testigo (Figura 2). Así mismo, la aplicación de agonista de GnRH 24 h posterior al retiro del CIDR tuvo un efecto en la respuesta en el pico preovulatorio de LH en los grupos Gonadorelina y Triptorelina, llegando a un nivel más alto en el caso de Triptorelina.

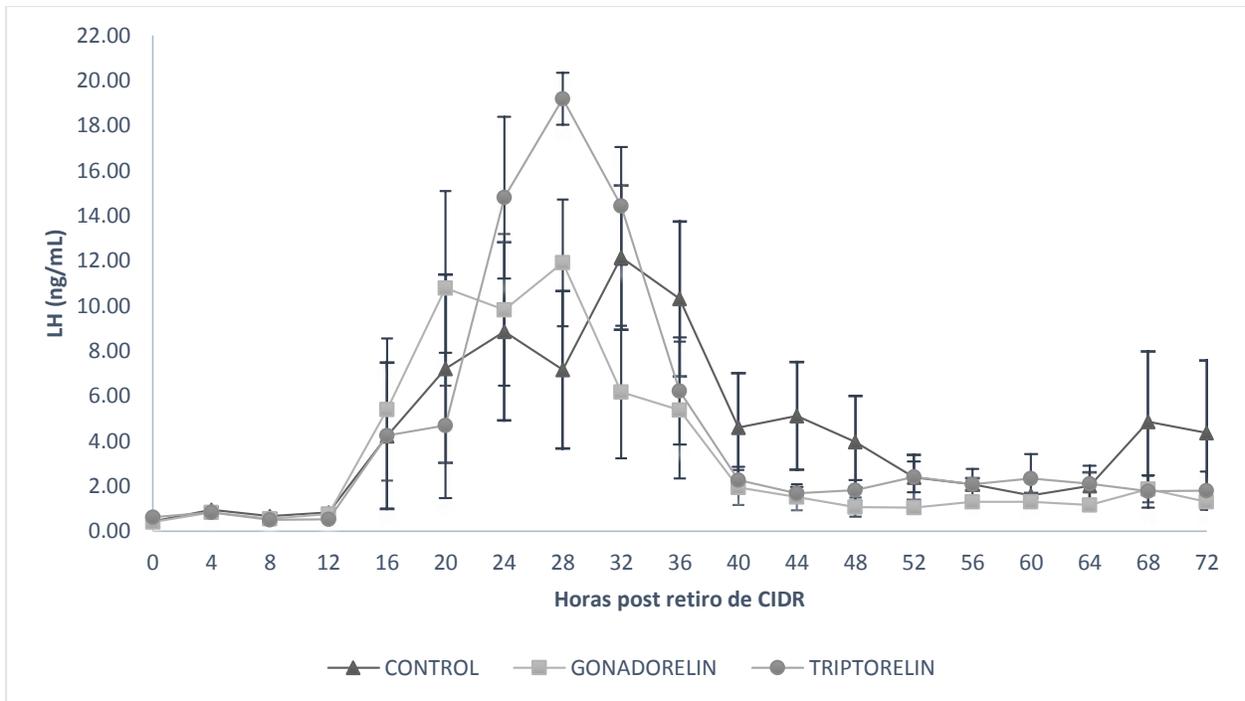


Figura 2. Valores medios en el perfil hormonal de LH

Uno de los objetivos con la aplicación de agonistas de GnRH es provocar el pico preovulatorio de LH; en este caso al medir la respuesta posterior a la aplicación de Gonadorelina y Triptorelina, se

puede observar que en ambos grupos el pico de LH se presentó a las 28 h post retiro del CIDR, encontrándose diferencias en la concentración de LH entre el grupo Testigo y Triptorelina ($P < 0.05$). En relación al tiempo transcurrido (h) desde el inicio hasta el término de la curva, se encontraron diferencias con la aplicación de Triptorelina (22 ± 2.25) comparado con el grupo de Gonadorelina (32.66 ± 2.61) y Testigo (36.6 ± 3.78) ($P < 0.05$). De igual manera, se logró ver el efecto de la aplicación de un agonista al reducir el tiempo desde el pico hasta que finalizó la curva de LH; 18.6 ± 2.23 , 24 ± 2.92 y 14 ± 1.71 , para Testigo, Gonadorelina y Triptorelina, respectivamente; con diferencias únicamente entre los dos últimos tratamientos ($P < 0.05$).

4.4.2. Comportamiento estral

El comportamiento en la respuesta del tratamiento de sincronización fue favorable, ya que el total de las ovejas tratadas en los tres grupos experimentales mostraron celo antes de las 18 h posteriores al retiro del progestágeno. El tiempo trascendido entre el retiro del CIDR y la manifestación de estro tuvo diferencias entre el grupo Gonadorelina y Triptorelina ($P < 0.05$) (Cuadro 1).

4.4.3. Respuesta a la ovulación múltiple

En la respuesta a la ovulación, se evaluó primeramente la tasa ovulatoria, mediante el conteo del número de cuerpos lúteos (CL) presentes en cada uno de las ovejas tratadas. La aplicación de agonistas de GnRH no tuvo efecto en la respuesta a la tasa ovulatoria entre los tres tratamientos (Cuadro 1, $P > 0.05$). Otro factor importante a evaluar es la calidad de los embriones, en este sentido al evaluar el número de embriones con calidad 1, el efecto de la aplicación de agonista de GnRH mejoró la respuesta en la calidad del embrión, con diferencias significativas entre el grupo Gonadorelina y Triptorelina ($P < 0.05$). De esta manera, con la aplicación de GnRH, se busca

mejorar la respuesta en el número de embriones de calidad para ser transferidos; los resultados se mejoran con la adición de Triptorelina, aumentando el número de embriones transferibles y con diferencia estadística con el grupo Gonadorelina ($P < 0.05$) y sin diferencia con el Testigo ($P > 0.05$).

Cuadro 1. Respuesta a la adición de agonistas de GnRH en la ovulación múltiple de ovejas Pelibuey con IATF

	Testigo (n=6)	Gonadorelina (n=6)	Triptorelina (n=6)
<i>Comportamiento estral</i>			
Número de hembras en celo	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
Remoción CIDR a estro (h)	16.5±1.50 ^{ab}	12.00±1.24 ^a	17.08±3.86 ^b
<i>Respuesta a ovulación múltiple</i>			
Tasa ovulatoria	12.75±4.38 ^a	13.8±3.05 ^a	13.5±2.84 ^a
Embriones calidad 1	2.75±1.43 ^a	1.00±0.54 ^b	3.75±0.62 ^a
Embriones transferibles	5.25±2.98 ^a	2.6±0.81 ^b	6.00±1.47 ^a
Ovocitos no fertilizados	0.0±0.00 ^a	0.8±0.58 ^b	0.0±0.00 ^a
% de recuperación	55.8±18.93 ^a	52.43±4.13 ^a	58.32±14.45 ^a
Literales diferentes en hileras difieren estadísticamente ($p < 0.05$).			

Por otro lado, en los tratamientos Testigo y Triptorelina no se encontraron ovocitos no fertilizados. Y en el caso de Gonadorelina, hubo diferencia con los otros tratamientos (0.8 ± 0.58 ; $P < 0.05$). Y finalmente, en el porcentaje de estructuras embrionarias recuperadas en relación al número total de cuerpos lúteos observados en las hembras, no se mostraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los tres grupos; Testigo, Gonadorelina y Triptorelina.

4.5. Discusión

La función principal del GnRH, secretado endógenamente o administrado exógenamente, durante la fase folicular es inducir el pico de LH y ovular los folículos dependientes de la misma hormona (Hashem *et al.*, 2015), ya que se espera que la mayoría de las hembras sean similares en la etapa de crecimiento y desarrollo folicular (Husein y Kridli, 2003). En el presente estudio se evaluaron las concentraciones séricas de LH con la finalidad de caracterizar la oleada preovulatoria y determinar el efecto de los agonistas Triptorelina y Gonadorelina en la liberación de LH y, posteriormente, la respuesta en la tasa de ovulación. Los resultados muestran una sincronía en la oleada de LH entre las hembras con Triptorelina, logrando con ello que el pico preovulatorio se diera a las 28 h post retiro del CIDR en los grupos de Gonadorelina y Triptorelina, comparado con el grupo testigo; en este punto se encontró diferencias en la concentración de LH entre el grupo testigo y Triptorelina ($p < 0.05$). La aplicación intramuscular de Triptorelina 24 h post retiro de CIDR tuvo un efecto de manera rápida, igual a la reportada por Eppleston *et al.* (1991), quienes concluyeron que la aplicación de un agonista de GnRH induce un pico de LH entre las 1 y 4 h posteriores al tratamiento. En otros estudios, la Triptorelina se ha evaluado por su efecto superagonista *in Vivo*, una inyección de 1 mg de Triptorelina por kg de peso corporal puede inducir hasta 10 veces la liberación de LH de manera inmediata, comparado con la misma dosis de GnRH (Lahlou *et al.*, 2000). Lo reportado por otros autores sobre agonistas de GnRH pudo confirmarse en el presente estudio y concluir que la aplicación de Triptorelina tiene un efecto positivo y rápido en la liberación de LH, lo cual incrementa la concentración sérica en el pico preovulatorio y reduce el tiempo desde el retiro de CIDR y el pico de LH.

Parte de los objetivos en un programa de sincronización y ovulación múltiple, el número de hembras que manifiestan celo y además de forma sincronizada es parte de los objetivos. Con el uso de progestágenos, los resultados son aceptables cuando el 90 % de las hembras muestra signos de celo en las próximas 72 h posteriores al retiro del CIDR (Van Cleeff *et al.*, 1998). En relación a lo anterior, la respuesta de las hembras al proceso de sincronización se considera excelente, ya que el 100 % de las hembras respondieron a los tratamientos con la presencia de celo. Estos resultados son similares a los reportados por Arroyo-Ledezma *et al.* (2013) en ovejas de pelo, y por Menchaca *et al.* (2009b) en tratamientos de superovulación con sincronización de celos mediante CIDR. Por otra parte, en la raza Pelibuey se reportan resultados con la respuesta en el 100 % de las hembras sometidas a sincronización de celos con esponjas en un periodo de 36 h post retiro (Avendaño-Reyes *et al.*, 2007).

Además del tiempo de respuesta en el número de hembras en celo con el uso de CIDR, también es relevante considerar el tiempo que transcurre entre el retiro y la manifestación del celo. En este sentido, en el presente estudio se observó que las ovejas exhibieron una conducta estral entre las 12 ± 1.24 , 16.5 ± 1.5 y 17.08 ± 3.86 h para los tratamientos de Gonadorelina, Testigo y Triptorelina, respectivamente. Este tiempo transcurrido entre el retiro de dispositivo y la presentación de celo es más corto en comparación con otros resultados de investigación con el uso de CIDR y FSHp que mencionan $14.4 + 0.7$ h (Menchaca *et al.*, 2009b) y 25.5 ± 6.2 h (Oliveira *et al.*, 2012). Diversas investigaciones han demostrado que el uso de CIDR para la sincronización de celos ha demostrado reducir el tiempo entre el retiro del mismo y la exhibición de celo, debido a diversos factores como la tasa de absorción y el metabolismo de los progestágenos empleados (Swelum *et al.*, 2015), así como el tiempo que tardan los residuos de los progestágenos en ser eliminados del

organismo, tal es el caso de las esponjas (Menegatos *et al.*, 2003). Así mismo, Wierzchos *et al.* (1992) mencionan que el tiempo en el inicio de celo esta correlacionado con la cantidad de hormona empleada en la sincronización a base de gonadotropinas porcinas. En la presente investigación, la adición de agonistas de GnRH no tuvo efecto en el tiempo de inicio de celo posterior al retiro de CIDR, debido a que la aplicación de GnRH se dio las 24 h posteriores al retiro del mismo y la manifestación de celo se presentó antes de las 18 h en los tres tratamientos.

Otro de los objetivos que se busca con el uso de progesterona en el tratamiento de sincronización y ovulación múltiple es que el crecimiento y desarrollo folicular sean similares en el total de las hembras (Husein y Kridli, 2003). Lo anterior es de vital importancia cuando se lleva a cabo un proceso de superovulación, debido a que la dinámica de crecimiento de los folículos en el ovario está relacionado con la fuente de FSH que se usa (Gonzales de Bulnes *et al.*, 2002). La modificación de la fase lútea es parte de la sincronización del celo en las ovejas (Abecia *et al.*, 2011), una retroalimentación negativa de LH es provocada con el uso de progestágenos, al momento del retiro del mismo se da un pico preovulatorio de la LH, provocando más tarde la ovulación (Leyva *et al.*, 1998). La adición de GnRH a los protocolos de sincronización de celos y ovulación múltiple ha demostrado reducir las variaciones del pico de LH, para concentrar e incrementar la tasa de ovulación en ovinos y otras especies (Akinlosotu y Wilder, 1993; Brüssow *et al.*, 1996; Pierson *et al.*, 2003; Sirjani *et al.*, 2011). La respuesta a tasa ovulatoria no tuvo diferencias entre los tratamientos evaluados, resultados similares a los reportados por Walker *et al.* (1989), quienes reportaron resultados sin diferencias en el número de cuerpos lúteos en el ovario y, de manera similar, el mismo resultado se reporta con el uso de eCG y la adición de GnRH en época no reproductiva (Azawi y Al-Mola, 2011). Por otra parte, estudios reportan aumento en

el número de cuerpos lúteos con la adición de GnRH, posterior a la remoción del progestágeno (Menchaca *et al.*, 2009b; Azawi y Al-Mola, 2011). En ovejas Pelibuey se reportan tasas de ovulación semejantes cuando se emplean FSH-LH como hormona superovulatoria (Aké-López *et al.*, 2003). Mientras tanto, Herrera-Camacho *et al.* (2008) reportan que con la adición de ácidos grasos en la dieta, obtuvieron 14.73 ± 1.87 cuerpos lúteos por oveja; sin embargo, en el grupo control se encontraron 10.73 ± 1.42 cuerpos lúteos.

En relación a la calidad de los embriones se encontró diferencia en la media de embriones calidad 1 y transferibles entre las ovejas que recibieron Gonadorelina comparado con las que recibieron Triptorelina. Éstas diferencias estadísticas en la calidad de los embriones, pudo ser debido probablemente a las características del pico de LH (Veiga-Lopez *et al.*, 2006) y resultado de la acción de la Triptorelina, al tener una vida media más prolongada y menor degradación en sangre por efecto de las enzimas (Shapiro, 2003).

4.6. Conclusión

La administración de agonista de GnRH, Triptorelina, 24 h posterior al retiro del CIDR mejoró la respuesta en la liberación y la sincronización del pico de LH, así como en la respuesta en la producción de embriones calidad 1 y transferibles en ovejas Pelibuey. Sin embargo, en las variables de tasa ovulatoria, ovocitos no fertilizados y porcentaje de recuperación no hay diferencia entre agonistas y el grupo testigo. Finalmente, los protocolos de ovulación múltiple a base de FSH más la adición de agonistas de GnRH, como la Triptorelina, es un esquema útil con buenos resultados en la producción de embriones de calidad y transferibles en la oveja de la raza Pelibuey.

4.7. Referencias

- Abecia JA, F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet Clin Food Anim Pract* 27: 67-79.
- Aké-López JR, M. Heredia y Aguilar, M. Alfaro-Gamboa, F. Centurión-Castro, O. 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.
- Akinlosotu BA, and C.D. Wilder. 1993. Fertility and blood progesterone levels following LHRH induced superovulation in FSH treated anestrus goats. *Theriogenology* 40: 895-904.
- Arroyo-Ledezma J, D La Torre-Barrera, NY Ávila-Serrano. 2013. Reproductive response in hair sheep synchronized with progesterone or prostaglandins. *Agrociencia* 47: 661-670.
- Avendaño-Reyes L, F. D. Álvarez-Valenzuela, L. Molina-Ramírez L, R. Rangel-Santos, A. Correa-Calderón, J. Rodríguez-García, T. R. Famula. 2007. Reproduction performance of Pelibuey ewes in response to estrus synchronization and artificial insemination in Northwestern Mexico. *J Anim Vet Adv* 6: 807-812.
- Azawi, OI, and M.K. Al-Mola. 2011. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. *Trop Anim Health Prod* 43: 1351–1355.
- Brüssow KP, W. Jöchle W, U. Hühn. 1996. Control of ovulation with a GnRH analog in gilts and sows. *Theriogenology* 46: 925-934.
- Cavalcanti A.D.S., F. Z. Brandão, L.A.G. Nogueira, J.F.D. Fonseca. 2012. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Rev Bras Zootec* 41: 1412-1418.
- Chagas e Silva J, L. Lopes da Costa, R. Cidadão, 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.
- Cueto MI, A.E. Gibbons, F. Pereyra-Bonnet, P. Silvestre, A. González-Bulnes. 2011. Effects of Season and Superovulatory Treatment on Embryo Yields in Fine-Wool Merinos Maintained Under Field Conditions. *Reprod Domest Anim* 46: 770-775.
- D'Alessandro AG, G. Martemucci, L. Taibi. 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology* 63: 1764-1774.

- Eppleston, J, G. Evans, E.M. Roberts. 1991. Effect of time of PMSG and GnRH on the time of ovulation, LH secretion and reproductive performance after intrauterine insemination with frozen ram semen. *Anim Reprod Sci* 26: 227-237.
- González-Bulnes A, D.T. Baird, B.K. Campbell, J.M. Cocero, M.R. García-García, K.E. Inskip, A. López-Sebastián, S.A. McNeilly, J. Santiago-Moreno, J.H.C. Souza, A. Veiga-López. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev* 16: 421–435.
- Gonzales-Bulnes A, R. M. Garcia-Garcia, C.J.H. Souza, J. Santiago-Moreno, A. Lopez-Sebastian, M.J. Cocero, D.T. Baird. 2002. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod Domest Anim* 37: 357-361.
- Hashem NM, K.M. El-Azrak, A.N. El-Din, T.A. Taha, M.H. Salem. 2015. Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. *Theriogenology* 83: 192-198.
- Herrera Camacho J, J.R. Aké López, J.C. Ku Vera, G.L. Williams, J. A. Quintal Franco. 2008. Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. *Rev mex de cienc pecuarias* 46: 107-117.
- Husein MQ, and R.T. Kridli. 2003. Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2 α treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Reprod Domest Anim* 38: 228-232.
- Lahlou N, J.C. Carel, J.L. Chaussain, M. Roger. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 (Suppl 1):723-738.
- Leyva V, B.C. Buckrell, and J.S. Walton. 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50: 395–416.
- Maxwell, WMC, L.G. Butler, and H.R. Wilson. 1984. Intra-uterine insemination of ewes with frozen semen. *J Agr Sci* 102: 233-235.
- 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 DA, M. Vilariño, M. Crispo, T. De Castro, and E. Rubianes. 2009b. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 22: 113–118.

- Menegatos J, S. Chadio, T. Kalogiannis T, Koukoura T, Kouimtzis S. 2003. Endocrine events during the periestrous period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization. *Theriogenology* 59: 1533-1534.
- Oliveira M.E.F., M.F. Cordeiro, R.M. Ferreira, S.F. Souza, J.S.P. Pieroni, L.F.D.S. Rodrigues, W.R.R. Vicente. 2012. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG. *Ciência Rural* 42: 1077-1082.
- Perera-Marín G, C.G. Gutiérrez, C. Murcia, H. León, and E. González-Padilla. 2008. Progesterone and the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in cattle. *Anim Reprod Sci* 104: 164-176.
- Perera-Marín G, R.F. Ortiz, V.J.J. Gamboa, M.W. Reynoso, A.A. Falcón, and V.A. Salas. 1996. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Vet Mex* 27: 1-10.
- Pierson J.T., H. Baldassarre, C.L. Keefer, and B.R. Downey. 2003. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology* 60: 397-406.
- Recabarren S.E., P. Muñoz, A. Lobos, C. Vilches, and J. Paril. 2006. Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Arch Med Vet* 2006. 38: 39-46.
- SAS. Statistical Analysis System. Version 9.0 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Shapiro D.B. 2003. GnRH antagonists in normal responder patients. *Fertil Steril* 80 (suppl 1): 1-7.
- Sirjani M.A., M.H. Shahir, H. Kohram, and A.Z. Shahneh. 2011. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment on multiple births in Afshari ewes. *Afr J Biotechnol* 10:12358-12362.
- Swelum A.A., A. N. Alowaimer, and M. Abouheif. 2015. Use of fluorogestone acetate sponges or CIDR for estrus synchronization in ewes: effects of hormonal profiles and reproductive performance. *Theriogenology*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.018>.
- Tervit H.R., and P.G. Havik. 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zeal Vet J* 24:138-140.

- Van Cleeff J., F.J. Karsch, and V. Padmanabhan. 1998. Characterization of endocrine events during the periestrous period in sheep after estrous synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domest Anim Endocrinol* 15: 23-34.
- Veiga-Lopez A, M.J. Cocero, V. Dominguez, A.S. McNeilly, and A. Gonzalez-Bulnes. 2006. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. *Reprod. Biol* 6:243-264.
- Walker S.K., D.H. Smith, A. Frensham, R.J. Ashman, and R.F. Seaman. 1989. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology* 31:741–52.
- Wierzchoś E, M. Tischner, M. Maffii. 1992. Superovulation of a low fecundity sheep breed using a porcine gonadotrophin extract with a defined LH content (Pluset). *Theriogenology* 38: 147-152.
- Wintenberg-Torres S, and C. Sevellec. 1987. Atlas of the early development of the sheep embryo. Paris France: INRA Station de Physiologie Animale. pp 51. (In French).

V. EXPERIMENTO 2. ADICION DE TRIPTORELINA E INSEMINACION ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN RESPUESTA EMBRIONARIA Y COSTO DE PRODUCCIÓN EN OVEJAS PELIBUEY

5.1. Resumen

Con la finalidad de evaluar el efecto de la adición de Triptorelina (TRIP) y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en la respuesta del ovario en la producción de embriones; así como, el costo de producción de un embrión, se desarrolló un experimento en el cual se ocuparon veinticuatro ovejas Pelibuey, distribuidas en cuatro grupos, se sincronizaron con CIDR, además de la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Se usó FSH en ocho dosis decrecientes cada 12 h como parte del tratamiento de ovulación múltiple. Los tratamientos se dividieron por la aplicación de FSH + $\text{PGF}_{2\alpha}$ con monta natural (FSH-MN) e inseminación artificial a tiempo fijo vía intrauterina (FSH-IATF) y la aplicación de FSH + $\text{PGF}_{2\alpha}$ + Triptorelina (TRIP), con monta natural (FSH-TRIP-MN) y con inseminación artificial (FSH-TRIP-IATF). Las hembras del grupo MN fueron inseminadas al inicio de celo y dos montas posteriores en un intervalo de 6 h y, las ovejas del grupo restante se inseminaron con semen fresco mediante IATF por laparoscopia 36 y 48 h posteriores a retiro de CIDR. La adición de TRIP aumentó la tasa ovulatoria entre los tratamientos FSH-MN y FSH-TRIP-MN ($P < 0.05$) y entre los grupos FSH-MN y FSH-TRIP-IATF ($P < 0.05$). Los embriones calidad 1 también se reflejaron diferencias entre los tratamientos FSH-MN vs FSH-IATF ($P < 0.05$) y entre los tratamientos FSH-MN vs FSH-TRIP-IA ($P < 0.05$). No existen diferencias entre los tratamientos al evaluar el número de embriones transferibles. El costo de producción de un embrión es menor con la aplicación de TRIP y el uso de IATF. En tratamiento de ovulación múltiple con FSH + $\text{PGF}_{2\alpha}$ más la adición de Triptorelina e IATF por laparoscopia es una alternativa en los programas de mejoramiento genético para la difusión acelerada del uso animales de elevado valor genético en la raza Pelibuey.

Palabras Clave: Inseminación, Laparoscopia, Triptorelina, Costo Embrión.

5.2. Introducción

En México, la cría de ovinos de pelo es una actividad en constante crecimiento por su excelente adaptación a diferentes condiciones climáticas y buena demanda en el mercado de la carne; sin embargo, para aprovechar estas ventajas es necesario incrementar el número de animales de elevado nivel genético mediante herramientas biotecnológicas con buenos resultados y que reduzcan los costos de producción para los productores. Dentro de las biotecnologías reproductivas disponibles como la ovulación múltiple, la transferencia de embriones (TE) y la inseminación artificial (IA), son técnicas viables y prácticas que permiten la difusión más acelerada de características deseables en los rebaños. No obstante, en la gran mayoría de las veces se enfrenta a un elevado costo en el método de ovulación múltiple y la inseminación artificial por laparoscopia, por lo cual es necesario buscar estrategias que disminuyan las desventajas de las herramientas antes mencionadas.

En la ovulación múltiple, factores como la raza, edad, manejo nutricional, condiciones climáticas, el tipo de progesterona empleado, la gonadotropina usada y el tipo de inseminación usada, pueden ser factores que influyen en la respuesta del ovario (Rubianes *et al.*, 1997, Gonzales de Bulnes *et al.*, 2002).

La inseminación por monta natural (MN) presenta ciertos riesgos para una óptima tasa de fertilización (Trousou y Moore, 1974), uno de los factores es la barrera cervical y la dificultad de los espermatozoides para atravesarla. Este problema de transporte se incrementa con los protocolos hormonales que se emplean en la sincronización estral y la ovulación múltiple (Naqvi *et al.*, 2001); por lo cual, la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una alternativa viable en los programas de ovulación múltiple. Pinna *et al.* (2008) mencionan que la inseminación debe ser realizada de tal forma que los espermatozoides estén aptos para fecundar el ovulo liberado en la

ovulación y en condiciones de ser fecundado; la sincronía entre la ovulación y la inseminación por monta natural o artificial es importante para obtener las mejores tasas de fertilidad (Veiga-Lopez *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, conocer el momento de la ovulación en las hembras es de gran ayuda para mejorar los resultados de fertilidad, ya que un buen resultado en el número de embriones obtenidos está determinado por la sincronía entre el momento de la inseminación artificial y la ovulación (Cognie, 1999; Veiga-Lopez *et al.*, 2008). Con la finalidad de mejorar la sincronía de la ovulación, aumentar la tasa de fertilización y la producción de embriones, se ha usado agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (González-Bulnes *et al.*, 2004; Menchaca *et al.*, 2009b). En protocolos de ovulación múltiple con FSH mas la adición de GnRH 24 h posterior al retiro del progestágeno incrementa la tasa de ovulación, además la combinación con inseminación artificial por laparoscopia puede incrementar el porcentaje de fertilización, lo cual puede contribuir a un mejoramiento genético en los ovinos (Azawi y Al-Mola, 2011).

Derivado de lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de Triptorelina en un protocolo de ovulación múltiple con FSH en ovejas de la raza Pelibuey en época reproductiva, inseminadas artificialmente a tiempo fijo por laparoscopía, en variables relacionadas con respuesta embrionaria y el costo de producción por embrión en cada uno de los tratamientos.

5.3. Materiales y métodos.

5.3.1. Animales

El experimento se realizó en el Municipio Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, (18° 50' N y 96° 55' O) a 660 msnm. Se emplearon un total de 24 hembras multíparas de la raza Pelibuey, peso y edad promedio de 40.4 ± 1.22 kg y 2.00 ± 0.12 años, respectivamente y mediana de 2.5 para

condición corporal (escala de 1 a 5). Las hembras fueron mantenidas estabuladas durante la fase experimental y alimentadas a libre acceso en pasto Estrella de África (*Cynodon nlemfuensis*). Por la tarde, se les proporcionó 0.5 kg de un concentrado con 16 % de Proteína Cruda (PC). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo los criterios de la Norma Oficial Mexicana sobre las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el reglamento general del Colegio de Postgraduados.

5.3.2. Sincronización de celo

Las hembras fueron agrupadas en cuatro tratamientos (n=6 por grupo), cada una de ellas fue sincronizada (día 0) mediante la inserción de un dispositivo intravaginal impregnado con 0.3 g de progesterona (CIDR®-Pfizer). Al día 7 posterior a la inserción del CIDR, se realizó la aplicación intramuscular de una dosis de 250 µg de análogo de Prostaglandina F_{2α} (Cloprostenol, Celosil®, Schering-Plough).

5.3.3. Inducción de ovulación múltiple

El tratamiento para inducir la ovulación múltiple inicio el día 6 y consistió en la aplicación de FSH porcina en 8 dosis decrecientes cada 12 h (40-40, 30-30, 20-20 y 10-10 mg), aplicando un total 200 mg (Folltropin-V®, National Institutes of Health, Laboratorios Bioniche) por cada hembra; la séptima aplicación de FSH coincidió con el retiro del CIDR.

5.3.4. Tratamientos

Las 24 hembras se dividieron en cuatro grupos experimentales con seis animales(n=6) cada uno. El grupo 1 recibió únicamente la aplicación de FSH + PGF_{2α} e inseminación por monta natural (FSH-MN); el grupo 2 mediante la aplicación de FSH + PGF_{2α} y la inseminación artificial a tiempo fijo por laparoscopia (FSH-IATF); el grupo 3 recibió FSH + PGF_{2α} más la aplicación vía

intramuscular de un análogo de GnRH, Triptorelina (TRIP; 0.1 mg de Triptorelina; Gonapeptyl Daily, Ferring Pharmaceuticals) 24 h posterior al retiro del CIDR (Azawi y Al-Mola, 2011) e inseminación por monta natural (FSH-TRIP-MN) y, el grupo 4 recibió FSH + PGF_{2α} + TRIP e inseminación artificial a tiempo fijo por laparoscopia (FSH-TRIP-IATF) .

5.3.5. Detección de celos e inseminación

Posterior al retiro del CIDR, se llevó a cabo la detección de celos mediante la introducción de un macho provisto de mandil, en periodos de 30 min cada 4 h, hasta que el total de hembras mostraron celo. La inseminación se realizó de la siguiente manera: los grupos (FSH-MN y FSH-TRIP-MN) se realizó mediante monta natural empleando dos machos adultos de la misma raza previamente probada su fertilidad, las montas se dieron al inicio del celo y dos montas posteriores con un intervalo de 6 h cada una. Los dos grupos restantes (FSH-IATF y FSH-TRIP-IATF) se inseminaron mediante la técnica de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) por laparoscopia descrito por Maxwell *et al.* (1984), a las 36 y 48 h después del retiro del progestágeno (Azawi y Al-Mola, 2011). Se empleó semen fresco, obtenido y evaluado 30 min antes de la IATF, fue diluido en Triladyl® (Minitüb, Germany), en pajillas de 0.25 mL a una concentración de 100×10^6 espermatozoides dosis⁻¹, depositando la mitad de la pajilla en la curvatura mayor de cada uno de los cuernos uterinos.

5.3.6. Colección de embriones

La recuperación de los embriones se realizó seis días después de iniciado el celo mediante la técnica quirúrgica de laparotomía media ventral (Tervit y Havik, 1976). Cada una de las ovejas fue anestesiada en un plano general, administrando una combinación de xilazina (Procin®, Laboratorios PiSA Agropecuaria), a razón de 0.25 mg kg⁻¹ P.V. de Clorhidrato de Xilazina +

ketamina (Anesket®, Laboratorios PiSA Agropecuaria) a razón de 1.25 mg kg⁻¹ P.V. de Clorhidrato de Ketamina, aplicada 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 nítrico. 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°. 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.

Una vez expuestos los cuernos uterinos, se procedió a evaluar la tasa ovulatoria, contando el número de cuerpos lúteos en cada ovario. Posteriormente, se realizó el lavado a cada uno de ellos, iniciando con una punción a nivel de la base del cuerno, donde se introdujo una sonda Foley 10FR (NIPRO^{MR}); mediante el inflado de la ampolla del extremo de la sonda se obstruye la luz uterina y el paso hacia el cuello uterino. Posterior a la colocación de la sonda, en el oviducto se colocó un catéter 18G (Punzocat), mediante el cual se introdujo 40 mL de una mezcla de solución Hartmann y medio de colecta comercial (Vigro Complete Flush Solution[®], Bioniche). Finalmente, la solución se recuperó mediante la sonda de Foley 10FR en una caja de Petri cuadrículada.

Una vez lavados ambos cuernos y recuperada la solución, se realizó la sutura de la herida y se aplicó una dosis de 1 mL 10 kg PV⁻¹ de antibiótico (Shotapen L.A. [®], Virbac), así como una aplicación vía intramuscular de 25 mg kg⁻¹ PV de Dipirona (Alnex[®], Pisa Agropecuaria) durante tres días. La búsqueda y clasificación de los embriones se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio estereoscópico, evaluando los diferentes estados de desarrollo embrionario (Wintenberg-Torres y Sevellec, 1987).

5.3.7. Análisis estadístico

Las variables analizadas fueron: Porcentaje de hembras en celo, tiempo transcurrido desde el retiro de CIDR a la presentación de celo (TC), tasa ovulatoria (TO), embriones calidad 1 (EC1), embriones transferibles (ETR), ovocitos no fertilizados (ONF) y porcentaje de recuperación (PR). La variable TC se analizó mediante el método de curvas de supervivencia PROC Log-Rank y las variables TO, EC1, ETR, ONF y PR mediante una distribución de Poisson, empleando el procedimiento PROC GENMOD y entre tratamientos se analizaron mediante la prueba de contrastes o comparaciones ortogonales.

5.3.8. Determinación de costo de producción

Para determinar el costo de producción de un embrión en cada una de los tratamientos se determinaron los siguientes rubros en costos fijos (CF) y costos variables (CV) bajo el procedimiento de método de costos operacionales (Fernandes *et al.*, 2010):

Costos variables: en este rubro se consideraron todos los gastos, considerando material, medicamentos y hormonales, relacionados a: sincronización y superovulación de las hembras, gastos relacionados a la inseminación artificial, gastos del proceso de colecta de embriones y los gastos de mano de obra especializada y apoyo (inseminación, colecta y cuidado y alimentación de los animales) y la alimentación de las hembra y semental, en monta natural, por el periodo de 40 días.

Costos fijos: en este rubro se consideró lo relacionado a la depreciación de las hembras (DH) y el semental (DM) en el caso de los protocolos con monta natural, para lo cual se realizó tomando en cuenta el costo inicial de compra de una hembra primala (CIH), el costo de venta de esa misma

hembra después de 3 años (CVH) y el número de posibles lavados en un periodo de 3 años de vida útil, para este caso se consideran 6 lavados. En el caso del semental, se realizó considerando el costo de compra (CIM), el costo de venta de ese semental después de tres años (CVS) y el número de posibles montas que se tendría para la inseminación por monta natural de las hembras; es decir, tres montas por hembra por un total de 6 posibles lavados en cada hembra y considerando una relación de 5 hembras por semental, lo cual arrojó un total de 90 montas; es importante mencionar que se considera que se adquiere el animal de buena calidad genética y solo se usa en la producción de embriones.

La suma de costos fijos y variables se determina como costos totales de operación (CTO), los cuales a su vez fueron divididos entre el número de embriones transferibles (ET) por oveja, cuyo resultado es el costo unitario de producción de un embrión (Lopes y Dos Santos, 2013).

5.4. Resultados

5.4.1. Comportamiento estral

La respuesta al tratamiento de sincronización estral fue favorable en los cuatro grupos, el total de las hembras asignadas a cada tratamiento mostraron signos de celo posterior al retiro del dispositivo impregnado con progesterona. El tiempo transcurrido entre el retiro de CIDR y la presentación de celo fue variable entre los grupos; sin embargo, únicamente las diferencias se presentaron entre los grupos FSH-MN y FSH-TRIP-IATF ($P < 0.05$) (Cuadro 2).

5.4.2. Respuesta a la ovulación múltiple

La respuesta al tratamiento de ovulación múltiple tuvo una gran variabilidad en los resultados. En primer lugar, se evaluó la tasa ovulatoria, como la respuesta del ovario mediante la cantidad de cuerpos lúteos, se observó efecto de la aplicación de Triptorelina en el grupo de hembras que se

empadraron mediante la monta, hubo diferencia entre el grupo FSH-MN y FSH-TRIP-MN ($P < 0.05$); al igual, se observó diferencia entre el grupo FSH-MN y FSH-TRIP-IATF ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Respuesta a la adición de GnRH y tipo de inseminación en la ovulación múltiple de ovejas Pelibuey

	FSH-MN (n=6)	FSH-TRIP- MN (n=6)	FSH-IATF (n=6)	FSH-TRIP- IATF (n=6)
<i>Comportamiento estral</i>				
Número de hembras en celo	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
Remoción CIDR a estro (h)	12.36±1.46 ^a	13.18±0.77 ^{ab}	16.5±1.50 ^{ab}	17.08±3.86 ^b
<i>Respuesta a superovulación</i>				
Tasa ovulatoria	8.66±1.85 ^a	16.00±5.40 ^{bc}	12.75±4.38 ^{ac}	13.5±2.84 ^{bc}
Embriones calidad 1	1±0.36 ^a	2.2±0.8 ^{ab}	2.75±1.43 ^b	3.75±0.62 ^b
Embriones transferibles	3.33±1.05 ^a	4.8±1.65 ^a	5.25±2.98 ^a	6.00±1.47 ^a
Ovocitos no fertilizados	0.5±0.22 ^a	1.6±1.6 ^a	0.0±0.00 ^a	0.0±0.00 ^a
% de recuperación	53.23±4.25 ^a	53.87±11.51 ^a	55.8±18.93 ^a	58.32±14.45 ^a
Literales diferentes en hileras difieren estadísticamente ($P < 0.05$).				

Al realizar la evaluación de la calidad de los embriones, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en el número de embriones calidad 1 en las hembras empadradas mediante monta natural al compararla con las hembras inseminadas y que no se les adiciono Triptorelina (FSH-MN vs. FSH-IATF); igualmente se detectaron diferencias al comparar el grupo FSH-MN con el grupo que se le adicionó Triptorelina y se empadró mediante inseminación (FSH-TRIP-IATF) ($P < 0.05$).

En la variable de embriones transferibles no se mostraron diferencias en cuanto al uso de agonista de GnRH y el tipo de empadre empleado. En el caso de analizar el tratamiento de FSH-MN vs. FSH-TRIP-IA se identificó que son iguales los resultados entre ambos tratamientos ($P=0.05$). En

el caso de la media en el número de ovocitos no fertilizados no existe diferencia entre los tratamientos empleados en el presente experimento ($P > 0.05$).

El número de estructuras colectadas en relación al total de cuerpos lúteos en el ovario se define como el porcentaje de recuperación, en este sentido no existen diferencias entre los tratamientos evaluados.

5.4.3. Costo de producción

Los gastos que se realizan en cada uno de los tratamientos de ovulación múltiple se desglosaron por cada uno de los rubros mostrados en el Cuadro 3. Existen rubros donde los gastos son iguales entre los tratamientos, los relacionados a sincronización y ovulación múltiple incrementan en los tratamientos que se les aplica Triptorelina por el costo de la dosis de esta hormona, así mismo en el rubro de mano de obra y alimentación por el costo que se requiere en la mano de obra del personal que insemina y apoya en este proceso, a diferencia de los de monta natural. En el caso de la depreciación, solamente se considera en los tratamientos de monta natural por la necesidad de contar con el semental en la misma explotación, en IATF se considera en los gastos por la compra de pajillas para inseminar.

Como se puede observar en el Cuadro 3, los costos totales de operación son muy similares en cada uno de los tratamientos, incrementándose únicamente en los tratamientos que se les aplicó Triptorelina (FSH-TRIP-MN, FSH-TRIP-IATF); sin embargo, el costo de producción por embrión es más bajo en los protocolos de IATF. En particular, esto fue debido principalmente al mayor número de embriones transferibles obtenidos por oveja.

Cuadro 3. Costo de producción por embrión, con la adición de GnRH y tipo de inseminación en ovejas Pelibuey

	FSH-MN	FSH-TRIP-MN	FSH-IATF	FSH-TRIP-IATF
<i>Gastos Variables (\$)</i>				
Sincronización y ovulación múltiple	1,063.00	1,302.00	1,063.00	1,302.00
Inseminación	0.00	0.00	470.20	470.20
Colecta de embriones	222.60	222.60	222.60	222.60
Mano de obra y alimentación	1,590.00	1,590.00	1,680.00	1,680.00
<i>Gastos Fijos (\$)</i>				
Depreciación hembras	833.30	833.30	833.30	833.30
Depreciación macho	88.90	88.90	0.00	0.00
Costos totales de operación (\$)	3,797.80	4,036.80	4,269.10	4,508.10
No. de embriones Transferibles	3.3	4.8	5.2	6.0
Costo de producción por embrión (\$)	1,150.85	841.00	813.16	751.35

5.5. Discusión

Una de los principales objetivos cuando se realiza la ovulación múltiple es la multiplicación de animales de alto valor genético de manera rápida; en este sentido el empleo de la inseminación artificial es una herramienta que apoya la multiplicación de estos animales. La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una herramienta importante, ya que reduce los costos implicados en la detección de celos en las hembras a empadrear. Sin embargo, el empleo de esta herramienta requiere de otros factores importantes para el éxito, el más importante es la sincronía de las hembras entre la ovulación y el momento de inseminación con la finalidad de obtener las mejores tasas de fertilidad, ya existe variabilidad entre el inicio de celo, el pico preovulatorio de LH y la ovulación en los tratamientos de ovulación múltiple (Veiga-Lopez *et al.*, 2008).

Considerando lo anterior, los resultados del presente estudio en relación a la respuesta de las hembras al protocolo de sincronización son adecuados, el 100 % de las hembras mostraron signos de celo. Van Cleeff *et al.* (1998) mencionan que los resultados son adecuados cuando más del 90 % de hembras muestran signos de celo en los programas de sincronización con CIDR. En otros estudios, se han reportado que la totalidad de las hembras presentan estró con el empleo de CIDR (Luther *et al.*, 2007; Menchaca *et al.*, 2009b), al igual que en ovejas Pelibuey con el uso de esponjas impregnadas con 40 mg de FGA (Avendaño-Reyes *et al.*, 2007). Con base en los resultados en el número de ovejas que mostraron celo, se puede comprobar que el tratamiento de sincronización de celo en protocolos de superovulación en ovejas Pelibuey es eficiente.

El tiempo transcurrido entre el retiro del CIDR y el inicio de celo en las ovejas puede afectar la eficiencia del uso de la IATF, ya que también influye el tiempo de ovulación de las ovejas con el tiempo en que es depositado el semen en el lumen del útero. En este sentido, el tiempo que transcurrió desde el retiro del dispositivo al inicio de celo es similar a las 13.5 ± 0.98 h que reporta McEvoy *et al.* (1996). De manera similar, Wierzchoś *et al.* (1992) reportan que después del retiro de CIDR, las ovejas manifestaron signos de celo en las primeras 20 h, pero son menores las 30.4 ± 1.7 h reportadas por Simonetti *et al.* (2008) al emplear protocolos de sincronización de celo con progestágenos y tratamientos de ovulación múltiple con FSH de origen ovino y ocho dosis a intervalos de 12 h. Por otra parte, en ovejas de pelo se reportan 26.1 ± 1.5 h a la manifestación de celo posterior al retiro de CIDR (Quintero-Elisea *et al.*, 2011). Estas variaciones en el tiempo de inicio de celos en protocolos de ovulación múltiple pueden estar influenciadas por la raza y el tipo de FSH que se emplea (Crosby, 1993) y la respuesta ovárica (D'Alessandro *et al.*, 1996).

La respuesta al protocolo de ovulación múltiple tuvo resultados importantes en los tratamientos FSH-MN y FSH-IATF y en aquellos donde se adicionó el agonista Triptorelina; la tasa ovulatoria

fue mayor en el tratamiento FSH-IATF. Este resultado es muy semejante a lo reportado por Jabbour *et al.* (1991) en el grupo testigo en un estudio realizado en primavera. Por otra parte, la tasa ovulatoria de los tratamientos con FSH solamente (FSH-MN: 8.66 ± 1.85 y FSH-IATF: 12.75 ± 4.38) es mayor a lo reportado por otros autores en protocolos de ovulación múltiple con CIDR por 9 días y FSH en ocho dosis decrecientes e IATF (7.2 ± 1.6 CL; Menchaca *et al.* 2009b) y lo reportado por Bettencourt *et al.* (2008) con pFSH en seis dosis decrecientes e IATF (6.8 ± 1.5 CL). La respuesta en el número de cuerpos lúteos se incrementa con la adición de Triptorelina en los grupos FSH-TRIP-MN: 16.00 ± 5.40 y FSH-TRIP-IATF: 13.5 ± 2.84 , el incremento en la tasa ovulatoria se ha reportado por otros autores al adicionar un agonista de GnRH 24 h posterior al retiro de CIDR (Menchaca *et al.* (2009b; Azawi y Al-Mola, 2011).

El número de embriones transferibles incrementó en el tratamiento FSH-TRIP-IATF comparado con los tres restantes; sin embargo, no se encontraron diferencias entre ellos. En otras investigaciones se reportan resultados similares en el número de embriones transferibles en el tratamiento FSH-MN cuando emplean FSH y eCG en los protocolos de superovulación (Simonetti *et al.*, 2008; Menchaca *et al.*, 2009b); 3.2 ± 0.5 y 3.3 ± 1.0 embriones, respectivamente. Simonetti *et al.* (2008) reportan 4.0 ± 0.8 embriones viables con 132 unidades de oFSH más 500UI de eCG; estos valores son similares a los obtenidos en el presente estudio con la adición de Triptorelina y bajo MN (FSH-TRIP-MN), los mismo autores al emplear un protocolo con 8 dosis decrecientes de oFSH, reportan un total de 5.5 ± 0.8 embriones viables, resultado muy similar al que se obtuvo en el tratamiento FSH-IATF.

Otra diferencia importante que se encontró en el presente estudio fue la diferencia en embriones calidad 1, la adición de Triptorelina y la IATF aumentó el número de embriones comparados con el grupos restantes; el número de embriones en el grupo FSH-TRIP-IATF es semejante a lo

reportado por Menchaca *et al.* (2009b), quienes obtuvieron 3.4 ± 0.4 embriones con CIDR + FSH + 200 UI de eCG.

Al analizar los resultados obtenidos en el número de embriones transferibles y ovocitos no fertilizados no existen diferencias entre los tratamientos con el empleo de monta natural e inseminación artificial, así como la adición de Triptorelina como agonista de GnRH. Utilizar la IATF a las 36 y 48 h es un protocolo viable, ya que el tiempo que transcurrió desde el inicio de celo a la IA va desde las 19 hasta las 24 h. Romero *et al.* (2015, datos no publicados) reportan que el pico preovulatorio de LH se da a las 28 h cuando se aplica un agonista de GnRH (Gonadorelina y Triptorelina) y 32 h en el tratamiento testigo, además que la ovulación se da entre las 23 - 25 h posterior al pico de LH (Cumming *et al.*, 1973). Considerando lo anterior, las ovejas de los tratamientos FSH-IA y FSH-TRIP-IA se estima ovularon entre las 51-57 h, por lo tanto en algunas de ellas puede estar desfasada la IATF con respecto a la ovulación; sin embargo, no existen diferencias en el número de embriones transferibles entre los tratamientos con MN y los de IATF. Otros autores reportan incremento en el número de embriones transferibles con IATF a la 36 y 48 h como en el presente trabajo comparado con monta natural (Azawi y Al-Mola, 2011).

5.6. Conclusión

En la raza Pelibuey, el empleo de protocolos de ovulación múltiple basados en CIDR-FSH-PGF_{2α} mas la adición de agonista de GnRH, Triptorelina (FSH-TRIP-IA), mejora la tasa ovulatoria de las ovejas, pero no existe diferencia en el número de embriones transferibles, pero si en el costo de producción de un embrión. En adición a lo anterior, el uso de la inseminación artificial a tiempo fijo a las 36 y 48 horas no mostró diferencia en el número de embriones transferibles comparado con la monta natural, en época reproductiva. Sin embargo, con la adición de Triptorelina, el costo

de producción de un embrión es menor comparado con los demás tratamientos; por lo tanto, resulta ser una alternativa en los programas de mejoramiento genético en animales Pelibuey, ya que permite optimizar el uso de sementales de elevado valor genético.

5.7. Referencias.

- Avendaño-Reyes, L., F. D. Álvarez-Valenzuela, L. Molina-Ramírez, R. Rangel-Santos, A. Correa-Calderón, J. Rodríguez-García, and T. R. Famula. 2007. Reproduction performance of Pelibuey ewes in response to estrus synchronization and artificial insemination in Northwestern Mexico. *J Anim Vet Adv* 6: 807-812.
- Azawi, O.I., and M.K. Al-Mola. 2011. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. *Trop. Anim. Health Prod* 43: 1351–1355.
- Bettencourt, E.M., C.M. Bettencourt, J. Chagas e Silva, P. Ferreira, C.I. Manito, C.M. Matos, R.J. Romão, 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.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51:105-116.
- Cognié, Y., G. Baril, N. Poulin, P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Crosby, T. F. 1993. Superovulation in sheep: the effects of pFSH type and ewe breed. *Theriogenology* 39: 205.
- Cumming, I. A., J.M. Buckmaster, J.R. Goding, C. G. Winfield, and R. W. Baxter. 1973. Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. *Bio Reprod* 9:24-29.
- D'Alessandro, A.G., G. Martemucci, F. Toteda, M. Gambacorta, and A. Manchisi. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. *Small Ruminant Res* 19:255-261.
- Fernandes SB, S.D. de Paula, F.H.N. Hilma Norberto de Paula, F.J Viana, and N.S. Assis dos Reis. 2010. Custos de Produção Agrícola: A metodologia da Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília. 60 pp

- Gonzales-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Souza, C.J.H., Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., Cocero, M.J., Baird, D.T. (2002). Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Dom. Anim* 37, 357-361.
- González-Bulnes A , D.T. Baird, B. K. Campbell, J.M. Cocero, M.R. García-García, K.E. Inskoop, A. López-Sebastián, S.A. McNeilly, J. Santiago-Moreno, J.H.C. Souza, and A. Veiga-López. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats *Reprod Fertil Dev* 16:421–435
- Jabbour HN, J.P. Ryan, G. Evans, W.M. Maxwell. 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod Fertil Dev* 3:699–707.
- Lopes M.A., G. Dos Santos. 2013. Análise de rentabilidade de fazendas leiteiras em regime de semiconfinamento com alta produção diária. *Informações Econômicas, SP.* 43:3. 65-74.
- Luther, J. S., A. T. Grazul-Bilska, J. D. Kirsch, R. M. Weigl, K. C. Kraft, C. Navanukraw, D. Pant, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2007. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Res* 72: 227-231.
- Maxwell, W. M. C., L.G. Butler., H.R. Wilson. 1984. Intra-uterine insemination of ewes with frozen semen. *J Agr Sci* 102: 233-235.
- McEvoy T. G., J.J. Robinson, R. P. Aitken, and I. S. Robertson. 1996. The effect of time of intrauterine insemination on the development and viability of embryos collected from superovulated ewes. *Theriogenology* 46: 727-738.
- Menchaca, A., M. Vilariño, A. Pinczak, S. Kmaid, and J.M. Saldaña. 2009b. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72:477-483.
- 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.
- Pinna A. E., F.Z. Brandão, A.S. Cavalcanti, A.M. Borges, A.P.P. Loureiro, and J.F. Fonseca. 2008. Fertilidade de ovelhas cíclicas submetidas à sincronização do estro utilizando implantes intravaginais (CIDR®) novos ou reutilizados. *Acta Scientiae Veterinariae* 36(Supl 2):581.
- Quintero-Elisea, J. A., U. Macías-Cruz, F.D. Álvarez-Valenzuela, A. Correa-Calderón, A. González-Reyna, F. A. Lucero-Magaña, and L. Avendaño-Reyes. 2011. The effects of time

and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Trop. Anim. Health Prod* 43:1567-1573.

Rubianes, E., R. Ungerfeld, C. Viñoles, A. Rivero, and G.P. Adams. 1997. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47: 1479-1488.

Simonetti L., F. Forcada, O.E. Rivera, N. Carou, R.H. Alberio, J.A. Abecia, and I. Palacin. 2008. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci* 104: 227-237.

Tervit HR, and P.G. Havik. 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zealand Vet J.* 24:138 –140

Van Cleeff, J., F.J. Karsch, and V. Padmanabhan. 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: 23-34.

Veiga-Lopez, A., T. Encinas, A.S. McNeilly, and A. Gonzalez-Bulnes. 2008. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. *Reprod Domest Anim* 43: 92-98.

Wierzchoś, E., M. Tischner, and M. Maffii, M. 1992. Superovulation of a low fecundity sheep breed using a porcine gonadotrophin extract with a defined LH content (Pluset). *Theriogenology* 38:147-152.

Wintenberg-Torres, S., and C. Sevellec. 1987. Atlas du developement embryonnaire precoce chez les ovins. INRA Station de Physiologie Animale. Jouy en Josas. Publ. Versailles. pp 51.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

6.1. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que la adición del agonista de GnRH, Triptorelina, 24 h posterior al retiro de CIDR en protocolos de ovulación múltiple basados con aplicaciones decrecientes de FSH, mejora la respuesta en la sincronización del pico preovulatorio de LH; incrementa la tasa ovulatoria y mejora la producción de embriones transferibles en ovejas Pelibuey. Además, la inseminación artificial a tiempo fijo por laparoscopia a las 36 y 48 h posterior a retiro de CIDR, como fue realizada en los protocolos de ovulación múltiple, es una alternativa viable para la producción de embriones a un costo menor, y puede ser realizada de esta manera en programas de transferencia de embriones a nivel comercial para la difusión de animales genéticamente superiores.

6.2. Recomendaciones

Con base en los estudios realizados, se sugieren las recomendaciones siguientes:

- Usar el agonista de GnRH, Triptorelina, en programas de ovulación múltiple en la raza Pelibuey, para sincronizar la ovulación y mejorar la respuesta embrionaria,
- Utilizar la inseminación artificial por laparoscopia a tiempo fijo (IATF) como una herramienta que permite eliminar el proceso de la detección de celos, cuando esto no es factible,
- Evaluar el uso de la Triptorelina en estudios posteriores con mayor número de animales por tratamiento,
- Realizar otros estudios para evaluar una sola aplicación de semen a las 48 h en los protocolos de IATF.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia gráfica del proceso de inseminación y proceso quirúrgico de la colecta de embriones



Extracción de semen



Limpieza y desinfección de área de inseminación



Momento de la inseminación artificial por laparoscopia.



Cirugía por laparotomía media ventral para recuperación de embriones



Exposición de útero y ovarios para determinación de tasa ovulatoria



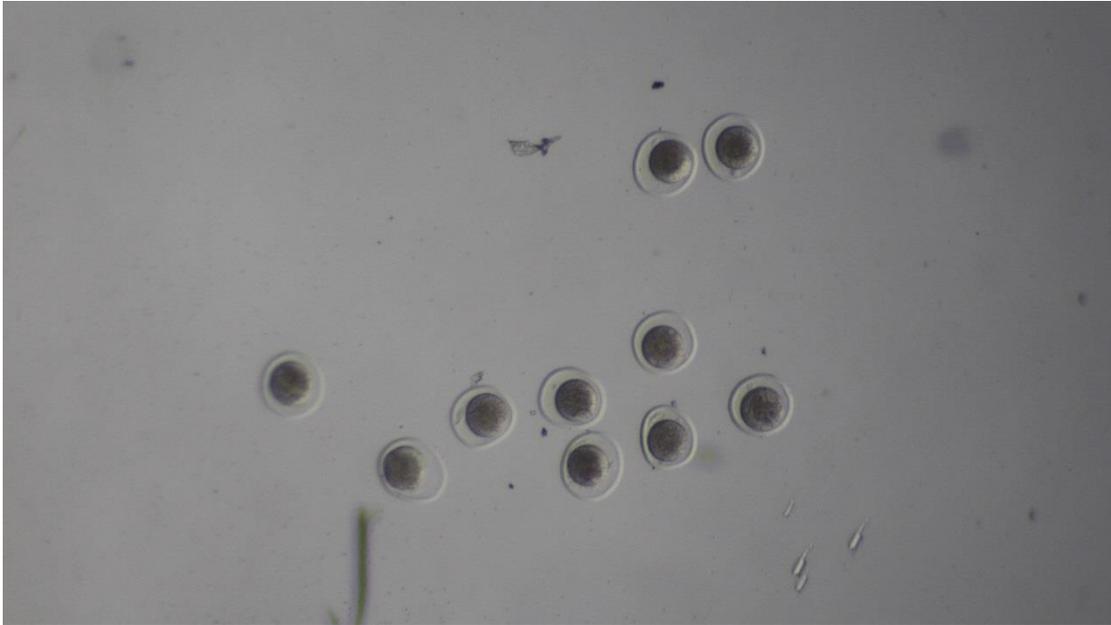
Colocación de sonda Foley y catéter Punzocat



Introducción de solución Hartmann y medio de colecta para recuperación de embriones



Búsqueda y clasificación de embriones



Estructuras colectadas para su evaluación y clasificación



Sutura de herida, aplicación de antibióticos y analgésicos

Anexo 2. Costo de material, hormonales y medicamentos empleados en tratamientos de IATF por laparoscopia

	FASE	PRODUCTOS	COSTO POR OVEJA	
			TESTIGO	TRIPTORELINA
A) COSTOS VARIABLES	SINCRONIZACION Y SUPEROVULACION	CIDR	84.00	84.00
		PROSTAGLANDINA	19.00	19.00
		FOLLTROPIN	960.00	960.00
		TRIPTORELINA		239.00
		SUBTOTAL	1,063.00	1,302.00
	INSEMINACION	LIDOCAINA	2.40	2.40
		NAVAJA RASURAR	6.00	6.00
		GASAS	4.00	4.00
		YODO	0.20	0.20
		BENZAL	0.20	0.20
		ALCOHOL	0.40	0.40
		DILUTOR	1.60	1.60
		AGUA DESTILADA	1.00	1.00
		PAJILLAS	5.00	5.00
		JERINGA	4.00	4.00
		TOPAZONE	8.40	8.40
		ANTIBIOTICO	30.00	30.00
		ASPIC	7.00	7.00
		DOSIS SEMEN	400.00	400.00
		SUBTOTAL	470.20	470.20
	COLECTA DE EMBRIONES	XILAZINA	8.94	8.94
		KETAMINA	18.00	18.00
		BISTURI	1.50	1.50
		CAMPO QUIRURGICO	1.50	1.50
		CINTA ADHESIVA	1.00	1.00
		YODO	0.10	0.10
		BENZAL	0.10	0.10
		ALCOHOL	0.20	0.20
		PUNZOCAT	3.00	3.00
		GASAS	3.60	3.60
		SONDA FOLEY	13.50	13.50
		MEDIO LAVADO	20.80	20.80
		SOLUCION SALINA	1.80	1.80
		TUBO COLECTA	8.20	8.20
		CATGUD	22.00	22.00
		NYLON	19.00	19.00
		DIPIRONA	9.00	9.00
		ANTIBIOTICO	36.50	36.50
		TOPAZNE	4.20	4.20
		CAJA PETRI	2.13	2.13
		CAJA 4 POZOS	6.40	6.40
		MEDIO HOLDING	17.50	17.50
GUANTES		6.60	6.60	
JERINGA		2.00	2.00	
JERINGA 50 ML		15.00	15.00	
SUBTOTAL		222.57	222.57	

Anexo 2. Continuación...

	FASE	PRODUCTOS	COSTO POR OVEJA	
			TESTIGO	TRIPTORELINA
A) COSTOS VARIABLES	MANO DE OBRA Y ALIMENTACION	MANO DE OBRA INSEMINACION	300.00	300.00
		APOYO INSEMINACION	200.00	200.00
		MANO OBRA LAVADO	500.00	500.00
		MANO OBRA APOYO LAVADO	200.00	200.00
		MANO OBRA CUIDADO ANIMALES	160.00	160.00
		ALIMENTACION HEMBRA	320.00	320.00
		<i>SUBTOTAL</i>	1,680.00	1,680.00
		TOTAL COSTOS VARIABLES	3,435.77	3,674.77
B) COSTOS FIJOS	DEPRECIACION HEMBRA	DEPRECIACION HEMBRA	833.33	833.33
		TOTAL COSTOS FIJOS	833.33	833.33
		COSTO TOTALES DE OPERACIÓN (A+B)	4,269.10	4,508.10
		No EMBRIONES TRANSFERIBLES	5.25	6.00
		COSTO UNITARIO DE EMBRION TRANSFERIBLE	813.16	751.35

Anexo 3. Costo de material, hormonales y medicamentos empleados en tratamientos de MN

	FASE	PRODUCTOS	COSTO POR OVEJA / TRATAMIENTO	
			TESTIGO	TRIPTORELINA
A) COSTOS VARIABLES	SINCRONIZACION Y SUPEROVULACION	CIDR	84.00	84.00
		PROSTAGLANDINA	19.00	19.00
		FOLLTROPIN	960.00	960.00
		TRIPTORELINA		239.00
		SUBTOTAL	1,063.00	1,302.00
	COLECTA DE EMBRIONES	XILAZINA	8.94	8.94
		KETAMINA	18.00	18.00
		BISTURI	1.50	1.50
		CAMPO QUIRURGICO	1.50	1.50
		CINTA ADHESIVA	1.00	1.00
		YODO	0.10	0.10
		BENZAL	0.10	0.10
		ALCOHOL	0.20	0.20
		PUNZOCAT	3.00	3.00
		GASAS	3.60	3.60
		SONDA FOLEY	13.50	13.50
		MEDIO LAVADO	20.80	20.80
		SOLUCION SALINA	1.80	1.80
		TUBO COLECTA	8.20	8.20
		CATGUD	22.00	22.00
		NYLON	19.00	19.00
		DIPIRONA	9.00	9.00
		ANTIBIOTICO	36.50	36.50
		TOPAZNE	4.20	4.20
		CAJA PETRI	2.13	2.13
		CAJA 4 POZOS	6.40	6.40
		MEDIO HOLDING	17.50	17.50
		GUANTES	6.60	6.60
	JERINGA	2.00	2.00	
	JERINGA 50 ML	15.00	15.00	
	SUBTOTAL	222.57	222.57	
	MANO DE OBRA Y ALIMENTACION	MANO DE OBRA MANEJO MONTA CONTROLADA	90.00	90.00
		MANO OBRA LAVADO	500.00	500.00
MANO OBRA APOYO LAVADO		200.00	200.00	
MANO OBRA CUIDADO ANIMALES		160.00	160.00	
ALIMENTACION MACHO		320.00	320.00	
ALIMENTACION HEMBRA		320.00	320.00	
SUBTOTAL		1,590.00	1,590.00	
TOTAL COSTOS VARIABLES	2,875.57	3,114.57		
B) COSTOS FIJOS	DEPRECIACION	DEPRECIACION HEMBRA	833.33	833.33
		DEPRECIACION MACHO	88.89	88.89
	TOTAL COSTOS FIJOS	922.22	922.22	
		COSTO TOTALES DE OPERACIÓN (A+B)	3,797.79	4,036.79
		No EMBRIONES TRANSFERIBLES	3.30	4.80
		{ kPBCOSTO UNITARIO DE EMBRION TRANSFERIBLE	1,150.85	841.00