COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA C PROTEGIDA PARA MEJORAR LA REPRODUCCIÓN Y REDUCIR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN OVEJAS

KAREN PLIEGO PLIEGO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Karen Pliego Pliego, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Ma. Teresa Sánchez-Torres Esqueda, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA C PROTEGIDA PARA MEJORAR LA REPRODUCCIÓN Y REDUCIR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN OVEJAS

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 16 de Mayo de 2018

Firma del
Alumno (a)

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA C PROTEGIDA PARA MEJORAR LA REPRODUCCIÓN Y REDUCIR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN OVEJAS,** realizada por la alumna: KAREN PLIEGO PLIEGO**,** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A) _____
DRA. MA. TERESA SÁNCHEZ-TORRES ESQUEDA

ASESOR (A) _____
DRA. MARÍA MAGDALENA CROSBY GALVÁN

ASESOR (A) _____
DR. TEODULO SALINAS RIOS

ASESOR (A) _____
M.C. CUAUHTÉMOC NAVA CUELLAR

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2018

SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA C PROTEGIDA PARA MEJORAR LA REPRODUCCIÓN Y REDUCIR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN OVEJAS

Karen Pliego Pliego, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018.

RESUMEN

La vitamina C tiene funciones importantes tales como cofactor en la síntesis de colágeno, producción de hormonas esteroideas y antioxidantes, siendo estas capacidades de gran relevancia para la reproducción. La finalidad de la presente investigación fue evaluar el efecto de la administración oral de vitamina C protegida con etilcelulosa a diferentes dosis como estrategia para mejorar las variables reproductivas y estado antioxidante en ovejas multíparas. La suplementación de vitamina se realizó desde la sincronización del estro hasta un día antes de diagnóstico de gestación y se evaluaron las siguientes variables: presentación de estro, porcentaje de gestación, retorno a estro, fecundidad, prolificidad, peso de cordero al nacimiento, capacidad antioxidante, lipoperoxidación, concentración de progesterona, insulina y glucosa. Se utilizaron 63 ovejas las cuales fueron agrupadas y distribuidas en tres tratamientos, T0: 0 g de vitamina C (n=21), T1: 3 g de vitamina C (n=21), T2: 6 g de vitamina C (n=21). La suplementación se realizó desde la sincronización de estro hasta un día antes del diagnóstico de gestación, con un total de 39 días. Para la sincronización de estros se les insertó un dispositivo intra-vaginal de progesterona (CIDR, impregnado con 0.3 g de progesterona) el cual permaneció intravaginalmente por 11 días. Los estros se detectaron a partir de las 24 horas después del retiro del CIDR, realizando las montas a las 12 y 24 horas posteriores a la detección del celo. Se muestreó a diferentes tiempos durante la suplementación de la vitamina C para determinar concentración de progesterona e insulina, estado oxidativo, ácido ascórbico y glucosa. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de Chi cuadrada para las variables porcentaje de gestación, presentación y retorno de estro. Para fecundidad y prolificidad se utilizó un modelo estadístico de regresión de Poisson usando el procedimiento GENMOD, el resto de las variables se examinaron mediante un análisis de varianza por medio de PROC GLM y PROC MIXED con la prueba de comparacin de Tukey del paquete

estadístico SAS. La suplementación de vitamina C no afectó el porcentaje de gestación, presentación y retorno a estro, fecundidad, prolificidad, peso de los corderos al nacimiento, lipoperoxidación, concentración de progesterona, glucosa e insulina ($p>0.05$). En el caso de ácido ascórbico se observó que el T1 y T2 fueron significativamente diferentes al T0 ($p<0.05$) obteniendo valores mayores en suero sanguíneo (13.02, 12.85 y 10.76 µg/ mL, respectivamente). En capacidad antioxidante también se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$) siendo el T1 más alto que el T2 y el T0 (284.73, 261.68 y 244.39 nmol/ mL, respectivamente). Por lo que se puede concluir que la suplementación de vitamina C protegida con etilcelulosa durante esta etapa no afectó las variables reproductivas evaluadas y mejora la capacidad antioxidante en ovejas durante sincronización de estro e inicio de gestación.

Palabras clave: *vitamina C, capacidad antioxidante, fertilidad, ovejas*

SUPPLEMENTATION OF COATED VITAMIN C TO IMPROVE REPRODUCTION AND REDUCE OXIDATIVE STRESS IN EWES

Karen Pliego Pliego, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018.

ABSTRACT

Vitamin C has important functions such as cofactor in the synthesis of collagen, cofactor in the synthesis of steroid hormones and as an antioxidant, these of which are of great relevance for reproduction. The purpose of this investigation was to evaluate the effect of oral administration of vitamin C coated with ethylcellulose at different doses, as a strategy to improve reproductive variables and antioxidant status in multiparous ewes. The vitamin supplementation was performed from the synchronization of estrus until a day prior to the diagnosis of gestation, and the following variables were evaluated: presentation of estrus, the percentage of gestation, return to estrus, fecundity, prolificacy, weight of lamb at birth, antioxidant capacity, lipid oxidation, progesterone concentration, insulin and glucose. Sixty-three sheep were randomly distributed into three treatments, T0: 0 g of vitamin C (n = 21), T1: 3 g of vitamin C (n = 21), T2: 6 g of vitamin C (n = 21). The supplementation was performed from the synchronization of estrus until a day prior to the diagnosis of gestation, with a total of 39 days. A progesterone intra-vaginal device (CIDR, impregnated with 0.3 g of progesterone) was inserted for the synchronization of estrus, which remained intravaginally for 11 days. The estrus were detected 24 hours after the withdrawal of the CIDR, giving the services at 12 and 24 hours after the detection of estrus. It was sampled at different times during the supplementation of vitamin C to determine hormones, oxidative status, ascorbic acid and glucose. The analysis of the data was performed using the Chi square test for the variables of gestation percentage, presentation and return of estrus. For fecundity and prolificacy, a Poisson regression statistical model was used using the GENMOD procedure, the rest of the variables were examined by an analysis of variance by means of PROC GLM and PROC MIXED with the Tukey comparison test of the SAS statistical package. Vitamin C supplementation did not affect the percentage of gestation, presentation and return to estrus, fecundity, prolificacy,

weight of the lambs at birth, lipid oxidation, progesterone concentration, glucose and insulin ($p > 0.05$). For the variable of ascorbic acid, it was observed that T1 and T2 were significantly different to T0 ($p < 0.05$), obtaining higher values in blood serum (13.02, 12.85 and 10.76 µg / mL, respectively). In antioxidant capacity, significant differences were also found between treatments ($p < 0.05$), with T1 being higher than T2 and T0 (284.73, 261.68 and 244.39 nmol / mL, respectively). Therefore, it can be concluded that the supplementation of vitamin C protected with ethylcellulose during this stage did not affect the reproductive parameters and improves the antioxidant capacity in sheep during synchronization of estrus and onset of gestation.

Key words: *vitamin C, antioxidant capacity, fertility, ewe*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme la facilidad económica para solventar el proceso de formación profesional.

Al Colegio de Postgraduados, especialmente al posgrado de Ganadería, por abrirme las puertas y por el financiamiento parcial otorgado para poder culminar mis estudios de posgrado.

A la Dra. María Teresa Sánchez-Torres Esqueda, por concederme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por las enseñanzas durante el proceso, por su amistad y el gran apoyo otorgado en la dirección de esta tesis.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván, por sus aportes efectuados en el laboratorio, la escritura y culminación de esta tesis.

Al Dr. Teódulo Salinas Ríos, por su excelente y constante apoyo recibido durante el proceso de investigación.

Al M.C. Cuauhtémoc Nava Cuellar, por su amistad, disponibilidad y valioso apoyo en laboratorio fue esencial para la realización del trabajo de investigación.

Al MVZ José Luis Cordero Mora, por su valiosa participación en el proyecto de investigación y por todos los conocimientos y experiencias trasmitidas.

Al biólogo Mario Cárdenas León, por su total disposición y apoyo para la realización de pruebas de laboratorio.

A todos mis amigos y compañeros que encontré durante mi estancia en el Colegio de Posgraduados, quienes con su apoyo y cariño hicieron esta etapa muy agradable.

DEDICATORIA

A mis padres, **LUIS ANTONIO PLIEGO TLAZOLA** y **EMMA PLIEGO SÁNCHEZ** por siempre creer en mí, por su gran esfuerzo en sacarme adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre han estado ayudándome en todo momento. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su trabajo, fortaleza y todo lo que han hecho de mí.

A mis hermanos, **CYNTHIA PLIEGO PLIEGO** y **LUIS S. PLIEGO PLIEGO**, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida, los quiero mucho.

CONTENIDO

RESUMEN iv
ABSTRACT vi
LISTA DE CUADROS xii
LISTA DE FIGURAS xiii
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN DE LITERATURA 3
2.1 Ovinocultura en México 3
2.2 Estacionalidad de las ovejas 4
2.3 Eventos endocrinos durante el ciclo estral 5
2.3.1 Fase folicular (Proestro y estro) 5
2.3.2Fase lutea (metaestro y diestro) 6
2.4 Sincronización de estros 8
2.4.1 Progesterona 9
2.4.2 Prostaglandinas 10
2.5 Vitaminas 11
2.6 Vitamina C 14
2.7 Vitamina C en rumiantes 16
2.8 Vitamina C y reproducción 17
2.8.1 Síntesis de colágeno 19
2.9 Antioxidantes 20
2.9.1 Radicales libres 21
2.9.2 Estrés oxidativo 21
2.9.3 Estrés oxidativo en gestación 22
III. HIPÓTESIS 23
IV. OBJETIVOS 23
V. MATERIALES Y MÉTODOS 24
5.1 Localización 24
5.2 Animales y alimentación 24
5.3 Sincronización de estros 24
5.4 Tratamientos 26
5.5 Muestreos 27
5.6 VARIABLES EVALUADAS 27

5.6.1 Capacidad antioxidante 27
5.6.2 Lipoperoxidación 28
5.6.3 Ácido ascórbico 28
5.6.4 Progesterona 29
5.6.5 Insulina 29
5.6.6 Glucosa 29
5.7 Variables reproductivas **29**
5.7.1 Presentación de estro 29
5.7.2 Retorno a estro 30
5.7.3 Diagnóstico de gestación 30
5.7.4 Fecundidad 30
5.7.5 Prolificidad 30
5.7.6 Peso de cordero al nacimiento 30
5.8 Análisis estadístico **30**
VI. RESULTADOS **32**
6.1 Variables reproductivas **32**
6.1.1 Presentación de estro 32
6.1.2 Retorno a estro 32
6.1.3 Porcentaje de gestación 32
6.1.4 Fecundidad y prolificidad 32
6.1.5 Peso de codero al nacimiento 32
6.2 Capacidad antioxidante **33**
6.3 Lipoperoxidación **34**
6.4 Ácido ascórbico **35**
6.5 Progesterona **36**
6.6 Glucosa e insulina **37**
VII. DISCUSIÓN **40**
7.1 Respuesta reproductiva **40**
7.2 Estado oxidativo y ácido ascórbico **42**
7.3 Progesterona **45**
7.4 Glucosa e insulina **46**
VIII. CONCLUSIÓN **49**
IX. LITERATURA CITADA **50**

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Las vitaminas: sustancias activas, precursores y funciones 13

Cuadro 2. Concentraciones de vitamina C en algunos alimentos crudos..... 15

Cuadro 3. Composición del flushing proporcionado a las ovejas durante la suplementación de vitamina C protegida 25

Cuadro 4. Variables reproductivas en ovejas sincronizadas y suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 33

Cuadro 5. Concentración de capacidad antioxidante y lipoperoxidación en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con vitamina C protegida 34

Cuadro 6. Concentración de ácido ascórbico en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 35

Cuadro 7. Concentraciones de glucosa e insulina en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo de sincronización y muestreos realizados durante la suplementación de vitamina C protegida a ovejas 26

Figura 2. Capacidad antioxidante en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida..... 34

Figura 3. Concentraciones de lipoperoxidación en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 35

Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 36

Figura 5. Concentración de progesterona en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 37

Figura 6. Concentraciones de glucosa en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 38

Figura 7. Concentración de insulina en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida 39

I. INTRODUCCIÓN

La ovinocultura a nivel mundial es de gran importancia, ya que ocupa el cuarto lugar del consumo de cárnicos (FAO, 2014). Sin embargo, muchas veces las explotaciones se ven inmersas en diversos problemas ocasionando que el rendimiento sea deficiente. Países como Australia y Nueva Zelanda han reducido su inventario de ovinos hasta un 18 %, siendo los mayores exportadores mundialmente. En México, a pesar de que en los últimos años se han utilizado nuevas estrategias solamente se ha logrado incrementar un 70% de la carne ovina que se consume (Arteaga, 2012).

Para lograr mejorar la producción y el manejo, es necesario conocer a fondo los requerimientos nutritivos y la fisiología de estos animales. El asegurar gestaciones en la época con mayor actividad reproductiva es de gran importancia, ya que, de lo contrario, se ocasiona grandes pérdidas económicas. La principal causa de pérdida de gestaciones en rumiantes es la muerte embrionaria temprana. En ovejas, cerca del 20 % de los embriones muere en los quince días siguientes a la fertilización (Ramón, 1997). Se han utilizado diversas estrategias para mejorar las variables reproductivas, como la inducción de estros mediante el uso de la sincronización de ciclos estrales, trasferencia de embriones e inseminación artificial, entre otras, las cuales han permitido incrementar la eficiencia reproductiva (Amiridis y Cseh, 2012). Por otra parte, también se han utilizado estrategias nutritivas para optimizar la reproducción, aumentando la cantidad y calidad de alimentos para mejorar la condición corporal en determinados momentos fisiológicos del animal. Se ha manifestado que la ingestión de energía y proteína influye de manera positiva en la reproducción, además los minerales y las vitaminas también se han considerado importantes en este aspecto (Hurley y Doane, 1989; Mantecón *et al.,* 2003).

Las vitaminas son sustancias vitales, su importancia se debe a que algunos organismos no las pueden sintetizar o algunas veces se sintetizan, pero no en las cantidades adecuadas, y deben de ser adquiridas de manera exógena. Debido a que sus composiciones químicas y su participación en procesos metabólicos son muy diversas, se han clasificado de acuerdo a su solubilidad en lípidos liposolubles

e hidrosolubles. Las vitaminas liposolubles, no se sintetizan en el animal e incluyen a la vitamina A, E, K y D. Por el contrario, las vitaminas del complejo B y C, en los rumiantes no se incluyen en la dieta ya que se sintetizan en el organismo y se asume que en las cantidades adecuadas (Nelson y Cox, 2009; Matsui, 2012).

La vitamina C ha sido relacionada estrechamente con la reproducción ya que favorece la síntesis de colágeno, síntesis de hormonas esteroideas y por su capacidad antioxidante (Luck *et al.,* 1995). Sin embargo, no existen reportes de su función específica en la reproducción en ovejas. Por ello, el objetivo del presente trabajo es la suplementación de vitamina C durante la fase de sincronización e implantación del embrión para evaluar su efecto en las variables reproductivas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura en México

México cuenta con una gran diversidad de climas, una orografía muy heterogénea con diferentes tipos de suelos y presenta una enorme variabilidad socioeconómica, aun dentro de un mismo medio rural (Delgadillo y Orozco, 2001; INEGI, 2012). Estos factores hacen que en nuestro país se presenten diversos sistemas de producción ovina, propias de cada región que se determinan de acuerdo a la disponibilidad de recursos y a los hábitos del consumo de los productos ovinos.

Los principales sistemas de producción pecuaria comprenden a los sistemas intensivos, mixtos y de pastoreo (Seré y Steinfeld, 1996):

Los sistemas intensivos se caracterizan por mantener a los animales en áreas determinadas para cada etapa fisiológica, donde se proporcionan suministros de alimento externos que cumplen con los requerimientos nutricionales adecuados para el animal (FAO, 2014).

Los sistemas de producción mixta se basan en una combinación de pastoreo con el confinamiento en corral, este sistema se debe realizar de acuerdo a los requerimientos alimenticios de los animales. Por ejemplo, durante el día el hato se introduce en praderas (gramíneas y leguminosas) y durante la tarde-noche se mantiene al rebaño en corrales donde son complementadas con rastrojos, esquilmos agrícolas, grano o alimento comercial (Partida de la Peña *et al.,* 2003).

Los sistemas de pastoreo se caracterizan por suministrar más del 90 % de forraje como alimento a los animales, no se proporcionan complementos alimenticios más que sales minerales y muy esporádicamente algún tipo de subproducto agrícola (FAO, 2014).

Lo anterior implica que la heterogeneidad de los sistemas de producción influye en la calidad de los productos ovinos, lo cual hace necesario dirigir la producción nacional hacia una condición más uniforme, para poder satisfacer las exigencias actuales y futuras del mercado interno (Partida de la Peña *et al.,* 2003).

El inventario ovino en México se ha incrementado considerablemente en la última década, pasando de 6 819 771 ovinos en 2003 a 8 405 902 en el 2012. El estado de México es el principal productor con 1 326 982, seguido por Hidalgo con 1 162

556, Veracruz con 664 258 y Oaxaca con 527 369 ovinos (SIAP, 2012). De 1999 al 2009 la producción de carne pasó de 31 000 a 59 000 toneladas, parte de esta mayor producción se ha debido a la tecnificación en la explotación de pie de cría y engordas (SIAP, 2012). A pesar de eso existe un incremento de 5.9 % en la demanda anual, por lo que más del 50% de la demanda se cubre con importaciones (SAGARPA, 2014). La producción de carne de ovinos en México no logra abastecer la demanda nacional, por lo que en el 2008 se importaron alrededor de 35 000 toneladas a precios más bajos que los del mercado nacional (Martínez *et al*., 2010).

2.2 Estacionalidad de las ovejas

La estacionalidad de la reproducción es un mecanismo de adaptación desarrollado por algunos mamíferos como estrategia para aumentar la supervivencia de las crías, de tal manera que los nacimientos ocurran en la época más favorable del año (Karsch *et al.,* 1986; Malpaux *et al.,* 1996), usualmente primavera, permitiéndole a la cría el crecimiento bajo condiciones confortables de temperatura y disponibilidad de alimento (Thiery *et al.,* 2002).

El fotoperiodo es el factor ambiental primario que regula estos eventos. La oveja posee un sistema neurofisiológico capaz de transformar la señal luminosa en una señal hormonal a través de la síntesis y secreción de melatonina, por lo tanto, la duración de horas luz, sincroniza el ciclo reproductivo anual de la oveja (Williams y Helliwell, 1993; McMillen *et al.,* 1995; Arendt, 1998; Thiery *et al.,* 2002). Los ovinos presentan anualmente dos etapas fisiológicas bien definidas (Barrell *et al.,* 1992). La primera es la fase de anestro estacional, con ausencia de ciclos estrales regulares, receptividad sexual y ovulación en la hembra, mientras que en el macho se disminuye la espermatogénesis y la libido. La otra etapa fisiológica, conocida como época reproductiva, se caracteriza por la presentación del ciclo estral, receptividad sexual y ovulación en la hembra y ovulación en la hembra; en el macho, se aumenta la espermatogénesis y la libido (Legan y Karsch, 1979; Karsch *et al.,* 1986; Malpaux *et al.,* 1996).

2.3 Eventos endocrinos durante el ciclo estral

El ciclo estral de la hembra consta de cuatro fases que son proestro, estro, metaestro y diestro. Cada una de estas etapas se subdivide en la fase folicular la cual incluye al proestro y al estro, y la fase luteal que incluye al metaestro y al diestro (Senger, 1997). Estos sucesos son regulados por hormonas secretadas por el hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropinas [GnRH]), hipófisis anterior (hormona folículo estimulante [FSH] y hormona luteinizante [LH]), ovario (estradiol), cuerpo lúteo (progesterona) y útero (prostaglandina $F_2\alpha$ [$PGF_2\alpha$]). Estas hormonas sirven como mensajeros químicos que viajan a través del torrente sanguíneo a tejidos específicos los cuales contienen receptores que son específicos de la hormona y regulan las fases del ciclo estral (Lamb *et al.,* 2010).

2.3.1 Fase folicular (Proestro y estro)

El proestro se inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y termina con el inicio del estro, tiene una duración de dos a cinco días, dependiendo la especie, en ovejas dura de dos a tres días. Esta etapa se identifica por una importante transición endocrina, que se caracteriza por la disminución en las concentraciones de progesterona como consecuencia de la regresión lútea y la emergencia y crecimiento del folículo ovulatorio que ocasiona el aumento en la concentración de estrógenos (Atuesta y Diaza, 2011), teniendo como consecuencia el aumento de las frecuencias de los pulsos de LH. La producción de estradiol folicular se debe a las acciones de la LH y FSH sobre las células de la teca y de la granulosa (Fortune, 1986; Fortune y Quirk, 1988).

Los folículos constan de dos capas de células, una interna que está en contacto con el ovulo llamadas células de la granulosa y una externa llamada células de la teca; entre las dos existe una membrana llamada membrana basal. Estos dos tipos de células trabajan en conjunto durante el desarrollo folicular para producir estrógenos. El estradiol del folículo preovulatorio se incrementa hasta alcanzar y estimular los centros nerviosos del hipotálamo que controlan las manifestaciones externas de celo (Richards, 1980). Es en esta etapa donde los folículos son reclutados para la

ovulación y el aparato reproductivo de la hembra se prepara para el comienzo del estro y el apareamiento (Shearer, 1992).

El estro se define como un periodo de actividad y receptividad sexual, en donde los principales signos son que la hembra se quede inmóvil al momento de ser montada por el macho, lordosis (arqueamiento del lomo), inquietud, inflamación y secreción de moco de la vulva (Shearer, 1992). La duración de celo es muy variable entre los animales, en ovejas se maneja un promedio de 18 a 48 horas (Caraty *et al.,* 2002).

El aumento de la concentración sanguínea de estradiol después de la luteólisis, inicia con el comportamiento del celo (Wiltbank *et al.,* 2012), provocando el aumento de las contracciones uterinas las cuales facilitan el transporte de los espermatozoides y del ovulo. Los altos niveles de estradiol afectan también a centros endocrinos del hipotálamo liberando a la GnRH y ésta a su vez ayuda a que se secrete la FSH y LH de la adenohipófisis. La oleada preovulatoria de gonadotropinas ayuda a la meiosis dentro del ovocito, ruptura folicular y luteinización de las células foliculares, eventos críticos para el establecimiento de la gestación (Galway *et al.,* 1990).

El incremento de las pulsaciones de LH se inician después de que se hayan iniciado los signos de estro y comienza el proceso de ovulación (Lucy, 2006). La ovulación en la oveja y la vaca es un proceso espontáneo que no requiere coito, en la oveja ocurre entre las 24 a 30 horas después del inicio del estro conductual (Senger, 1997).

2.3.2 Fase lutea (metaestro y diestro)

El metaestro es el período entre la ovulación y la formación funcional del cuerpo lúteo. Durante esta fase los restos del folículo ovulado se transforman en una glándula endocrina llamada cuerpo lúteo, esta etapa se inicia inmediatamente después de finalizada la ovulación, teniendo una duración de tres a cinco días (Atuesta y Diaza, 2011).

La formación del cuerpo lúteo es iniciada por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y las células de la granulosa del folículo preovulatorio llamándose proceso de luteinización, estos cambios ocurren después

del pico preovulatorio de LH (Berisha y Schams, 2005). En la mayoría de los mamíferos, las células de la granulosa pasan a ser células luteales grandes, y aquellas derivadas de las células de la teca se transformarán en células luteales pequeñas (Rippe, 2009). El crecimiento del tejido luteal depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y del establecimiento de un soporte sanguíneo funcional (Berisha y Schams, 2005). La intensidad del flujo sanguíneo dentro del cuerpo lúteo alcanza su pico de dos a tres días después de la ovulación; así, la mayoría de las células esteroidogénicas del cuerpo lúteo maduro están en contacto con uno o más capilares (Reynolds *et al.,* 2000; Acosta y Miyamoto, 2004). El crecimiento de los nuevos capilares sanguíneos para dar soporte al desarrollo de nuevas células luteales, son potenciados por la angiotensina II y por factores de crecimiento que inducen angiogénesis como el factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico-1 (FGF-1) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), siendo de igual forma potentes estimuladores para la secreción de progesterona y oxitocina (Schams y Berisha, 2004). El diestro es la etapa más larga del ciclo estral y es el periodo de tiempo donde el cuerpo lúteo es totalmente funcional y la secreción de progesterona es alta. El diestro termina cuando se destruye el cuerpo lúteo (lúteolisis). Las altas concentraciones de progesterona en el útero provocan cambios en el endometrio para favorecer la implantación y el desarrollo embrionario, si este fuera el caso. El diestro usualmente tarda de 10 a 14 días, su duración está relacionada con el tiempo de funcionalidad del cuerpo lúteo (Shearer, 1992).

La regulación de la secreción de progesterona está controlada por un equilibrio de estímulos: uno luteotrópico, que estimula la secreción de progesterona, y otro luteolítico, que inhibe a la progesterona. La hormona LH es considerada luteotrópica, debido a que los receptores luteales de la LH se relacionan con los cambios en la secreción de progesterona y el crecimiento del cuerpo lúteo (Niswender *et al.,* 2000). En la oveja, las concentraciones fisiológicas de LH incrementan la secreción de progesterona de las células luteales pequeñas, pero no de las células luteales grandes, aunque se ha demostrado que ambos tipos celulares contienen receptores para LH (Niswender *et al.,* 2000).

El cuerpo lúteo recibe la mayoría del flujo sanguíneo del ovario, esta alta irrigación se relaciona con la cantidad de progesterona producida y secretada. Los niveles de progesterona más altos se alcanzan alrededor del día diez del ciclo estral y se mantienen hasta el día 16 o 18 del ciclo, dependiendo de la presencia o no de un embrión. En el caso de que la hembra quedara preñada, el cuerpo lúteo se mantiene, los niveles de progesterona permanecen altos y se bloquea la reaparición del ciclo estral. El embrión llega al útero entre los días tres a cuatro después de la ovulación, durante los siguientes 10 a 12 días el embrión crecerá rápidamente y comenzará la formación de placenta. La presencia de estas células embrionarias son las responsables de producir una señal química que bloquea a la producción de $PGF_2\alpha$ por parte del útero, bloqueando la regresión del cuerpo lúteo al retorno del ciclo estral, proceso al que se conoce como reconocimiento materno (Rippe, 2009; Lamb *et al.,* 2010). En el caso que la hembra no se encuentre preñada el cuerpo lúteo es inducido a su regresión por la acción de las $PGF_2\alpha$. Al ver ausencia de un embrión, las concentraciones de $PGF_2\alpha$ se incrementan durante la parte final del diestro. Las prostaglandinas $F_2\alpha$ secretadas por el útero se transportan por la vena útero-ovárica a la arteria ovárica por un mecanismo de contracorriente, llevadas al cuerpo lúteo (McCracken *et al.,* 1972; Hixon y Hansel, 1974). Con la regresión del cuerpo lúteo, comienza la disminución de los niveles de progesterona y con ello el final de la fase lútea, reiniciándose el proestro.

2.4 Sincronización de estros

Las estrategias que se manejan para la sincronización de estros, que a menudo se utilizan en combinación son: efecto macho/hembra y los tratamientos hormonales. En los protocolos de sincronización se usan hormonas naturales o sintéticas las cuales alteran el ciclo estral afectando a estructuras del ovario (folículos y cuerpo lúteo), utilizados con el fin de que se logre una respuesta estral en un alto porcentaje de animales tratados, en un intervalo corto de tiempo para obtener un alto porcentaje de gestaciones (Rasby y Funston, 2010).

Se considera que la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores de manejo para mejorar la rentabilidad en hatos de animales. La tasa de gestaciones

y el intervalo entre partos son dos variables que afectan la producción y economía de las granjas. Para lograr ser más competitivos, los protocolos de sincronización apropiados tienen que ser diseñados con el propósito de reducir el intervalo entre partos, producir grupos de crías homogéneos en épocas del año preestablecidas, y la obtención de partos múltiples (González-Stagnaro, 1993; Silva *et al.,* 2010).

Dos enfoques básicos se han considerado para la sincronización del estro y la ovulación, el uso de progestágenos y el de prostaglandinas. Los progestágenos imitan la fase lútea, impidiendo la ovulación y la manifestación de celo, y las prostaglandinas $F_2\alpha$ que causan la regresión lútea, sincronizando así el inicio de una fase folicular (Quintans, 2000; Gonzalez-Bulnes *et al.,* 2005).

2.4.1 Progesterona

Los progestágenos son análogos sintéticos de la progesterona que actúan inhibiendo la acción de las gonadotropinas, y en consecuencia el desarrollo folicular y la ovulación, ya que imitan los efectos naturales de la progesterona que impiden la ovulación y prolongan la fase lútea. Por ello, el control de la existencia del cuerpo lúteo o la manipulación de las concentraciones de progesterona en circulación permiten la regulación del estro y la ovulación (Hansel y Convey, 1983).

Las formas comerciales más comunes de progestágenos son acetato de fluorogestona (FGA) *y* acetato de medroxiprogesterona (MAP), los dos siendo inhibidores temporales efectivos del ciclo estral (Abecia *et al.,* 2012). Los progestágenos pueden ser administrados por medio de implantes subcutáneos o de dispositivos intravaginales. Los dispositivos intravaginales, constituyen el vehículo más común y practico de la administración de progestágenos. El dispositivo de liberación controlada de progesterona intravaginal (CIDR, conteniendo 0.30 g de progesterona) aumenta las concentraciones de progesterona en plasma rápidamente después de su inserción, alcanzando su máxima concentración tres días después de la inserción y posteriormente disminuye gradualmente (Manes y Ugerfeld*,* 2015).

Las hembras empiezan a mostrar estro aproximadamente 24 horas después de remover el dispositivo (Martínez-Tinajero *et al.,* 2008). En ovejas los CIDRs se

insertaban intravaginalmente por 12 a 14 días, pero para minimizar el tiempo de permanencia del dispositivo CIDR, se coloca por seis días, sin embargo, este periodo es menor a la vida media de un posible cuerpo lúteo en el ovario, lo cual se requiere de la aplicación de una dosis de prostaglandinas $F_2\alpha$ en el protocolo de sincronización para inducir la lisis de tal cuerpo lúteo (Letelier *et al.,* 2009).

2.4.2 Prostaglandinas

Las prostaglandinas son un grupo de lípidos biológicamente activos, que tienen como principal precursor al ácido araquidónico (Bearden y Fuquay, 1980). Las prostaglandinas tienen acciones de hormona, pero no las produce ninguna glándula o tejido especifico, se producen en células de todo el cuerpo, incluyendo células del útero en hembras y en la próstata del macho. Las $PGF_2\alpha$ se relacionan fuertemente con los procesos reproductivos ya que provoca la regresión del cuerpo lúteo (Wiltbank *et al.,* 2012).

Al final de cada ciclo estral se lleva a cabo la destrucción natural del cuerpo lúteo, acción resultante por las prostaglandinas producidas en el útero. Por lo que la acción de la administración exógena de prostaglandinas ($PGF_2\alpha$) o sus análogos sintéticos, siempre que exista un cuerpo lúteo activo, produce la destrucción de esta estructura ovárica, ocasionando la disminución de los niveles circulantes de progesterona y el desarrollo de un nuevo ciclo estral (Azevedo *et al.,* 2014).

El cuerpo lúteo en los ovinos, solo es funcional entre los días 4 y 14 de ciclo estral fase llamada diestro. La administración de prostaglandinas no producirá ningún efecto si la oveja recién ovuló, ya que se encontraría un cuerpo lúteo poco desarrollado o si se está en fase folicular. Por ello, una sola inyección de prostaglandinas $F_2\alpha$ no suele ser suficiente para la sincronización de estros, lo cual se recomienda la aplicación de dos inyecciones con 9 a 14 días de intervalo (Abecia *et al*., 2012; Azevedo *et al.,* 2014).

2.5 Vitaminas

Hopkins (1912) probó de forma experimental que los animales requieren más que proteínas, grasas y carbohidratos en la dieta para un crecimiento normal, postulando que una o más substancias en ciertos alimentos naturales son también indispensables en la nutrición. Entre los nutrientes necesarios para muchas de las funciones fisiológicas esenciales para la vida son las vitaminas. Las vitaminas son compuestos orgánicos que cumplen con funciones vitales relacionadas con el metabolismo, participando en la formación de hormonas, células sanguíneas, neurotransmisores, material genético y también tienen funciones enzimáticas acelerando reacciones químicas (Cuadro 1). Éstas cumplen funciones altamente específicas en el organismo, por esta razón son esenciales en la dieta (Mollinedo y Carrillo, 2014).

Casi todas las vitaminas se pueden obtener a través de la alimentación, pero en la forma en la que se encuentran en los alimentos muchas veces requieren de alguna activación metabólica a sus formas funcionales. La mayoría de las vitaminas tienen una o varias sustancias activas que se relacionan químicamente y que comparten actividades biológicas, no obstante, estas pueden variar en biopotencia (Combs, 2008). Aunque las vitaminas comparten ciertas características, muestran pocas similitudes químicas o funcionales, por lo cual se han clasificado de acuerdo a su capacidad de disolución en liposolubles e hidrosolubles (Pardo, 2004).

Las vitaminas liposolubles incluyen a la vitamina A, D, E y K, estas suelen consumirse en alimentos que contienen grasa y tienen la capacidad de almacenarse en el cuerpo. Esta característica se asocia al mayor riesgo de toxicidad, por lo cual se debe limitar su ingestión y evitar cantidades excesivas. Las vitaminas hidrosolubles incluyen a las vitaminas del grupo B y a la vitamina C, al contrario de las vitaminas liposolubles estas no se pueden almacenar y por lo tanto se deben consumir con frecuencia, con la excepción de la cobalamina ya que tiene la capacidad de almacenarse en el hígado en cantidades importantes (Combs, 2008). Si bien las vitaminas deben ser provistas por los alimentos, algunas de ellas pueden ser aportadas en forma de precursores o provitaminas. Anteriormente se mencionó que las vitaminas son esenciales, sin embargo, algunos animales pueden sintetizar

las vitaminas D y C, aunque la síntesis muchas veces puede no ser suficiente y deben ingerirse a través de la dieta. La carencia de ingesta llega a generar disfunciones metabólicas, entre otros problemas. Una dieta equilibrada incluye todas las vitaminas, pudiendo corregir deficiencias. Sin embargo, en personas o animales que sufren de trastornos intestinales impiden la absorción normal de los nutrientes, y en embarazadas o lactantes, se necesitan suplementos vitamínicos (Pardo, 2004; Mollinedo y Carrillo, 2014). Debido a informaciones que sugieren que la ingestión optima de ciertos micronutrientes (vitamina A, C y E) puedan disminuir las enfermedades cardiacas y el riesgo de cáncer, recientemente se han aumentado las recomendaciones diarias alimenticias (RDA, por sus siglas en ingles) de estos nutrientes (Combs, 2008).

Cuadro 1. Las vitaminas: sustancias activas, precursores y funciones

Grupo	Substancia activa	Precursores	Funciones fisiológicas
Vitamina A	Retinol Retinal Ácido retinoico	β-carotenos cryptoxantina	Pigmentos visuales; diferenciación de células epiteliales
Vitamina D	Colecalciferol (D_3) Ergocalciferol (D_2)		Homeostasis del calcio
Vitamina E	α-tocoferol γ-tocoferol		Antioxidante de la membrana
Vitamina K	Filoquinonas Menaquinona Menadiona		Coagulación de la sangre
Vitamina C	Ácido ascórbico Ácido deshidroascórbico		Reductor en la hidroxilación de colágeno y carnitina y en el metabolismo de fármacos y esteroides
Vitamina B_1	Tiamina		Coenzima para complejos piruvato y α-cetoglutarato deshidrogenasas y reacciones de la transcetolasa
Vitamina B_2	Rivoflavina		Coenzima para varias deshidrogenasas
Niacina	Acido nicotínico nicotinamida		Coenzima en reacciones redox de ácidos grasos y del ciclo de citrato
Vitamina B_6	Piridoxina piridoxal piridoxamina		Coenzima en el metabolismo de la transaminación
Ácido fólico	Ácido fólico		Coenzima en el metabolismo moncarbonado
Biotina	Biotina		Coenzima para carboxilaciones
Ácido pantoténico	Ácido pantoténico		Coenzima en el metabolismo de los ácidos grasos
Vitamina B_{12}	Cobalamina		Coenzima en el metabolismo de propionato, aminoácidos y monocarbonados

(Combs, 2008)

2.6 Vitamina C

El ácido ascórbico es una lactona derivada del ácido gulónico que a su vez se sintetiza a partir de la glucosa (Combs, 2008). La mayoría de los mamíferos y de las plantas pueden sintetizar la vitamina C de manera endógena (Naidu, 2003). Sin embargo, los seres humanos, primates, cobayas, murciélagos, algunos peces, insectos e invertebrados carecen de esta capacidad debido a que no disponen de una enzima denominada gulonolactona-oxidasa implicada en la síntesis del ácido ascórbico (Covarrubias y Sotelo, 2003; Naidu, 2003).

La vitamina C está ampliamente distribuida de forma natural en plantas y animales, se encuentra principalmente como ácido ascórbico (80-90%) pero también como ácido dehidroascóbico. Las concentraciones de ambas substancias tienden a variar dependiendo del tiempo de almacenamiento de los alimentos, debido a la oxidación del ácido ascórbico (Combs, 2008). Las frutas, los vegetales y la carne de órganos como hígado y riñón son generalmente las mejores fuentes, encontrándose pequeñas cantidades en masas musculares. Las frutas y los vegetales tienden a ser la forma más efectiva para cubrir los requerimientos diarios de vitamina C (Cuadro 2), ya que generalmente se comen crudas y por lo tanto no se someten a cocción, procedimiento que destruye a la vitamina (Jesse, 1993).

En humanos las dosis diarias recomendadas de ácido ascórbico son de 75 mg/día (mujeres) y 90 mg/día (hombres), por otro lado, en las especies capaces de sintetizar la vitamina no se adiciona a la dieta, ya que se asume que se realiza en las cantidades adecuadas (Frei, 2001; Padayatty y Levine, 2001). Se ha observado que la vitamina C interviene en muchas funciones biológicas relevantes para el buen desarrollo en los seres humanos y los animales. La vitamina actúa principalmente como antioxidante, sin embargo, también interviene como cofactor en varias reacciones enzimáticas importantes, incluidas las que participan en la síntesis de catecolaminas, carnitina, colesterol, aminoácidos y ciertas hormonas peptídicas (Chatterjee *et al.,* 1975). También se conoce por facilitar la hidroxilación de residuos de prolina y lisina durante la síntesis de colágeno (Chatterjee, 1978).

En humanos, la deficiencia aguda por vitamina C conduce principalmente al escorbuto (Francescone y Levitt, 2005; Wang y Still, 2007). El desarrollo del

escorbuto varía con el tiempo, ya que dependerá de las reservas de vitamina C en el cuerpo, pero los signos se pueden presentar después de un mes de poca o ninguna ingesta de vitamina (menos de 10 mg/día). Los síntomas iniciales incluyen fatiga, junto con manifestaciones cutáneas en forma de petequias, equimosis, hematomas y hemorragias e inflamación de encías (Naidu, 2003) También se producen alteraciones en los procesos de cicatrización de heridas, a consecuencia de la dificultad para la síntesis de colágeno. La anemia está presente en el 80 % de los casos, por las hemorragias y la baja absorción de hierro, reacción secundaria a la deficiencia (Cohen y Paeglow, 2001). La deficiencia de vitamina C es rara en países desarrollados, pero todavía puede ocurrir en personas o animales en donde la variedad de alimentos es limitada.

Cuadro 2. Concentraciones de vitamina C en algunos alimentos crudos

ALIMENTO	**VITAMINA C (MG/100 G)**	**ALIMENTO**	**VITAMINA C (MG/100 G)**
Frutas		Vegetales	
Manzana	10-30	Esparrago	15-30
Plátano	10	Frijol	10-30
Cereza	10	Brócoli	90-150
Uva	40	Col	30-60
Guayaba	300	Zanahoria	5-10
Bayas De Espino	160-800	Coliflor	60-80
Melón	13-33	Apio	10
Naranjas, Limón	50	Acelgas	100-150
Durazno	7-14	Elote	12
Frambuesa	18-25	Col rizada	12
Escaramujo	1000	Poro	15-30
Fresa	40-90	Avena, trigo	0
Tangerina	30	Cebolla	10-30
Productos		Chícharo	10-30
Animales			
Carnes	0-2	Perejil	170
Hígado	10-40	Chile	125-200
Riñón	10-40	Papa	10-30
Leche		Ruibarbo	10
Vaca	1-2	Arroz	0
Humano	3-6	Espinaca	50-90

(Combs, 2008)

2.7 Vitamina C en rumiantes

Los animales domésticos, incluidos los rumiantes, pueden sintetizar la vitamina C a partir de la glucosa en el hígado (Combs, 2008); por ello, como tal, no se ha establecido ningún requerimiento dietético en estos animales. Se han evaluado los niveles de vitamina C en plasma para determinar la cantidad adecuada, pero los valores reportados en plasma de bovinos has sido muy variables. Las concentraciones se suelen disminuir por diferentes factores tales como el estrés térmico, lesiones hepáticas, engorda y enfermedades infecciosas (mastitis). Por lo tanto, la suplementación de vitamina C es potencialmente beneficiosa para animales con concentraciones plasmáticas bajas (Matsui, 2012).

La biodisponibilidad de vitamina C en los alimentos es limitada, pero aparentemente del 80 al 90 % es absorbida por el organismo (Kallner *et al.,* 1979). La mayoría de las formas de vitamina C se degradan rápidamente en el rumen, por lo tanto, el animal debe depender de la síntesis endógena de vitamina C (Hidiroglou, 1999).

La absorción se da mediante difusión pasiva y dependerá fuertemente de la dosis suministrada (Spencer *et al.,* 1963). Para su metabolismo, el ácido ascórbico primero es convertido a ácido deshidroascórbico siendo la forma oxidada de la vitamina (Englard y Seifter, 1986; Heikkila y Manzino, 1987) para así facilitar la absorción a través de la membrana, proceso realizado sin ningún gasto de energía; la mayor parte del proceso de absorción de los nutrientes en el aparato digestivo de rumiantes tiene lugar en duodeno seguido por el yeyuno e íleon (Yokoyama y Johnson, 1993). La vitamina C se transporta en plasma junto a la proteína albumina, distribuyéndose de esta forma a través de los tejidos. En animales experimentales (ratas) se han observado concentraciones mayores de vitamina en glándula adrenal y pituitaria, seguidos por el hígado, bazo, cerebro y páncreas (Das *et al.,* 1993).

Aunque los rumiantes son capaces de sintetizar la vitamina, en animales muy jóvenes como terneros y corderos se ha observado que son incapaces de sintetizar la vitamina hasta aproximadamente tres semanas de edad, siendo dependientes de una fuente exógena de vitamina C durante este periodo (Palludan y Wegger, 1984), también se han visto casos de escorbuto en vacas y terneros. Esta enfermedad se caracteriza por ocasionar cambios en la mucosa y cavidad oral, engrosamiento de

piel, acompañada de una pérdida de peso y pelo (Palludan y Wegger, 1984). Los rumiantes se consideran propensos a la deficiencia de vitamina C, siendo dependientes solamente de la síntesis endógena, ya que el suministro exógeno de la vitamina es destruido rápidamente por la microflora ruminal (Itze, 1983).

En consecuencia, la suplementación en rumiantes se realiza de forma protegida. Hidiroglou *et al*. (1997) compararon la eficacia de varias preparaciones de vitamina C, tales como el ácido ascórbico en polvo de forma natural, el ácido ascórbico recubierto con silicio o etilcelulosa, y por último como ascorbil-2-polifosfato en ovejas, lo que demostró la eficiencia del ácido ascórbico recubierto con silicio para incrementar las concentraciones de ácido ascórbico en plasma. Por otro lado, Padilla *et al.* (2007) investigaron los efectos de ácido ascórbico recubierto con aceite de soya hidrogenado a 0, 10, 20, 40 y 60 mg de ácido ascórbico/ kg de peso vivo/ nueve días en vacas, y los resultados indican que las concentraciones aumentaron conforme se incrementó la vitamina C en la dieta. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la disponibilidad de vitamina C es muy diferente dependiendo del tipo de sustancia utilizada para recubrir la vitamina.

El ácido ascórbico se excreta por medio de la orina, sudor y heces. La excreción por medio de heces y sudor es mínima. La mayor excreción se da por orina y dependerá de la cantidad almacenada en el cuerpo, consumo y función renal (Padilla *et al.,* 2007).

2.8 Vitamina C y reproducción

La vitamina C se ha asociado con la fertilidad, pero no se han realizado estudios que demuestren el mecanismo de acción en la reproducción (Wagner *et al.,* 1970). Las tres principales funciones del ácido ascórbico que se le atribuyen siendo relevantes para la reproducción, son como cofactor en la síntesis de colágeno, producción de hormonas (progesterona, catecolaminas) y su capacidad antioxidante (Luck *et al.,* 1995).

En tejido endocrino como glándula adrenal y pituitaria, de igual forma se ha encontrado que en la teca interna, granulosa, fluido folicular y en los compartimentos

luteales del ovario, se acumulan grandes concentraciones de ácido ascórbico (Paszkowski y Clarke, 1999). La vitamina C en el ovario es un cofactor esencial para la biosíntesis de colágeno, que es requerido en altas concentraciones para la remodelación del tejido que sirvió para el crecimiento folicular, ovulación y desarrollo del cuerpo lúteo (Luck y Zhao, 1993). También varias hidroxilaciones implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas, catecolaminas y péptidos neuroendocrinos (oxitocina y vasopresina) dependen de ascorbato (Levine y Morita ,1985; Eipper y Mains, 1991; Goralczyk *et al.,* 1992).

En mujeres, la concentración de ácido ascórbico aumenta al final de la fase folicular, y disminuye en la ovulación, cambios relacionados debido al consumo de ácido ascórbico por el ovario periovulatorio. Se ha sugerido que los incrementos de ácido ascórbico antes de la ovulación facilitan la esteroidogénesis en cuerpo lúteo (Hemni *et al.,* 2003) y su relación explica sus efectos favorables durante el ciclo estral (Deb y Chatterjee, 1963). Otros estudios con células de la granulosa luteinizantes muestran que el ascorbato estimula la secreción de progesterona y oxitocina, consistente con su desempeño en la biosíntesis de estas hormonas (Luck *et al.,* 1995). No obstante, las concentraciones de ácido ascórbico en el cuerpo lúteo parecen ser mayores a las requeridas, para facilitar la producción de la progesterona (Sheldrick y Flint, 1989).

La biosíntesis de ácido ascórbico se puede ver afectada durante los primeros días del desarrollo fetal, pudiendo ser inhibida por las deficiencias de vitamina A, E y biotina (Combs, 2008). Se ha señalado que en mujeres embarazadas con concentraciones bajas de ácido ascórbico corren mayor riesgo de presentar diabetes gestacional y parto prematuro debido a la ruptura prematura de membranas corioamnióticas. Por consiguiente, se han sugerido mayores cantidades de ácido ascórbico para mantener la integridad de las membranas fetales en humanos (Aplin *et al.,* 1986).

Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico se centran en proteger a los tejidos de las especies reactivas a oxigeno (ROS). Estos ROS pueden dañar al ADN, proteínas, carbohidratos, lípidos y membranas biológicas (Luck *et al.,* 1995). Tilly y Tilly (1995) demostraron que el ácido ascórbico en folículos cultivados de

ratas inhibe la apoptosis folicular y protege a las células de daño oxidativo (Kololdecik *et al.,* 1998). La suplementación de la vitamina C durante la gestación también se ha observado que reduce la frecuencia de defectos al nacimiento, por tanto, se ha sugerido una suplementación de 500 mg de vitamina C tan pronto se detecte la gestación (Nelson y Forfar, 1971; Luck *et al.,* 1995).

2.8.1 Síntesis de colágeno

El colágeno se encuentra en el tejido conjuntivo especialmente en tendones, cartílagos, matriz orgánica de los huesos, y cornea del ojo (Nelson y Cox, 2009). El ácido ascórbico es esencial para la formación de colágeno (Gould, 1968; Wallerstein y Wallerstein, 1976; Chatterjee, 1978) por el hecho de que es necesario en la síntesis de hidroxiprolina e hidroxilisina en el colágeno (Cardinale y Udenfriend, 1974). La hidroxiprolina sirve para estabilizar la triple hélice del colágeno (Ramachandran y Ramakrishnan, 1976); su ausencia resulta en la inestabilidad estructural del colágeno (Berg y Prockop, 1973; Jiménez *et al.,* 1973) lo cual causa que las células no lo sinteticen una velocidad normal (Prockop *et al.,* 1976). La hidroxilisina es necesaria para la formación de enlaces intermoleculares (Eyre, 1980), los residuos de hidratos de carbono están ligados glicosídicamente al colágeno a través de hidroxilisina formando reticulaciones (Elsas *et al.,* 1978). El ácido ascórbico también modula la producción de colágeno a través de su efecto sobre la hidroxilación de la prolina, la ausencia de la vitamina provoca inestabilidad del colágeno y problemas del tejido conjuntivo observados en el escorbuto (Nelson y Cox, 2009). Se han realizado estudios (Jeffrey y Martin, 1966), en los que observaron un aumento sustancial en el tamaño de los huesos largos de pollo cultivados en la presencia de ascorbato, relacionado con un aumento en la incorporación de prolina en hidroxiprolina peptidil. Los datos indican que el ascorbato aumenta la síntesis de colágeno actuando como cofactor un nivel de hidroxilación.

En un estudio que se realizó en yeguas se observó que el tejido conectivo que cubre al ovario está formado principalmente por diferentes tipos de colágeno y elastinas junto con glicoproteínas, glicosaminas y proteoglicanos (Labat-Robert *et al.,* 1990).

Entre las formas en las que se encuentra al colágeno, el tipo I es el más abundante y se encuentra prácticamente en todos los tejidos conectivos. El tipo III está presente en las primeras etapas de desarrollo de diferentes tejidos conectivos y persiste en adultos en las redes reticulares en el útero, los vasos sanguíneos y la piel (Colognato y Yurchenco, 2000). Luck y Zhao (1993), encontraron una relación positiva entre el ácido ascórbico y la concentración de hidroxiprolina en el cuerpo lúteo de vacas.

Algunos defectos genéticos conocidos en humanos debido a la estructura del colágeno, son la osteogénesis imperfecta que da como resultado de la formación anormal de los huesos en bebes y el síndrome de Ehlers-Danlos que produce debilidad en las articulaciones. Ambas enfermedades pueden ser letales y son resultado de la sustitución de un aminoácido en su estructura, por ello, la importancia de esta proteína en el organismo (Nelson y Cox, 2009).

2.9 Antioxidantes

El término antioxidante se ha referido como todo aquel compuesto químico que utiliza el organismo para eliminar radiales libres, previniendo o inhibiendo la oxidación de sustratos (Uttara *et al.,* 2009). Los antioxidantes se clasifican en dos grupos: los no enzimáticos que son adquiridos a través de alimentos naturales, incluyen principalmente a las vitaminas C y E, y otras moléculas como los flavonoides y β-carotenos (Halliwell, 1996). Estos actúan de dos formas, ya sea previniendo la generación excesiva de radicales libres evitando daño celular o si el daño ya existe, estos antioxidantes controlan los niveles de radicales y así evitan que el daño continúe (Nuttall *et al.,* 1999; Uttara *et al.,* 2009). En el segundo grupo están los enzimáticos, los cuales son producidos de manera endógena por el animal, algunos ejemplos de estos son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (Halliwell y Gutteridge, 1999). Estas enzimas trabajan en conjunto reduciendo a los oxidantes a elementos inofensivos o neutralizándolos (Perl-Treves y Perl, 2002; Agudo *et al*., 2007). La glutatión peroxidasa (GHX), además ayuda a restituir a la vitamina C para que pueda continuar neutralizando a los radicales libres (Guido y Aalt, 1983). Los antioxidantes son una alternativa para

prevenir y contrarrestar diversas enfermedades que se ocasionan con el estrés oxidativo, manteniendo el equilibrio de radicales libres y un buen estado antioxidante en el organismo (Nuttall *et al.,* 1999; Monfared *et al.,* 2009).

2.9.1 Radicales libres

Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de forma independiente, que contiene uno o más electrones desapareados. Los radicales se pueden formar por la pérdida o ganancia de un electrón por un no radical, dejando así un electrón desapareado con carga positiva o negativa (Halliwell y Gutteridge, 2015). Estos son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas biomoléculas que se encuentran en nuestras células (Scandalios, 2005), provocando daños a nivel celular y tisular. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son un grupo en donde se incluyen a los radicales libres derivados oxígeno y a otros derivados no radicales. Principalmente se forman por la reducción incompleta del oxígeno durante la transferencia de electrones en la mitocondria, aproximadamente el 5 % del oxígeno termina convirtiéndose en ERO. Las principales ERO son el radical anión superóxido ($O_2•^-$), radical hidroxilo (HO•) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lledias y Hansberg, 1999; Avello y Suwalsky, 2006). Además, las ERO regulan procesos celulares, en los mamíferos ayudan a la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas, la unión de proteínas G a sus receptores y regulación de transportadores y canales iónicos, por mencionar algunos (Bartozs, 2009). Sin embargo, en grandes cantidades resultan nocivas para los organismos ya sea dañando constituyentes celulares o induciendo muerte celular (Gutteridge y Halliwell, 2000).

2.9.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando las sustancias oxidantes y en particular las ERO sobrepasan las defensas antioxidantes en el organismo (Sompol *et al.,* 2008; Pourova *et al.,* 2010), afectando principalmente a moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otras, causando alteraciones metabólicas en la célula. El

estrés oxidativo se presenta debido a varios factores, por ejemplo, infecciones, estrés calórico, ejercicio excesivo etc. (Pourova *et al.,* 2010).

Cuando existe daño oxidativo en los ácidos grasos insaturados se conoce como lipoperoxidación. Las membranas celulares están constituidas por fosfolípidos, y contienen principalmente ácidos grasos poliinsaturados los cuales son especialmente susceptibles a un deterioro oxidativo, ocasionando alteraciones funcionales en la membrana. Estos lípidos peroxidados son altamente tóxicos y causan daño a la célula (Frankel, 1991; Gutteridge y Halliwell, 2000; Castillo *et al.,* 2006).

En el caso de las proteínas, el daño oxidativo conlleva a una alteración metabólica que conduce a un estado apoptótico celular, afectando la función de enzimas, transportadores, receptores etc. También modifica a los grupos radicales de los residuos de aminoácidos de las proteínas alterando su vida media y función (Halliwell *et al.,* 1989).

Las especies reactivas a oxigeno también atacan al ADN, ya sea al esqueleto de la desoxirribosa o a cualquiera de sus bases nitrogenadas provocando mutaciones de la información genética (Halliwell *et al.,* 1989).

2.9.3 Estrés oxidativo en gestación

La gestación es un acontecimiento fisiológico caracterizado por un aumento drástico en demandas energéticas, para asegurar un adecuado desarrollo y crecimiento fetal. Tanto la madre como el feto son susceptibles a experimentar estrés oxidativo, durante esta etapa (Myatt y Cui, 2004; Garrel *et al.,* 2010). Todos los tejidos y sobre todo la placenta y el feto requieren altas cantidades de oxígeno, por lo que las ERO, son generadas por la madre y el feto. Las ERO ejercen dos efectos contrarios, ya que en concentraciones adecuadas son esenciales para el desarrollo del embrión, implantación, defensa del feto contra las infecciones uterinas, esteroidogénesis, mantenimiento de gestación y parto. Por otro lado, una incontrolada generación de ERO, más allá de los antioxidantes fisiológicos de defensa, puede conducir a la reabsorción del embrión, la degeneración placentaria con la posterior alteración en el intercambio materno-fetal, retraso en crecimiento fetal, la interrupción de la gestación y corderos nacidos muertos (Mutinati *et al.,* 2013).

III. HIPÓTESIS

La suplementación de vitamina C protegida durante la sincronización de estro hasta el diagnóstico de gestación mejora la eficiencia reproductiva y reducirá el estrés oxidativo en ovejas.

IV. OBJETIVOS

- Evaluar los efectos de la suplementación de vitamina C protegida en la eficiencia reproductiva en ovejas.
- Evaluar lipoperoxidación y capacidad antioxidante de ovejas suplementadas con vitamina C protegida durante la sincronización de estro hasta el diagnóstico de gestación.
- Determinar el peso de las crías al nacimiento al suplementar vitamina C protegida a las ovejas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la granja experimental ovina que se encuentra en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, ubicado en el Km 36.5 de la carretera federal México-Texcoco en Montecillo, estado de México; la cual se localiza geográficamente a 19^0 29`N y $98^0$ 53`O, a una altitud de 2250 msnm con una temperatura media anual de 15.2 ^{0}C y una precipitación anual de 636.5 mm, con vientos dominantes del sur. El clima es semifrío subhúmedo con lluvias en verano (García, 2004).

5.2 Animales y alimentación

Se utilizaron 63 borregas multíparas cruza Suffolk-Dorset, con un peso vivo promedio de 60 ± 5.18 kg, las cuales fueron distribuidas en un diseño completamente al azar en tres tratamientos. Las hembras recibieron un flushing (Cuadro 3), del cual se les ofrecía 250 g de alimento con la finalidad de satisfacer los requerimientos nutricionales de las hembras en etapa reproductiva (NRC, 1985) y la cantidad correspondiente de vitamina C dependiendo del tratamiento. El alimento y la vitamina C se proporcionó en jaulas individuales de 8:00 am a 10:00 am, posteriormente se agruparon en un solo corral con heno de avena y agua a libre acceso.

5.3 Sincronización de estros

Las ovejas fueron presincronizadas (Figura 1) con dos dosis de prostaglandinas $F_2\alpha$ (0.3 mL de cloprostenol sódico, Celosil ®) la cual se aplicó a un intervalo de nueve días (días experimentales -12 y -3), el 100 % de las ovejas mostraron estro en la segunda dosis de prostaglandinas. Al sexto día después de la segunda dosis de prostaglandinas se les insertó un dispositivo intra-vaginal de progesterona (CIDR, impregnado con 0.3 g de progesterona) el cual permaneció intravaginalmente por 11 días (días experimentales 3 al 14); dos días antes del retiro del CIDR (día 12) se les aplicó una dosis de prostaglandinas ($PGF_2\alpha$), con la finalidad de lisar cualquier cuerpo lúteo presente y así asegurar la homogenización del ciclo estral. Durante

ese periodo se realizó una revisión diaria a cada oveja, para verificar la presencia del dispositivo. Después de 12 horas de haber retirado el CIDR se inició la detección de estro con ayuda de machos equipados con mandiles protectores. Las montas de las hembras detectadas en estro, se realizaron con 10 sementales de la misma raza a las 8 y 16 horas después de detectado el celo, los retornos a estro se detectaron a los 17 días posteriores a las montas.

Cuadro 3. Composición del flushing proporcionado a las ovejas durante la suplementación de vitamina C protegida

Ingredientes	%
Sorgo	75.82
Pasta de soya	6.94
Rastrojo de avena	9.91
Melaza	5.35
Minerales*	1.98
Total	100.00
Composición química estimada	
MS	88.69
PC	11.1
EM (Mcal/kg)	2.77
FDN	26.45
FDA	14.61
CENIZAS	4.29

*** Fósforo 17.5 %, Sodio 12.9 %, Calcio 5.6 %, Magnesio 3.4 %**

MS: materia seca, PC: proteína cruda, EM: energía metabolizable, FDN: fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente ácida

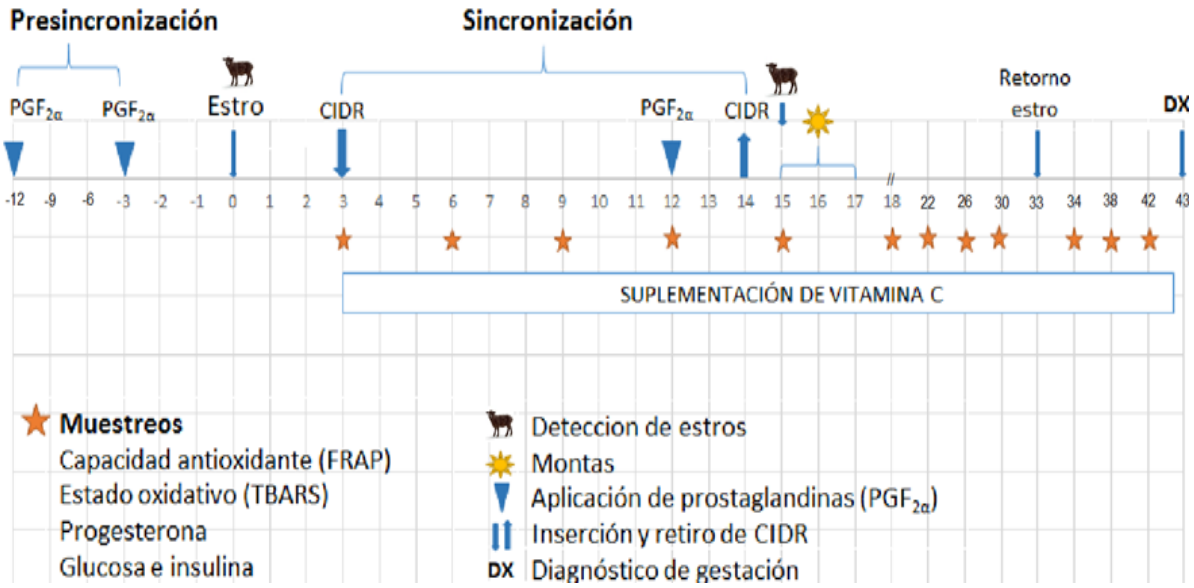

Figura 1. Protocolo de sincronización y muestreos realizados durante la suplementación de vitamina C protegida a ovejas.

*****CIDR: Dispositivo intravaginal liberador de progesterona.

5.4 Tratamientos

En el trabajo experimental se evaluaron tres tratamientos, los cuales se describirán a continuación:

Tratamiento 0 (n= 21)	0 g de vitamina C protegida con etilcelulosa
Tratamiento 1 (n= 21)	3 g de vitamina C protegida con etilcelulosa (Rovimix C ®)
Tratamiento 2 (n= 21)	6 g de vitamina C protegida con etilcelulosa (Rovimix C ®)

Debido a que el NRC no define ninguna dosis especifica de vitamina C en rumiantes, las dosis se basaron de acuerdo a estudios reportados en la literatura (Christian *et al.,* 1951; Jaber *et al.,* 2011; Hashen *et al.,* 2016).

5.5 Muestreos

Las muestras de sangre fueron colectadas mediante punción de la vena yugular a las 8:00 am, para la determinación de concentración de progesterona (P_4). Dos horas después de la alimentación (adicionada la vitamina C) se volvía a muestrear con tubos con EDTA para la posterior determinación de capacidad antioxidante, estado oxidativo y vitamina C (Figura 1), esto debido a que Macleod *et al.* (1999) mencionan que la vida media de la vitamina es de 3.5 horas ya que es extremadamente inestable en el ambiente del rumen y su degradación es rápida.

Todas las muestras se centrifugaron a 1,500 *g* durante 15 minutos en una centrífuga marca Sigma 2-16 PK® refrigerada a 4 ºC, el plasma sanguíneo fue separado y depositado en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales se almacenaron a -40 °C hasta su análisis.

5.6 VARIABLES EVALUADAS

5.6.1 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total se midió usando la técnica de FRAP (poder antioxidante por reducción férrica) de acuerdo al método descrito por Benzie y Strain (1999). Se preparó una mezcla formada por una solución buffer de acetato 300 mM con pH de 3.6, una solución acuosa de cloruro férrico hexahidratado (Fe III) 20 mM y 2, 4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM (disuelto en HCl 40 mM), en una relación 10:1:1 respectivamente. Se tomó 1.5 mL de mezcla y se agregaron 100 µL de plasma sanguíneo. Las muestras se incubaron a 37 °C por 10 minutos y se obtuvieron las absorbancias por espectrofotometría (LBK Biochrom 4050 Ultrospec® II UV/Vis) a 593 mn. Se utilizó 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametil-croman-2-ácido-carboxílico (trolox; número de catálogo: 53188-07-1, Sigma-Aldrich®) a diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM) como estándar para calcular los resultados.

5.6.2 Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se midió mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) de acuerdo al procedimiento descrito por Ohkawa *et al.* (1979) con algunas modificaciones. Se tomó una alícuota de 250 µL de la muestra de plasma sanguíneo y se agregó 1 mL de una solución acuosa de ácido tiobarbiturico al 0.8 % y 2 mL de ácido acético al 20 %, solución acuosa, ajustado a un pH de 2.5. Las muestras se mantuvieron en ebullición por 60 minutos y después se enfriaron con agua-hielo, posteriormente se les agregaron 5 mL de n-butanol (n-butyl alcohol; número de catálogo: 71-36-3, Sigma-Aldrich®) y se agitaron vigorosamente con ayuda de un vórtex-Genie 2® para luego centrifugarse (Thermo Scientific™ Sorvall™ Primo™ R) durante 10 minutos a 4,000 *g*. Las absorbancias de los sobrenadantes se midieron por espectrofotometría (LBK Biochrom 4050 Ultrospec® II UV/Vis) a 532 nm. Los resultados se calcularon utilizando diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8 mM) de malondialdehido (MDA), obtenido por hidrolisis ácida partir de 1, 1, 3,3-tetraetoxipropano (número de catálogo: 102-52-3, Sigma-Aldrich®).

5.6.3 Ácido ascórbico

El análisis de ácido ascórbico se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Jacota y Dani (1982) con algunas modificaciones, las cuales consistieron en colocar 3.2 mL de ácido tricloroacético al 10 % y se agregaron 800 µL de plasma sanguíneo, se agitó vigorosamente por 5 segundos con ayuda de un vórtex-Genie 2® y se dejó incubar por 5 minutos en agua-hielo. Posteriormente, se centrifugó a 3,000 *g* por cinco minutos. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se agregaron 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 % (número de catálogo: 47641, Sigma-Aldrich®). Se agitó la muestra vigorosamente durante 3 segundos nuevamente con ayuda de un vórtex se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La lectura se realizó por espectrofotometría a 760 nm. Las curvas se realizaron con ácido ascórbico (número de catálogo: A0278, Sigma-Aldrich®) a concentraciones de 100, 200, 400 y 800 mM. Para el análisis se utilizó un espectrofotómetro Cary 1-E, UV-visible, marca Varian.

5.6.4 Progesterona

Para determinar las concentraciones de progesterona se colectaron muestras de sangre de la vena yugular con tubos vacutainer (5 mL) en los días experimentales 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 26, 30, 34, 38 y 42 (Figura 1). Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (Immunometrics, UK Ltd, 280 Muster Road, London SW6 6BQ). La sensibilidad analítica fue de 0.13 ng mL^{-1} con coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9.59 y 13.7 %, respectivamente.

5.6.5 Insulina

Las concentraciones de insulina se midieron por radioinmunoanálisis (RIA) con una sensibilidad de 4.09 ng mL^{-1} y coeficientes de variación intra e inter ensayo de 1.44 y 0.25 %, respectivamente.

5.6.6 Glucosa

Para determinar las concentraciones de glucosa en plasma se utilizó un método enzimático colorimétrico con reactivos de la marca Pointe Scientific (Pointe Scientific Inc. Canton Mi. USA) y un analizador de Bioquímica Clínica Automatizado Mindray BS-200 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen, China). Los análisis para progesterona, insulina y glucosa se realizaron en el laboratorio de Biología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

5.7 Variables reproductivas

5.7.1 Presentación de estro

Se determinó que una oveja estaba en estro si ésta permitía la monta del macho quedándose totalmente inmóvil. Las ovejas detectadas en estro se separaron e identificaron para darles monta.

5.7.2 Retorno a estro

Diecisiete días después de haberse realizado las montas se realizó nuevamente la detección de estros de igual forma con ayuda de machos con mandil, para registrar a las hembras que no quedaron gestantes.

5.7.3 Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó 30 y 60 días posteriores a las montas, utilizando un ultrasonido de tiempo real Sonovet 600 con un transductor lineal transrectal de 7.5 Mhz (Medison, Cypress, California, USA) para determinar el porcentaje de gestación se dividió el número de ovejas diagnosticadas gestantes entre el número de ovejas que recibieron monta.

5.7.4 Fecundidad

Para esta variable, se considera el número de corderos nacidos entre el número total de ovejas por tratamiento.

5.7.5 Prolificidad

La prolificidad se midió dividiendo el número de borregos nacidos entre el número de ovejas paridas.

5.7.6 Peso de cordero al nacimiento

Los pesos de los corderos se registraron dentro de las primeras 12 horas de paridas las ovejas.

5.8 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, las variables presentación de estro, retorno a estro y porcentaje de gestación se analizaron con una prueba de X^2 bajo en procedimiento PROC FREQ de SAS; para el caso de prolificidad y fecundidad se utilizó un modelo estadístico de regresión de Poisson usando el procedimiento GENMOD. Para la variable peso al nacimiento, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey mediante el procedimiento PROC GLM.

Para las mediciones de progesterona, insulina, glucosa, capacidad antioxidante, lipoperoxidación y ácido ascórbico se realizó un análisis de mediciones repetidas a través del tiempo por medio del procedimiento PROC MIXED y la prueba de comparación de medias de Tukey. Todos los procedimientos se analizaron con el paquete de sistema de análisis estadísticos (SAS, 2002 versión 9.4). El modelo estadístico utilizando fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_j + T_iM_j + A_{k(i)} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk}= respuesta del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo muestreo de la k-ésima repetición

μ= Media general

T_i= Efecto de i-ésimo parto

M_j= Efecto del j-ésimo muestreo

T_iM_j= Efecto del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo muestreo

$A_{k(i)}$= Efecto del i-ésimo tratamiento anidado al k-ésimo animal

E_{ijk}= Error experimental.

VI. RESULTADOS

6.1 Variables reproductivas

6.1.1 Presentación de estro

Después del retiro del CIDR el estro se presentó en el 100% de las ovejas. La suplementación de vitamina C no modificó la presentación de estro ($p>0.05$) (Cuadro 4).

6.1.2 Retorno a estro

El porcentaje de ovejas que retornaron al estro a los 17 días posteriores a primera monta fue de 9.5 (2/21) para el T0 y T1 (0 y 3 g de vitamina C, respectivamente) y en el T2 (6 g de vitamina C) ninguna oveja retornó a estro; sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$) (Cuadro 4).

6.1.3 Porcentaje de gestación

El porcentaje de gestación no se modificó por la suplementación de vitamina C en las ovejas ($p>0.05$). En los tratamientos T0 (testigo) y T1 (3 g de vitamina C), se obtuvo el 90.5 % de gestación y en el T2 (6 g de vitamina C) el porcentaje de gestación fue del 100% (Cuadro 4).

El porcentaje de gestación a los 30 días se mantuvo ($p>0.05$), no se observaron absorciones embrionarias, ya que el mismo número de ovejas diagnosticadas gestantes a los 30 días fueron las que se diagnosticaron gestantes a los 60 días.

6.1.4 Fecundidad y prolificidad

En el caso de fecundidad y prolificidad no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$), indicando que la suplementación de vitamina C no afecta la fecundidad ni la prolificidad en ovejas (Cuadro 4).

6.1.5 Peso de codero al nacimiento

El peso de las crías al nacimiento no fue afectado por la suplementación de vitamina C entre tratamientos ($p>0.05$). Los pesos promedio de las crías de los tratamientos fueron: 4.20 (T0), 4.87 (T1) y 4.68 kg (T2).

Cuadro 4. Variables reproductivas en ovejas sincronizadas y suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida

	T0	T1	T2	Valor de P
Estro (%)	100	100	100	
Retorno a estro (%)	9.5 (2/21)	9.5 (2/21)	0 (0/21)	0.6333
Gestación a los 30 días (%)	90.5 (19/21)	90.5 (19/21)	100 (21/21)	0.9986
Gestación a los 60 días (%)	90.5 (19/21)	90.5 (19/21)	100 (21/21)	0.9986
Prolificidad (%)	1.47 (28/19)	1.37 (26/19)	1.38 (29/21)	0.956
Fecundidad	1.33 (28/21)	1.24 (26/21)	1.38 (29/21)	0.919
Peso de la cordero al nacimiento (kg)	4.40 [a]	4.87 [a]	4.68 [a]	0.3268

[a]: Letras diferentes en fila indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p<0.05$); T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C.

6.2 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en plasma sanguíneo utilizando la técnica de FRAP (poder antioxidante de reducción férrica) se afectó por la suplementación de ácido ascórbico a las ovejas por tratamiento, siendo el T1 significativamente más alto que el T0 y T2 ($p<0.05$) (Cuadro 5).

En la Figura 3, se observa que durante los muestreos realizados, la capacidad antioxidante disminuyó en los días de comienzo del empadre (día 15) y en los días experimentales 26 al 30.

Cuadro 5. Concentración de capacidad antioxidante y lipoperoxidación en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con vitamina C protegida

Tratamientos	Trolox (nmol mL^{-1})	MDA (nmol mL^{-1})
0	244.39±6.73^{b}	7.32±0.49^{a}
1	284.73±6.82^{a}	7.82±0.51^{a}
2	261.68±6.39^{b}	8.77±0.47^{a}

$^{a, b:}$ Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0.05$) T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C; FRAP: Poder antioxidante de reducción férrica; MDA: Malondialdehido.

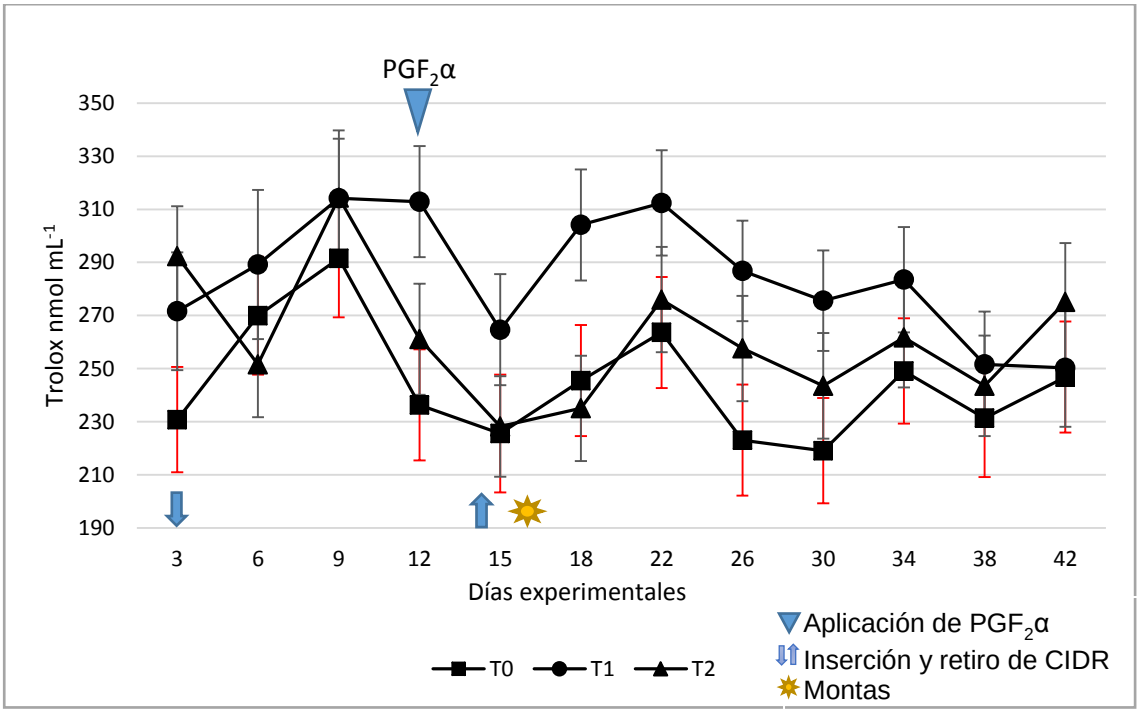

Figura 2. Capacidad antioxidante en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida.

T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C; $PGF_2\alpha$: prostaglandinas; CIDR: dispositivo intravaginal de progesterona.

6.3 Lipoperoxidación

En el Cuadro 4, se muestran los resultados de la prueba de oxidación lipídica (TBARS) donde se muestra que la suplementación de vitamina C no modificó la lipoperoxidación en ninguno de los tres tratamientos, ni entre los muestreos ($p>0.05$) (Figura 3).

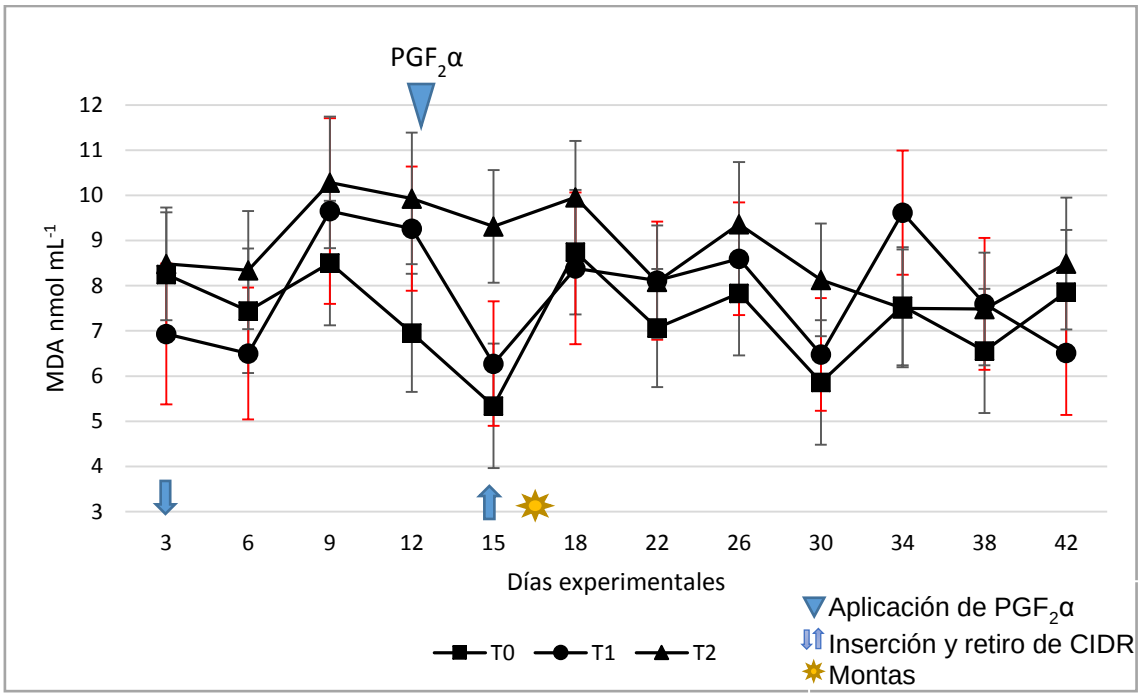

Figura 3. Concentraciones de lipoperoxidación en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida.

T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2:6 g de vitamina C; $PGF_2\alpha$: prostaglandinas; CIDR: dispositivo intravaginal de progesterona.

6.4 Ácido ascórbico

En el Cuadro 6, se presentan las concentraciones de vitamina C en plasma sanguíneo de las ovejas de los diferentes tratamientos, en donde se observa que los T1 y T2 son significativamente diferentes al tratamiento testigo ($p<0.05$), sin embargo, entre muestreos no se observaron diferencias significativas (Figura 4).

Cuadro 6. Concentración de ácido ascórbico en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida

Tratamientos	Ácido ascórbico ($\mu g/mL^{-1}$)
0	10.77 ± 0.52^{b}
1	13.02 ± 0.49^{a}
2	12.85 ± 0.50^{a}

[a, b]: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p<0.05$); T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C.

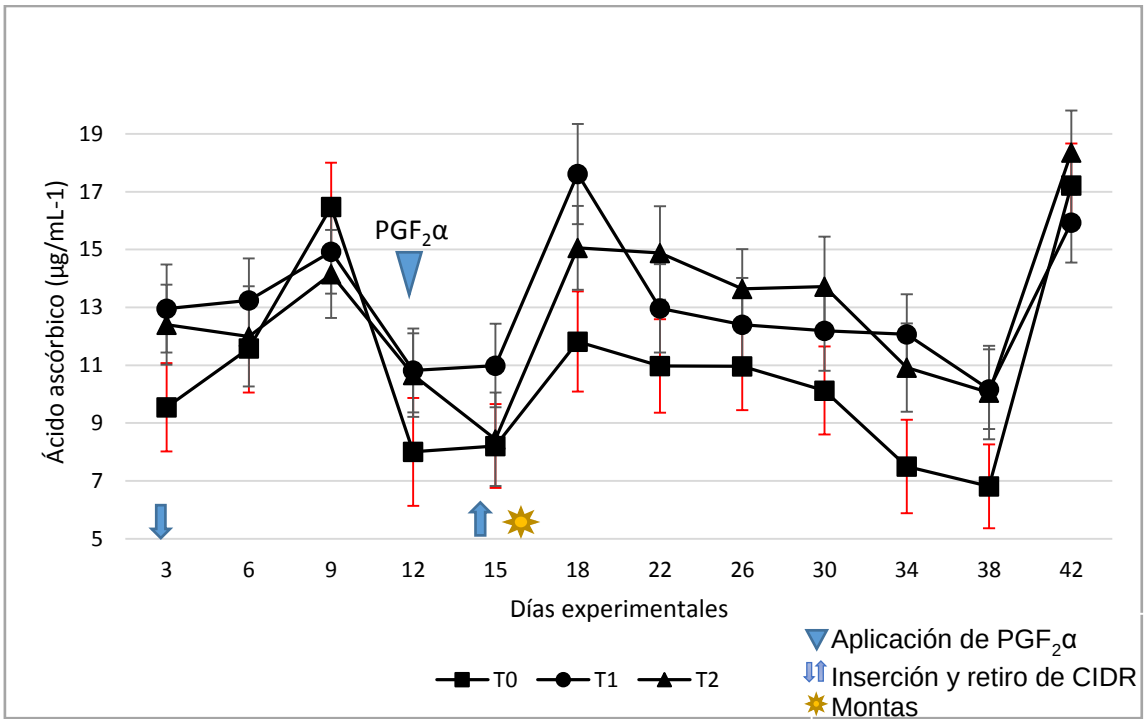

Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida.

T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C; $PGF_2\alpha$: prostaglandinas; CIDR: dispositivo vaginal liberador de progesterona.

6.5 Progesterona

La suplementación de vitamina C no modificó la concentración de progesterona en ninguno de los muestreos realizados (Figura 5), en los muestreos se observó que después de la inserción del CIDR en los tres tratamientos la concentración de progesterona se incrementó ($p<0.05$), disminuyéndose posterior a su retiro (muestreos de los días 15 y 18) donde se llevó a cabo el empadre, seguido por un incremento gradual conforme al avance de la gestación, que es el perfil de secreción normal para esa etapa fisiológica.

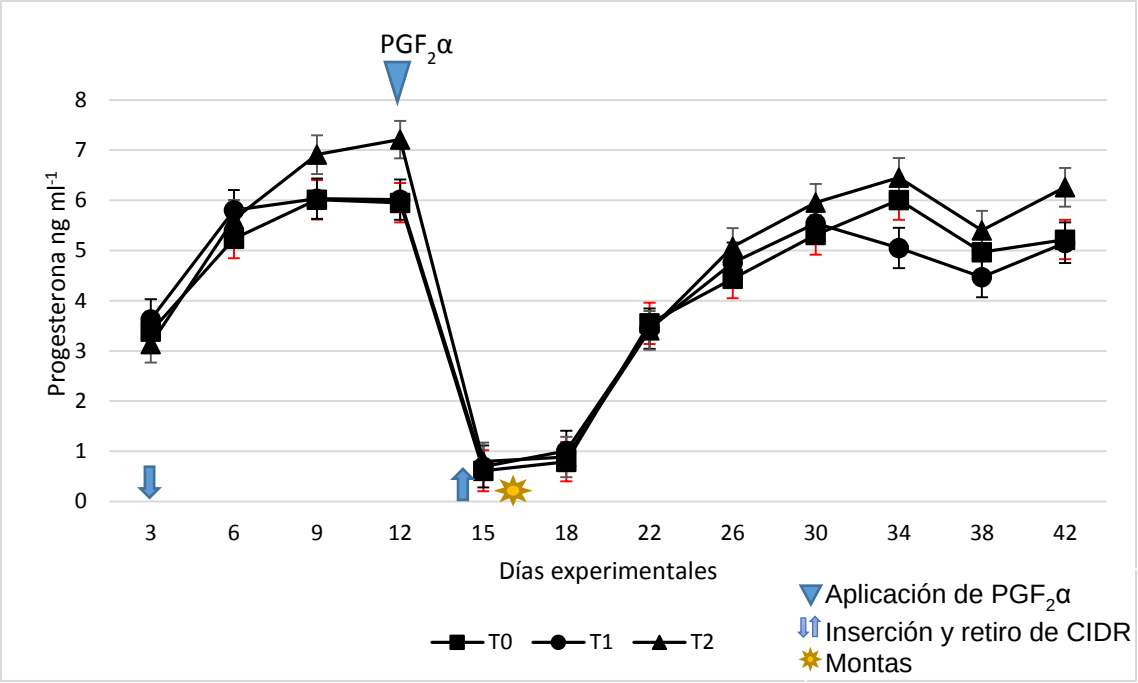

Figura 5. Concentración de progesterona en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida.

T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C; $PGF_2\alpha$: prostaglandinas; CIDR: dispositivo vaginal liberador de progesterona.

6.6 Glucosa e insulina

En el Cuadro 7 se observa, que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$), obteniendo resultados más bajos de glucosa en T1 (ovejas con 6 g de vitamina C). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los muestreos ($p>0.05$).

En cuanto a los resultados de las concentraciones de insulina en plasma no se encontraron diferencias significativas entre tratamiento por efecto de la adicción de ácido ascórbico, ni entre los muestreos ($p>0.05$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones de glucosa e insulina en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida

Tratamientos	Glucosa (mg/dL^{-1})	Insulina (ng/mL^{-1})
0	67.009[a]	0.5158[a]
1	60.237[b]	0.5159[a]
2	67.418[a]	0.5561[a]

[a, b]: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0.05$); T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C.

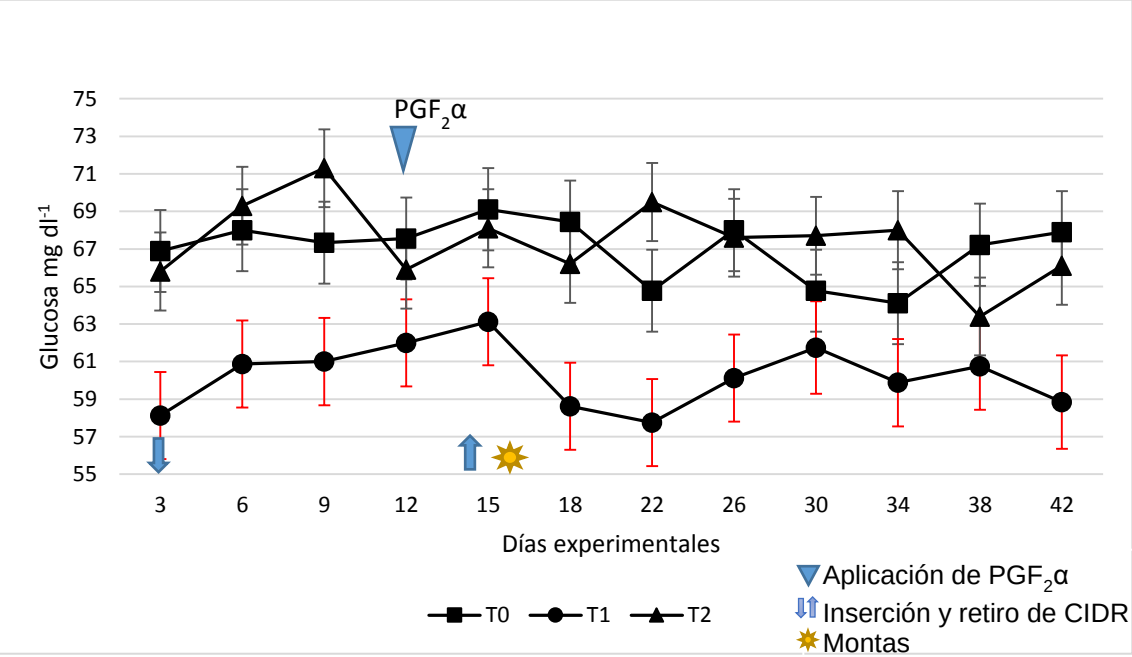

Figura 6. Concentraciones de glucosa en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida.

T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C; $PGF_2\alpha$: prostaglandinas; CIDR: dispositivo vaginal liberador de progesterona.

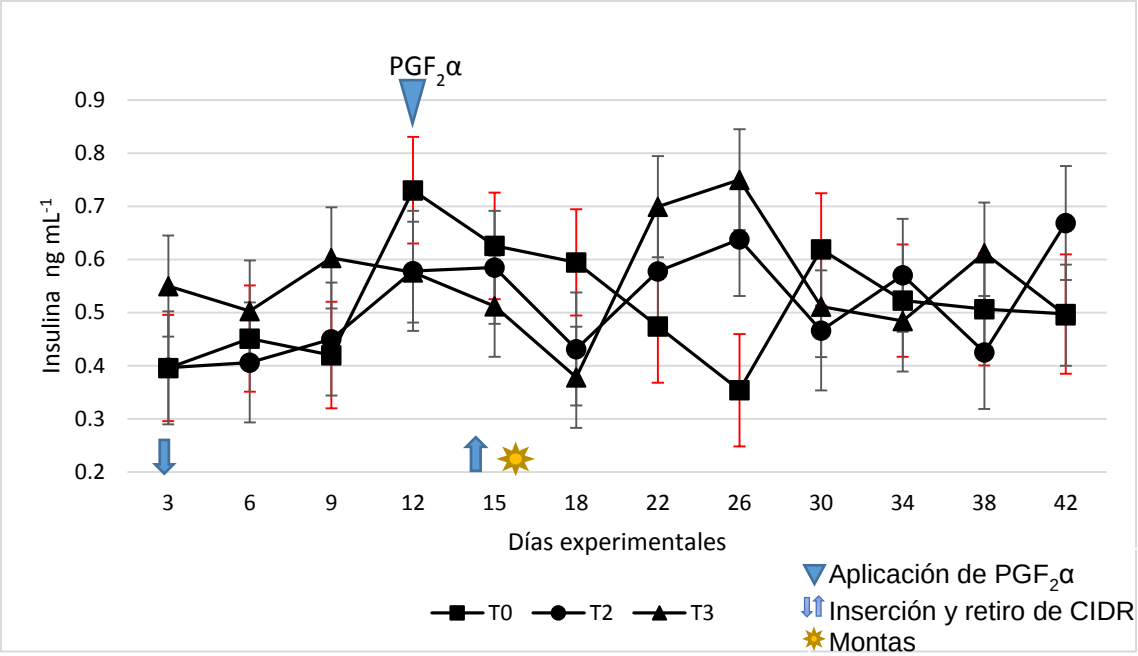

Figura 7. Concentración de insulina en plasma sanguíneo de ovejas suplementadas con diferentes dosis de vitamina C protegida.

T0: 0 g de vitamina C; T1: 3 g de vitamina C; T2: 6 g de vitamina C; $PGF_2\alpha$: prostaglandinas; CIDR: dispositivo vaginal liberador de progesterona.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Respuesta reproductiva

El 100 % de las ovejas presentó estro, sin embargo no existieron diferencias entre tratamientos ($p<0.05$), lo que significa que la administración de vitamina C, no afectó la presentación del estro. El alto porcentaje de estros observados en la presente investigación se debe a la efectividad de la progesterona para la sincronización de estros en ovejas, ya que al retirar el dispositivo intra-vaginal (CIDR) el estro y la ovulación se presentan en un tiempo determinado (Godfrey *et al.,* 1999; Ungerfeld y Rubianes, 1999), sin dejar de lado la acción de las prostaglandinas ($PGF_2\alpha$) para inducir la lisis de los cuerpos lúteos presentes (Rubianes *et al.,* 2003). Se ha observado el 100 % de las incidencias de la respuesta a estro en ovejas que fueron suplementadas desde dos semanas antes del empadre hasta el término de la gestación con 25 o 50 mg de vitamina E / kg de alimento (El-Shanat y Abdel-Monem, 2011). Por otro lado, Omentese *et al.* (2017) administraron ácido ascórbico en ovejas, al momento de inserción de los dispositivos, en un programa para sincronizar estros con esponjas y CIDRs (75 mg, intramuscular), reportando que hubo una respuesta a estro mayor al 78 % y que el tiempo promedio para el inicio del estro se observó a las 39 horas, sin encontrarse diferencias significativas y mencionaron que los resultados obtenidos están dentro de los rangos reportados (24-56 h) por otras razas de ovejas luego de la sincronización del estro (Hashemi *et al.,* 2006; Ungerfeld, 2011) sin verse afectado por el tratamiento de ácido ascórbico. Omentese *et al.* (2017) sugieren que la buena condición corporal y la adecuada alimentación pudieran interferir para destacar los resultados de la administración de la vitamina C, en el presente estudio pudo haber ocurrido lo mismo ya que las ovejas se encontraban en buena condición corporal. Existen varios factores que pueden influir en la fertilidad tales como lo es el tipo de inseminación, los tratamientos hormonales, la estación del año, el estado nutricional y el efecto del macho (Simonetti *et al.,* 2000; Ungerfeld, 2011; Gatti y Ungerfeld, 2012). En la presente investigación todas las ovejas mostraron estro entre las 24 y 36 horas, rangos que entran en los mencionados por la literatura.

En un estudio en ovejas a las cuales se les suplementó vitamina A (50,000 UI) o Vitamina C (3 g, intramuscular) durante la sincronización de estros e inicio de gestación (por 50 días) el porcentaje de fecundidad fue mayor en los animales que recibieron vitamina A comparados con el tratamiento testigo y el tratamiento que contenía la vitamina C (Hashem *et al.,* 2016). Sin embargo, la suplementación de vitamina C se ha utilizado con fines terapéuticos en rumiantes para el tratamiento de la infertilidad, y se observado que la administración subcutánea de vitamina C (2.2-4.4 mg/ kg de peso vivo) mejoró el rendimiento en toros con registros reproductivos pobres (Daykin, 1960).

La administración de vitamina C (500 mg, en forma de pellets de liberación lenta) durante el período de estimulación hormonal con gonadotropinas en mujeres ha mostrado un incremento positivo, aunque no significativo ($p>0.05$) en el número de embarazos (Crha *et al.,* 2003). Saikhun *et al.* (2008) mencionan que la adición de vitamina C aumenta la velocidad en el desarrollo de embriones de búfalo en medios de cultivo *in vitro*. Aunque los rumiantes pueden sintetizar vitamina C a partir de glucosa o galactosa, varias investigaciones han observado una disminución significativa en sus concentraciones durante diversas enfermedades o estrés y su efecto es beneficioso en el mantenimiento de la salud y la fertilidad cuando se suplementa. El alivio del estrés calórico, el manejo de diarrea en terneros, la mastitis y la infertilidad son algunas condiciones potenciales en las que la administración de suplementos de vitamina C pudiera ser útil (Foote *et al.,* 2002; Sahinduran y Albay, 2004; Ranjan *et al.,* 2005; Padilla *et al.,* 2006). Sin embargo, el desarrollar suplementos de vitamina C que sean estables en el rumen y la estandarización de la dosis son factores que se tienen que tomar en cuenta para establecer su uso a gran escala con fines preventivos y terapéuticos (Ranjan *et al.,* 2012).

En cuanto al peso de cordero al nacimiento no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$), sin embargo, Halilloglu y Serpek (2000) observaron una respuesta positiva entre los niveles de ácido ascórbico (500 mg, intramuscular) y el peso del cordero al nacimiento. De igual forma Hashem *et al.* (2016) observaron que el peso al nacer de los corderos fue mayor ($p<0.05$) en el tratamiento donde se incluía la vitamina C (3. 97 kg) comparado con el tratamiento testigo (3.30 kg), a

pesar de que la suplementación se realizó al inicio de la gestación. Por otro lado, Lee *et al.* (2004) en humanos observaron que el incremento de vitamina C y E en suero durante el segundo trimestre de gestación están relacionados con el peso y longitud de los bebes, esto realizado sin ninguna suplementación. En humanos altas dosis de vitamina E oral durante el primer trimestre de la gestación se asociaron con una disminución del peso al nacer (Boskovic *et al.,* 2005). En el presente estudio, no se encontraron diferencias en el peso al nacimiento, posiblemente debido a que la suplementación solamente se realizó durante el primer mes de gestación considerando que el mayor crecimiento fetal ocurre en el último tercio de la gestación.

7.2 Estado oxidativo y ácido ascórbico

El estado oxidativo se ha estudiado principalmente durante el peri-parto, la cual es la etapa más susceptible (Bernabucci *et al.,* 2005). Sin embargo, muy poco se sabe sobre el estado oxidativo durante la sincronización de estros y gestación temprana (Salinas *et al.,* 2016).

En los últimos años, el detectar el daño que provocan los radicales libres y el proteger contra dicho daño se ha vuelto muy importante en estudios relacionados con la producción y reproducción de rumiantes, ya que el nivel de peroxidación lipídica y el estado antioxidante brindan información sobre el estado metabólico del animal (Castillo *et al.,* 2003). En ausencia de valores reportados en la literatura sobre la capacidad antioxidante en rumiantes durante la sincronización de estros e inicio de gestación, los resultados observados sobre el poder antioxidante (FRAP) podrían ser referencia para evaluar el estado antioxidante del animal en esta etapa. En el presente trabajo se observa en los muestreos que la capacidad antioxidante se disminuye en eventos tales como empadre y reconocimiento materno (12-13 días de gestación) aunque sin mostrar diferencias ($p<0.05$). Algunos autores mencionan que el estrés oxidativo altera el estado endocrino, la duración del estro, crecimiento y desarrollo folicular, y el desarrollo inicial del embrión, los cuales son efectos perjudiciales para la fertilidad (Dobson *et al.,* 2012). Estos efectos son causados por el aumento de la formación de especies reactivas a oxigeno (ERO) sobre la

capacidad antioxidante. Se ha observado en gallinas (Ciftci *et al.,* 2005), conejas (Yassein *et al.,* 2008) y ratas (Al-Enazi, 2007) bajo estrés calórico, que la suplementación de vitamina C y E mejora los rendimientos reproductivos.

Salinas *et al*. (2016) mencionan que un consumo mayor de antioxidantes y una mayor síntesis de antioxidantes enzimáticos son mecanismos por los que se puede modificar la capacidad antioxidante. En la presente investigación las ovejas se encontraban en el mismo estado fisiológico, por lo que al encontrarse la mayor capacidad antioxidante observada en el tratamiento 1 (T1) pudo deberse a la suplementación de los 3 g de vitamina C, sin embargo, en el tratamiento 2 (T2) donde se proporcionaban 6 g de la vitamina no se incrementó la capacidad antioxidante de forma significativa. Paul y Datta-Gupta (1977) reportaron que un consumo excesivo de ácido ascórbico causa problemas reproductivos en ratas machos. Sin embargo, es muy raro observar reacciones toxicas en dosis menores a 4 g/día, aunque altas dosis de vitamina C son tolerables por el organismo, el exceso de la vitamina es rápidamente eliminado en la orina (Sneer *et al.,* 1968). Se ha demostrado que una dosis oral diaria de vitamina C (3 g o más) puede contribuir a aliviar el estrés por calor y mejora la respuesta reproductiva (Hashen *et al.,* 2016), en la presente investigación, al suplementarse 6 g de vitamina C no ocasionó problemas a nivel reproductivo.

En humanos se ha reportado que el estrés oxidativo se presenta con un aumento de malonaldehído (MDA) durante la etapa media del cuerpo lúteo, coincidiendo con la máxima capacidad esteroidogénica (Vega *et al.,* 1994) y la formación de MDA es un indicador crucial de la regresión lútea y muerte celular (Greenhagh, 1990). En la presente investigación, no se observaron diferencias entre los tratamientos ni entre muestreos ($p<0.05$) al determinar la lipoperoxidación en plasma. En un estudio que se llevó a cabo en ratas macho, se observó que al aumentarse la concentración de ácido ascórbico en suero sanguíneo en los animales tratados, los niveles de lipoperoxidación disminuyeron (Sonmez *et al.,* 2005). Las altas concentraciones de ácido ascórbico actúan como defensa contra los radicales libres, lo cual se ve reflejado en los bajos niveles de lipoperoxidación que coinciden con el aumento en los niveles de ácido ascórbico.

En ovejas durante el periodo de estro se ha observado que los niveles de MDA comienzan a aumentar después de las montas y la gestación (Mohebbi-Fani *et al.,* 2012). Los mismos autores concluyen que el comienzo de la actividad cíclica ovárica durante la temporada de servicio y la gestación resulta en un estrés oxidativo y se requiere una mayor demanda de vitaminas antioxidantes en los tejidos reproductivos. El estrés oxidativo aumenta durante la gestación temprana debido a todos los procesos metabólicos que se llevan a cabo para la formación de la placenta. Una reducción del sistema antioxidante placentario se ha sugerido como un factor clave en el fracaso temprano del embarazo en humanos (Liu *et al.,* 2006). Las vitaminas antioxidantes, solas o combinadas disminuyen la mortalidad embrionaria/fetal, reabsorciones y malformaciones (Cederberg *et al.,* 2001; Coffey y Britt, 1993). La lipoperoxidación generalmente sigue la misma tendencia de la capacidad antioxidante, sugiriendo que el descenso de la capacidad antioxidante se relaciona al hecho de que los antioxidantes son utilizados para disminuir la lipoperoxidación (Salinas *et al.,* 2016).

La concentración de vitamina C en plasma sanguíneo se incrementó significativamente en los tratamientos 1 (T1) y 2 (T2) comparados con el testigo ($P>0.05$), sin embargo, entre las dosis de vitamina C no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$). Padilla *et al.* (2014) observaron que en vacas se incrementó la concentración de vitamina C (recubierta de aceite de soya hidrogenado) en plasma conforme se incrementaba la dosis, por lo cual indican que al estar protegida la vitamina C, puede atravesar el rumen y por consiguiente ser absorbida en el intestino delgado. El mismo incremento se pudo observar en la presente investigación ya que al estar protegida la vitamina C ayudó a que se incrementaran lo niveles en plasma. Mohebbi-Fanni *et al.* (2012) encontraron que las vitaminas con capacidad antioxidante tales como las vitaminas A, E y C disminuyen al inicio de la gestación, lo cual implica una reducción de la capacidad antioxidante debido a que aumentan las ERO, ocasionando un estrés oxidativo. Sin embargo, en este caso se observó una disminución en la concentración de vitamina C durante eventos como aplicación de prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$) y retiro de CIDR aunque sin presentarse diferencias significativas entre los tratamientos. Miszkiel *et al.* (1999) reportan que

el nivel de ácido ascórbico que se encuentra en el cuerpo lúteo cambió significativamente en las diferentes etapas del ciclo estral de manera similar a los cambios de progesterona tanto en novillas como en vacas ciclando o gestantes, lo cual explica que la concentración de ácido ascórbico en cuerpo lúteo disminuya durante la regresión lútea. Además, se ha demostrado que las prostaglandinas $F_{2\alpha}$ causan una rápida disminución del ascorbato almacenado en cuerpo lúteo cuando se aplican en ratas (Leowit *et al.,* 1969; Sato *et al.,* 1974) y cerdos (Petroff *et al.,* 1998), en esta investigación se observa esa misma respuesta, ya que en el día experimental 12 donde se realizó la aplicación de $PGF_{2\alpha}$, hubo un descenso de ácido ascórbico (figura 5). En búfalas se ha mostrado que el cuerpo lúteo en etapa funcional es una fuente enriquecida de ácido ascórbico en comparación con el fluido folicular y el tejido estromal ovárico. Se ha demostrado que el ácido ascórbico tiene una función importante en el crecimiento y capacidad esteroidogénica de las células lúteas (Meur *et al.,* 1999).

Un aumento de ERO se ha observado en caso de deficiencia de vitamina A, C y E, debido a que estos compuestos además de obstaculizar directamente los efectos de las ERO, también controlan la expresión genética y el metabolismo, manteniendo así su papel crucial en la concepción y mantenimiento de la gestación (Mohebbi-Fani *et al.,* 2012). Por lo tanto, a medida que progresa la gestación, la transferencia placentaria de vitamina A, C, E y algunas vitaminas del grupo B (Quirk y Norton, 1987) y minerales (Hidiroglou *et al.,* 1994) aumenta con el tiempo, para equilibrar los efectos de las ERO, lo cual se puede reflejar en el último muestreo de ácido ascórbico donde se obtuvieron los niveles más altos en los tratamientos, o bien, se pudo deber a que las etapas más demandantes como sincronización de estro, empadre y reconocimiento materno, ya habían pasado por lo cual el uso de antioxidantes se disminuye, teniendo como resultado un aumento en la vitamina C.

7.3 Progesterona

Varios autores han señalado que un alto requerimiento de ácido ascórbico es necesario para facilitar la producción de progesterona (Luck y Zhao, 1993; Sheldrick y Flint, 1989). La progesterona es la principal hormona encargada de mantener la

gestación y sus bajas concentraciones al inicio de la misma pueden desencadenar abortos (Diskin y Morris, 2008), durante la gestación se requiere una secreción continua de progesterona para proveer un medio ambiente uterino apropiado para el mantenimiento de la misma (Niswender *et al.,* 2000). Las concentraciones de ácido ascórbico y progesterona en plasma sanguíneo siguen una misma tendencia, ya que se ha observado que se almacena principalmente en cuerpo lúteo, seguido por los compartimentos de la teca interna y granulosa (Deane, 1952; Luck *et al.,* 1995; Meur *et al.,* 1999). El cuerpo lúteo junto con la placenta secretan más progesterona que la requerida después del día 60 (Al- Gubory *et al.,* 1999).

En un estudio realizado con vacas Holstein, no se observó ninguna correlación entre la concentración de vitamina C y los niveles de progesterona en plasma (Ataman *et al.,* 2009) por otro lado, Wise *et al*. (1987) reportaron que no existe una relación significativa entre vitamina C, niveles de progesterona de fluido folicular y diámetro folicular en vacas. En la presente investigación la adición de vitamina C no modificó la concentración de progesterona en ninguno de los muestreos, sin embargo, en mujeres con fase lútea defectuosa, a las cuales se les administraron oralmente 50 mg/ día de ácido ascórbico se ocasionó un incremento en la concentración de progesterona (Henmi *et al*., 2003).

7.4 Glucosa e insulina

Los rumiantes pueden sintetizar la vitamina C a partir de precursores de carbohidratos, incluyendo glucosa y galactosa. La glucosa constituye el nutriente primario para el crecimiento del embrión y síntesis de leche, es por ello que los requerimientos nutricionales se aumentan durante la gestación, especialmente si existe más de un feto (Bell y Bauman, 1997). El incremento de las necesidades se debe a que el feto puede llegar a consumir de un 60 a 70 % de la producción de glucosa de la madre y que el 70 % del peso del cordero al nacimiento se obtenga en las últimas seis semanas de gestación. Esta etapa es crítica ya que la oveja no siempre alanza a satisfacer los requerimientos nutricionales suficientes y debe compensar esas deficiencias con sus reservas corporales (Milne y Russel, 1979).

Los niveles normales de glucosa en suero sanguíneo en ovinos van de 50-80 mg/dL (Kaneko, 1980). En un estudio llevado a cabo con ovejas santa Inés, las cuales se sincronizaron con esponjas (Progespon®), se reportaron niveles promedio de glucosa de 64.8 mg/dl durante la época de verano e invierno (Balaro *et al.,* 2015). Aunque no existe información de los niveles de glucosa en empadre y gestación temprana con alguna suplementación antioxidante los resultados obtenidos entran dentro del rango mencionado en la literatura. Sin embargo, en trabajos realizados durante la lactancia, MacLeod *et al*. (1999) indicaron que en vacas altas productoras presentaban baja síntesis de ácido ascórbico como resultado de las altas demandas de glucosa, especialmente durante el inicio de la lactación. Por otro lado, Santos *et al.* (2001) reportaron que las concentraciones de ácido ascórbico en plasma no se vieron afectadas en ninguna etapa de la lactación, sugiriendo que la síntesis de ácido ascórbico endógena cumple con las demandas de vitamina C en vacas lactando.

Patnaik (1968) mencionan que la producción endógena de vitamina C puede disminuirse si se cuenta con vitamina C exógena, ya que el consumo de ácido ascórbico redujo su producción en hígado en ratas, indicando que la síntesis de vitamina C en el hígado es determinada por la concentración de la sangre portal y la suplementación en el alimento. Sin embargo, en este trabajo no se observó diferencia ($P>0.05$) entre los tratamientos que indiquen que la suplementación de vitamina C pudiera actuar como un mecanismo de preservación de la glucosa para ser potencialmente dirigido hacia el crecimiento del embrión, en lugar de la producción de la vitamina C.

La insulina es una hormona metabólica esencial en los procesos reproductivos y está estrechamente relacionada a la concentración de glucosa circulante. En este estudio las concentraciones de insulina se encontraron en un rango de 0.50 a 0.55 ng/ml entre tratamientos durante la sincronización de estro, empadre e inicio de gestación. Las concentraciones tienden a aumentar durante la gestación ya que responde a los cambios en el aporte energético. En la gestación temprana, la capacidad de respuesta de la insulina a los nutrientes, sobre todo de la glucosa suelen estar aumentados (Spellacy y Goetz, 1963; Bleicher *et al.,* 1964; Kalkhoff *et*

al., 1964). Se ha observado que el suministro de concentrado incrementa las concentraciones de glucosa e insulina (Razz y Clavero, 2004; Noro *et al*., 2006). Sin embargo, en animales con subnutrición, la disminución en las concentraciones de glucosa es acompañada por una disminución en las concentraciones de insulina, no obstante, en la presente investigación se utilizaron ovejas de buen estado corporal, lo cual provocó que los niveles de insulina y glucosa se mantuvieran estables (Sosa *et al.,* 2006).

VIII. CONCLUSIÓN

La suplementación de vitamina C protegida (3 o 6 g) en ovejas vía oral durante la sincronización, empadre e inicio de gestación, aumentó los niveles de vitamina C en plasma y mejoró la capacidad antioxidante, sin tener efectos perjudiciales en las variables reproductivas, concentraciones de progesterona, glucosa e insulina, no obstante, se requieren más investigaciones en el tema para determinar beneficios adicionales y las etapas especificas en la reproducción.

IX. LITERATURA CITADA

Abecia, J. A., Forcada, F., y González-Bulnes, A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. Animal Reproduction Science, 130(3):173-179.

Acosta, T. J., y Miyamoto, A. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. Animal Reproduction Science, 82:127-140.

Agudo, A., Cabrera, L., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Berenguer, T. y Martínez, C. 2007. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition, 85(6):634-1642.

Al-Enazi, M. M. 2007. Influence of Alpha Tocopherol on Heat Stress-Induced Changes in the Reproductive Function of Swiss Albino Mice. Saudi Journal of Biological Sciences, 14(1):61-67.

Al-Gubory, K. H., Solari, A., y Mirman, B. 1999. Effects of luteectomy on the maintenance of pregnancy, circulating progesterone concentrations and lambing performance in sheep. Reproduction, Fertility and Development, 11(6):317-322.

Al-Katib, S. R., Al-Azzam A. H. A, Hadead S. A. 2012. The effect of vitamin C on ovary of female white rats treated with kmno4. Histological and physiological study. Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences; 3: 1-16.

Amiridis, G. S., y Cseh, S. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. Animal Reproduction Science, 130(3):152-161.

Aplin, J. D., Campbell, S., Donnai, P., Bard, J. B., y Allen, T. D. 1986. Importance of vitamin C in maintenance of the normal amnion: an experimental study. Placenta, 7(5):377-389.

Arendt, J. 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. Reviews of Reproduction, 3(1):13-22.

Arteaga, C. J. D. 2012. Mensaje institucional en el acto Inaugural del VII. Foro Ovino del Estado de México. INIFAP. ICAMEX, pp. 1-4.

Atuesta, J., y Diaza, A. G. 2011. Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. Spei Domus, 7(14).

Avello, M., y Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular. Ciencia Ahora, 17, 8-13.

Azevedo, C., Maia, I., Canada, N., y Simões, J. 2014. Comparison of fertility, regular returns-to-estrus, and calving interval between Ovsynch and CO-synch+ CIDR protocols in dairy cows. Theriogenology, 82(6):910-914.

Balaro, M. F. A., Brandão, F. Z., Peneiras, A. B. V., Oba, E., da Fonseca, J. F., Almosny, N. R. P., y da Cruz Cardoso, E. 2015. Reproductive performance, metabolic and hormonal profiles of Santa Inês ewes in winter and summer under tropical conditions. Tropical Animal Health and Production, 47(3): 627-631.

Barrell, G. K., Moenter, S. M., Caraty, A., y Karsch, F. J. 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. Biology of Reproduction, 46(6):1130-1135.

Bartosz, G. 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? Biochemical Pharmacology, 77(8):1303-1315.

Bearden, H. J., & Fuquay, J. W. (1980). Applied animal reproduction. Reston Publishing Company, Inc. pp. 5-12.

Benzie, I. F., y Strain, J. J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology, 299:15-27.

Berg, R. A., y Prockop, D. J. 1973. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 52(1): 115-120.

Berisha, B., y Schams, D. 2005. Ovarian function in ruminants. Domestic Animal Endocrinology, 29(2):305-317.

Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., y Nardone, A. 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science, 88(6):2017-2026.

Bleicher, S. J., O'Sullivan, J. B., y Freinkel, N. 1964. Carbohydrate metabolism in pregnancy: The interrelations of glucose, insulin and free fatty acids in late pregnancy and post-partum. New England Journal of Medicine, 271(17):866-872.

Boskovic, R., Gargaun, L., Oren, D., Djulus, J., y Koren, G. 2005. Pregnancy outcome following high doses of Vitamin E supplementation. Reproductive Toxicology, 20(1):85-88.

Caraty, A., Delaleu, B., Chesneau, D., y Fabre-Nys, C. 2002. Sequential role of E_2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. Endocrinology, 143(1):139-145.

Cardinale, G. J., y Udenfriend, S. 1974. Prolyl hydroxylase. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 41(0):245-300.

Castillo, C., Hernández, J., López-Alonso, M., Miranda, M., Benedito, J.L. 2003. Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: preliminary observations. Archives of Animal Breeding, 46:227–233.

Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M. L., y Benedito, J. L. 2006. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. Research in Veterinary Science, 80(2):133-139.

Cederberg, J., Simán, C. M., y Eriksson, U. J. 2001. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. Pediatric Research, 49(6):755.

Chatterjee, I. B. 1978. Ascorbic acid metabolism. In Human and Veterinary Nutrition, Biochemical Aspects of Nutrients. Karger Publishers, vol. 30, pp. 69-87.

Chatterjee, I. B., Majumder, A. K., Nandi, B. K., y Subramanian, N. 1975. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. Annals of the New York Academy of Sciences, 258(1):24-47.

Christian, R. E., Ulberg, L. C., Phillips, P. H., y Casida, L. E. 1951. The Response of Low-Fertility Cows to Chlorobutanol and Ascorbic Acid Administration1, 2. Journal of Dairy Science, 34(10):978-987.

Ciftci, M., Ertas, O. N., y Guler, T. 2005. Effects of vitamin E and vitamin C dietary supplementation on egg production and egg quality of laying hens exposed to a chronic heat stress. Revue Medical Veterinary, 156(2):107-111.

Coffey, M. T., y Britt, J. H. 1993. Enhancement of sow reproductive performance by beta-carotene or vitamin A. Journal of Animal Science, 71(5):1198-1202.

Cohen, S. A., y Paeglow, R. J. 2001. Scurvy: an unusual cause of anemia. The Journal of the American Board of Family Practice, 14(4):314-316.

Colognato, H., y Yurchenco, P. D. 2000. Form and function: the laminin family of heterotrimers. Developmental Dynamics, 218(2):213-234.

Combs, G. F. 2008. Vitamin C. In: The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health, third edition (Ed. G. F. Combs), pp. 235.260.

Covarrubias, E. R., y Sotelo, C. N. 2003. Escorbuto en la infancia. Presentación de un caso. Boletín Clínico Hospital Infantil. Edo Son, 20:114-8.

Crha, I., Hruba, D., Ventruba, P., Fiala, J., Totusek, J., y Visnova, H. 2003. Ascorbic acid and infertility treatment. Central European Journal of Public Health, 11(2): 63-67.

Das, P. C., Das, K. P., Bagchi, K., y Dey, C. D. 1993. Evaluation of tissue ascorbic acid status in different hormonal states of female rat. Life Sciences, 52(18): 1493-1498.

Daykin PW. 1960. Veterinary applied pharmacology and therapeutics. London: Bailliere Tindall and Cassell, pp. 619–621.

Deane, H. W. 1952. Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. Developmental Dynamics, 91(3):363-413.

Deb C., y Chatterjee A. 1963. Role of ascorbic acid in the inhibition of estrous cycle in alloxan diabetes. Endocrinology; 72:159-160.

Delgadillo M., J., y Orozco, E. 2001. El territorio nacional y sus recursos naturales. Indicadores básicos. Los terrenos de la política ambiental en México. Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM, Colección Jesús Silva Herzog, 9-58.

Dobson, H., Fergani, C., Routly, J. E., y Smith, R. F. 2012. Effects of stress on reproduction in ewes. Animal Reproduction Science, 130(3-4):135-140.

Eipper, B. A., y Mains, R. E. 1991. The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. The American Journal of Clinical Nutrition, 54(6): 1153-1156.

Elejalde, G. J. I. 2001. Oxidación, entre la vida y la enfermedad, In Anales de Medicina Interna, 18(1):1-4.

Elsas, L. J., Miller, R. L., y Pinnell, S. R. 1978. Inherited human collagen lysyl hydroxylase deficiency: ascorbic acid response. The Journal of Pediatrics, 92(3):378-384.

El-Shahat, K. H., y Abdel Monem, U. M. 2011. Effects of dietary supplementation with vitamin E and/or selenium on metabolic and reproductive performance of Egyptian Baladi ewes under subtropical conditions. World Applied Sciences Journal, 12(9):1492-1499.

Englard, S., y Seifter, S. 1986. The biochemical functions of ascorbic acid. Annual Review of Nutrition, 6(1):365-406.

Eyre, D. R. 1980. Collagen: molecular diversity in the bodys protein scaffold. Science, 207(4437):1315-1322.

FAOSTAT. 2014. Producción, Consumo, Comercio. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. http://faostat.fao.org, 16-junio-2017.

Foote, R. H., Brockett, C. C., y Kaproth, M. T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Animal Reproduction Science, 71(1-2):13-23.

Fortune, J. E. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. Biology of Reproduction, 35(2):292-299.

Fortune, J. E., y Quirk, S. M. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. Journal of Animal Science, 66(suppl_2):1-8.

Francescone, M. A., y Levitt, J. 2005. Scurvy Masquerading. Cutis, 76, 261-266.

Frankel, E. N., y Tappel, A. L. 1991. Headspace gas chromatography of volatile lipid peroxidation products from human red blood cell membranes. Lipids, 26(6): 479-484.

Frei, B., England, L., y Ames, B. N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16):6377-6381.

Galway, A. B., Hsueh, A. J., Keene, J. L., Yamoto, M., Fauser, B. C. J. M., y Boime, I. 1990. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. Endocrinology, 127(1):93-100.

Garcia, E., 2004. Modifications to the system Köppen climate classification. 5th ed. Book series number 6. Institute of Geography, Universidad Autónoma de México. p. 50.

Garrel, C., Fowler, P. A., y Al-Gubory, K. H. 2010. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. Journal of Endocrinology, 205(1):107-116.

Gatti, M., y Ungerfeld, R. 2012. Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. Theriogenology, 78(8):1796-1799.

Godfrey, R. W., Collins, J. R., Hensley, E. L., y Wheaton, J. E. 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. Theriogenology, 51(5):985-997.

González-Bulnes, A., Veiga-Lopez, A., Garcia, P., Garcia-Garcia, R. M., Ariznavarreta, C., Sanchez, M. A. y Flores, J. M. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. Theriogenology, 63(9):2523-2534.

González-Stagnaro, C. 1993. Comportamiento reproductivo de ovejas y cabras tropicales. Revista Científica, 3(3):99-111.

Goralczyk, R., Moser, U. K., Matter, U., y Weiser, H. 1992. Regulation of steroid hormone metabolism requires L-ascorbic acid. Annals of the New York Academy of Sciences, 669(1):349-351.

Gould, B. S. 1968. Collagen biosynthesis. Treatise on collagen, 2(Part A): pp. 139-183.

Greenhalgh, E. A. 1990. Luteal steroidogenesis and regression in the rat: progesterone secretion and lipid peroxidation induced in luteal cells by human chorionic gonadotrophin, phospholipase A2 and prostaglandin $F_{2\alpha}$. Journal of Endocrinology, 125(3):397-402.

Guido, R.M.M. y Aalt, B. 1983. Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. FEBS Letter, 159(1-2):24-28.

Gutteridge, J., y Halliwell, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. Annals of the New York Academy of Sciences, 899(1):136-147.

Haliloğlu, S., y Serpek, B. 2000. The effects of plasma vitamin C and ceruloplasmin levels and exogen vitamin C supplementation on reproduction in sheep. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 24(4):403-412.

Halliwell, B. 1989. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? Acta Neurológica Scandinavica, 80 (s126):23-33.

Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. Annual Review of Nutrition, 16(1):33-50.

Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA. pp. 20-27.

Hansel, W., y Convey, E. M. 1983. Physiology of the estrous cycle. Journal of Animal Science, 57(Supplement_2):404-424.

Hashem, N. M., Abd-Elrazek, D., Abo-Elezz, Z. R., y Latif, M. G. A. 2016. Effect of vitamin A or C on physiological and reproductive response of Rahmani ewes during subtropical summer breeding season. Small Ruminant Research, 144:313-319.

Hashemi M., Safdarian M., Kafi, M. 2006. Oestrous response to synchronization of oestrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes. Small Ruminant Research, 65:279-283.

Heikkila, R. E., y Manzino, L. 1987. Ascorbic acid, redox cycling, lipid peroxidation, and the binding of dopamine receptor antagonists. Annals of the New York Academy of Sciences, 498(1):63-76.

Henmi, H., Endo, T., Kitajima, Y., Manase, K., Hata, H., y Kudo, R. 2003. Effects of ascorbic acid supplementation on serum progesterone levels in patients with a luteal phase defect. Fertility and Sterility, 80(2):459-461.

Hidiroglou, M. 1999. Technical note: forms and route of vitamin C supplementation for cows. Journal of dairy science, 82(8):1831-1833.

Hidiroglou, M., Batra, T. R., y Roy, G. L. 1994. Changes In Plasma α-Tocopherol and Selenium of Gestating Cows Fed Hay or Silage1. Journal of dairy science, 77(1):190-195.

Hidiroglou, M., Batra, T. R., y Zhao, X. 1997. Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulations in sheep. Reproduction Nutrition Development, 37(4):443-448.

Hixon, J. E., y Hansel, W. 1974. Evidence for preferential transfer of prostaglandin $F_{2\alpha}$ to the ovarian artery following intrauterine administration in cattle. Biology of Reproduction, 11(5):543-552.

Hopkins, F. G. 1912. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries. The Journal of Physiology, 44(5-6):425-460.

Hurley, W. L., y Doane, R. M. 1989. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. Journal of Dairy Science, 72(3):784-804.

INEGI - Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2012. Sistema Estatal y Municipal de Bases de Datos (SIMBAD): área geográfica. México. 2009. http://sc.inegi.org.mx/sistemas/cobdem/, 01- Junio-2017.

Itze, L. 1984. Ascorbic acid: metabolism in ruminants. International Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals, Skjoldenaesholm (Denmark), Sep 1983.

Jaber, L. S., Hanna, N., Barbour, E. K., Said, M. A., Rawda, N., Chedid, M., y Hamadeh, S. K. 2011. Fat mobilization in water restricted Awassi ewes supplemented with vitamin C. Journal of Arid Environments, 75(7):625-628.

Jacota, S.K., y Dani, H.M. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin c, using Folin phenol reagent. Analytical Biochemistry, pp.127-128.

Jeffrey, J. J., y Martin, G. R. 1966. The role of ascorbic acid in the biosynthesis of collagen II. Site and nature of ascorbic acid participation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 121(2):281-291.

Jesse III, F. G. 1993. Ascorbic acid bioavailability in foods and supplements. Nutrition Reviews, 51(10):301-303.

Jimenez, S., Harsch, M., y Rosenbloom, J. 1973. Hydroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 52(1):106-114.

Kalkhoff, R., Schalch, D. S., Walker, J. L., Beck, P., Kipnis, D. M., y Daughaday, W. H. 1964. Diabetogenic Factors Associated with Pregnancy. Transactions of the Association of American Physicians, 77:270.

Kallner, A., Hartmann, D., y Hornig, D. 1979. Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man. The American Journal of Clinical Nutrition, 32(3):530-539.

Kaneko, J. J. 1980. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. New York, London, Academic Press, pp. 264.

Karsch, F. J., Bittman, E. L., Robinson, J. E., Yellon, S. M., Wayne, N. L., Olster, D. H., y Kaynard, A. H. 1986. Melatonin and photorefractoriness: loss of

response to the melatonin signal leads to seasonal reproductive transitions in the ewe. Biology of Reproduction, 34(2):265-274.

Kolodecik, T. R., Aten, R. F., y Behrman, H. R. 1998. Ascorbic acid-dependent cytoprotection of ovarian cells by leukocyte and nonleukocyte peroxidases. Biochemical Pharmacology, 55(9):1497-1503.

Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M., y Robert, L. 1990. Extracellular matrix. FEBS letters, 268(2):386-393.

Lamb, G. C., Dahlen, C. R., Larson, J. E., Marquezini, G., y Stevenson, J. S. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. Journal of Animal Science, 88(13):181-192.

Lee, B. E., Hong, Y. C., Lee, K. H., Kim, Y. J., Kim, W. K., Chang, N. S., y Hann, H. J. 2004. Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. European Journal of Clinical Nutrition, 58(10):1365.

Legan, S. J., y Karsch, F. J. 1979. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. Biology of Reproduction, 20(1):74.

Letelier, C.A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R.A., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A., Flores, J.M., Gonzalez-Bulnes, A. 2009. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. Theriogenology 71:676–682.

Levine, M., y Morita, K. 1985. Ascorbic acid in endocrine systems. In Vitamins and Hormones. Academic Press, vol. 42, pp. 1-64.

Liu, A.X., Jin, F., Zhang, W. W., Zhou, T.H., Zhou, C., y Yao, W. M. 2006. Proteomic analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. Biology of Reproduction, 75:414–420.

Lledías, F., y Hansberg, W. 1999. Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. Photochemistry and Photobiology, 70(6):887-892.

Loewit, K., Badawy, S., y Laurence, K. 1969. Alteration of corpus luteum function in the pregnant rat by antiluteinizing serum. Endocrinology, 84(2):244-251.

Luck, M. R., Jeyaseelan, I. y Scholes, R.A.1995. Ascorbic acid and fertility. Biology of Reproduction, 52:262–266.

Luck, M. R., Jeyaseelan, I., y Scholes, R. A. 1995. Ascorbic acid and fertility. Biology of Reproduction, 52(2):262-266.

Luck, M. R., y Zhao, Y. 1993. Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. Journal of Reproduction and Fertility, 99(2):647-652.

Luck, M. R., y Zhao, Y. 1993. Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. Journal of Reproduction and Fertility, 99(2):647-652.

Lucy, M. C. 2006. Estrus: basic biology and improving estrous detection. In Proc. Dairy Cattle Reproductive Conference, pp. 29-37.

MacLeod DD, Zhang X, Kennelly JJ, Ozimek L. 1999. Pharmacokinetics of ascorbic acid and ascorby L-2- polyphosphate in the rumen fluid of dairy cows. Milchwissenschaft, 54:63–65.

MacLeod, D. D., Zhang, X., Kennelly, J. J., y Ozimek, L. 1999. Ascorbyl-2-polyphosphate as a source of ascorbic acid for dairy cattle. Milchwissenschaft, 54(3):123-126.

Maldonado, J. G. L., Santos, R. R., De Lara, R. R., y Valverde, G. R. 2017. Impacts of vitamin C and E injections on ovarian structures and fertility in Holstein cows under heat stress conditions. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 41(3):345-350.

Malpaux, B., Viguie, C., Skinner, D. C., Thiery, J. C., Pelletier, J., y Chemineau, P.1996. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. Animal Reproduction Science, 42(1):109-117.

Malpaux, B., Viguie, C., Skinner, D. C., Thiery, J. C., Pelletier, J., y Chemineau, P. 1996. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. Animal Reproduction Science, 42(1):109-117.

Manes, J., y Ungerfeld, R. 2015. Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 39(1):104-108.

Mantecón, A. R., Giráldez, F. J., y Lavín, P. 2003. Requerimientos Nutricionales para Ovinos en Reproducción. Desde el Suelo a la Gestión, Curso para Profesionales y Técnicos en Producción Ovina. Valdivia, Chile, pp. 28-43.

Martínez, G. S., Aguirre O. J., Jaramillo, L. E., Macías, C. H., Carrillo, D. F., Herrera, G. M. T. y Pérez, E. E. 2010. Alternativas para la producción de carne ovina en Nayarit, México. Revista Fuente, 1 (2):12-16.

Martínez-Tinajero, J. J., Sánchez Torres-Esqueda, M. T., Torres-Hernández, G., Herrera-Haro, J. G., Bucio-Alanís, L., Rojo-Rubio, R., y Hernández-Martínez, J. 2008. Comportamiento reproductivo de ovejas F1 (Damara x Merino) sincronizadas con CIDR y dos tiempos de aplicación de GnRH. Universidad y Ciencia, 24(3):175-182.

Matsui, T. 2012. Vitamin C nutrition in cattle. Asian-Australian Journal of Animal Science, 25:597-605.

Maxwell, T. J., Doney, J. M., Milne, J. A., Peart, J. N., Russel, A. J. F., Sibbald, A. R., y MacDonald, D. 1979. The effect of rearing type and prepartum nutrition on the intake and performance of lactating Greyface ewes at pasture. The Journal of Agricultural Science, 92(1):165-174.

McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K., y Samuelsson, B. 1972. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ identified as a luteolytic hormone in sheep. Nature, 238(83):129-134.

McMillen, J. C., Houghton, D. C., y Young, I. R. 1995. Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. Journal of Reproduction and Fertility, Suppl. 49:137-146.

Meur, S. K., Sanwal, P. C., y Yadav, M. C. 1999. Ascorbic acid in buffalo ovary in relation to oestrous cycle. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 36:134–135.

Miszkiel, G., Skarzynski, D., Bogacki, M., y Kotwica, J. 1999. Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the corpora lutea of cyclic and pregnant cattle. Reproduction Nutrition Development, 39(4):509-516.

Mohebbi-Fani, M., Mirzaei, A., Nazifi, S., y Shabbooie, Z. 2012. Changes of vitamins A, E, and C and lipid peroxidation status of breeding and pregnant sheep during dry seasons on medium-to-low quality forages. Tropical Animal Health and Production, 44(2):259-265.

Mollinedo, P., M. A., y Carrillo, L., K. J. 2014. Absorción, excreción y metabolismo de las vitaminas hidrosolubles. Revista de Actualización Clínica Investiga, 41:2146.

Monfared, S. S. M. S., Vahidi, H., Abdolghaffari, A. H., Nikfar, S., y Abdollahi, M. 2009. Antioxidant therapy in the management of acute, chronic and post-ERCP pancreatitis: a systematic review. World Journal of Gastroenterology: WJG, 15(36):4481.

Morris, D., y Diskin, M. 2008. Effect of progesterone on embryo survival. Animal, 2(8):1112-1119.

Murray, A. A., Molinek, M. D., Baker, S. J., Kojima, F. N., Smith, M. F., Hillier, 1. S., y Spears, N. 2001. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. Reproduction, 121(1):89-96.

Mutinati, M., Piccinno, M., Roncetti, M., Campanile, D., Rizzo, A., y Sciorsci, R. L. 2013. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. Reproduction in Domestic Animals, 48(3):353-357.

Myatt, L., y Cui, X. 2004. Oxidative stress in the placenta. Histochemistry and Cell Biology, 122(4):369-382.

Naidu, K. A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Nutrition Journal, 2(1):7.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. 1995. Lehninger. Principios de Bioquímica–2da Edición. Ed. Omega. pp. 341-70.

Nelson, M. M., y Forfar, J. O. 1971. Associations between drugs administered during pregnancy and congenital abnormalities of the fetus. British Medical Journal, 1(5748):523-527.

Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., y McIntush, E. W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiological Reviews, 80(1):1-29.

Noro, M., Vargas, V., Pulido, R. G., y Wittwer, F. 2006. Efecto del tipo de concentrado sobre indicadores sanguíneos del metabolismo de energía y de proteínas en vacas lecheras en pastoreo primaveral. Archivos de Medicina Veterinaria, 38(3):227-232.

NRC, National Research Council. 1985. Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Sheep. Sixth Revised Edition, National Academy of Sciences, Washington, D.C. USA.

Nuttall, S.L. Kendall, M.J. y Martin, U. 1999. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease, Quarterly Journal of Medicine, 92:239-244.

Ohkawa, H., Ohishi, N., y Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry, 95(2):351-358.

Omontese, B. O., Adewuyi, A. B., Rekwot, P. I., Nwannenna, A. I.,y Rwuaan, J. S. 2017. Effect of ascorbic acid on the conception rate of Yankasa ewes after estrus synchronization. Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 70(1):9-12.

Padayatty, S. J., y Levine, M. 2001. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. Canadian Medical Association Journal, 164(3):353-355.

Padilla, L., Matsui, T., Ikeda, S., Kitagawa, M., y Yano, H. 2007. The effect of vitamin C supplementation on plasma concentration and urinary excretion of vitamin C in cattle. Journal of Animal Science, 85(12):3367-3370.

Padilla, L., Matsui, T., Kamiya, Y., Kamiya, M., Tanaka, M., y Yano, H. 2006. Heat stress decreases plasma vitamin C concentration in lactating cows. Livestock Science, 101(1):300-304.

Palludan, B. y I. Wegger. 1984. Plasma ascorbic acid in calves. In: Ascorbic Acid in Domestic Animals. Eds. I. Wegger, F. Tagwerker and J. Moustgaard. Royal Danish Agricultural Society, Copenhagen, Denmark. pp. 131-138.

Pardo, A., V. P. 2004. La importancia de las vitaminas en la nutrición de personas que realizan actividad físico deportiva. Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte, 4(16):233-242.

Partida de la Peña, J. A., Braña Varela, D., Jiménez Severiano, H., Ríos Rincón, F. G., y Buendía Rodríguez, G. 2013. Producción de carne ovina. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), pp. 4-31.

Paszkowski, T., y Clarke, R. N. 1999. The Graafian follicle is a site of L-ascorbate accumulation. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 16(1):41-45.

Patnaik, B. K. 1968. Change in the bound ascorbic acid content of muscle and liver of rat in relation to age. Nature, 218(5139), 393.

Paul, P. K., y Duttagupta, P. N. 1977. Beneficial or harmful effects of a large dose of vitamin C on the reproductive organs of the male rat depending upon the level of food intake. Indian Journal of Experimental Biology, 16(1):18-21.

Perl-Treves, R., y Perl, A. 2002. Oxidative stress: an introduction. Oxidative stress in plants, pp. 1-32.

Petroff, B. K., Ciereszko, R. E., Dabrowski, K., Ottobre, A. C., Pope, W. F., y Ottobre, J. S. 1998. Depletion of vitamin C from pig corpora lutea by prostaglandin $F_{2\alpha}$-induced secretion of the vitamin. Journal of Reproduction and Fertility, 112(2): 243-247.

Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., y Pour, M. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. Acta Physiologica, 198(1):15-35.

Prockop, D. J., Berg, R. A., Kivirikko, K. I., y Uitto, J. 1976. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In Biochemistry of Collagen. Springer US, pp. 163-273.

Quintans, G. 2000. Sincronización de celos. In: INIA Treinta y Tres. Jornada anual de producción animal: resultados experimentales. Treinta y Tres: INIA. p. 65-67.

Quirk, M. F., y Norton, B. W. 1987. The relationship between the cobalt nutrition of ewes and the vitamin B_{12} status of ewes and their lambs. Australian Journal of Agricultural Research, 38(6):1071-82.

Ramachandran, G. N., y Ramakrishnan, C. 1976. Molecular structure. In Biochemistry of collagen. Springer US, pp. 45-84.

Ranjan, R., Ranjan, A., Dhaliwal, G. S., y Patra, R. C. 2012. L-Ascorbic acid (vitamin C) supplementation to optimize health and reproduction in cattle. Veterinary Quarterly, 32(3-4):145-150.

Ranjan, R., Swarup, D., y Naresh, R. A. M. 2005. Ameliorative potential of L-ascorbic acid in bovine clinical mastitis. The Indian Journal of Animal Sciences, 75(2).

Rasby, R. J. y Funston, R. N. 2010. Synchronizing Estrus in Beef Cattle. Institute of Agriculture and Natural Resources and University of Nebraska-Lincoln Extension. EC283.

Razz, R., y Clavero, T. 2004. Niveles de urea, fósforo, glucosa e insulina de vacas en ordeño suplementadas con concentrado en un sistema de *Panicum maximum* y *Leucaena leucocephala*. Revista Científica, 1(1).

Reynolds, L. P., Grazul-Bilska, A. T., y Redmer, D. A. 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. Endocrine, 12(1):1-9.

Richards, J. S. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. Physiological Reviews, 60(1):51-89.

Rippe, C. A. 2009. El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, MN. pp. 111-116.

Rubianes, E., Menchaca, A., y Carbajal, B. 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2α. Animal Reproduction Science, 78(1-2):47-55.

SAGARPA 2014. Programa nacional pecuario. (2007-2012). Disponible en http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecuario/Attachments/1/PNP260907.pdf. 24-junio-2017.

Sahinduran, S.,y Albay, M. K. 2004. Supplemental ascorbic acid and prevention of neonatal calf diarrhoea. Acta Veterinaria Brno, 73(2):221-224.

Saikhun, K., Faisaikarm, T., Ming, Z., Lu, K. H., y Kitiyanant, Y. 2008. α-Tocopherol and l-ascorbic acid increase the in vitro development of IVM/IVF swamp buffalo (Bubalus bubalis) embryos. Animal, 2(10):1486-1490.

Salinas-Ríos, T., Sánchez-Torres-Esqueda, M. T., Díaz-Cruz, A., Cordero-Mora, J. L., León, M. C., Hernández-Bautista, J., y Nieto Aquino, R. 2016. Oxidative status and fertility of ewes supplemented coffee pulp during estrous synchronization and early pregnancy. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 29(4):255-263.

Santos, M. V., Lima, F. R., Rodrigues, P. H. M., Barros, S. B. M., y da Fonseca, L. L. 2001. Plasma Ascorbate concentrations are not correlated with milk somatic cell count and metabolic profile in lactating and dry cows1. Journal of Dairy Science, 84(1):134-139.

SAS (Statistical Analysis System) Institute SAS/STAT. 2002. Computer Software. Release 9.4. SAS Institute Inc. Cary.

Sato, T., Iesaka, T., Jyujo, T., Taya, K., Ishikawa, J., y Igarashi, M. 1974. Prostaglandin-induced ovarian ascorbic acid depletion. Endocrinology, 95(2): 417-420.

Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38(7):995-1014.

Schams, D., y Berisha, B. 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle–an overview. Reproduction in Domestic Animals, 39(4):241-251.

Senger, P. L. 1997. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions, Inc., 1615 NE. Eastgate Blvd, pp. 144-164.

Seré C., y Steinfeld H. 1996. 'World Livestock Production Systems: Current Status, Issues and Trends.' Animal Production and Health Paper No. 127. (FAO: Rome).

Shearer, J. K. 1992. Reproductive anatomy and physiology of dairy cattle. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.

Sheldrick, E. L., y Flint, A. P. F. 1989. Post-translational processing of oxytocin-neurophysin prohormone in the ovine corpus luteum: activity of peptidyl glycine α-amidating mono-oxygenase and concentrations of its cofactor, ascorbic acid. Journal of Endocrinology, 122(1):313-322.

Sheldrick, E. L., y Flint, A. P. F. 1989. Post-translational processing of oxytocin-neurophysin prohormone in the ovine corpus luteum: activity of peptidyl glycine α-amidating mono-oxygenase and concentrations of its cofactor, ascorbic acid. Journal of Endocrinology, 122(1):313-322.

SIAP. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2012). En http://www.siap.ob.mx/. 27-junio-2017.

Silva, B. D. M., Sartori, R., Silva, T. D. S., Cardozo, D. M. M., de Oliveira, M. A. L., y Neves, J. P. 2010. Estrus synchronization with prostaglandin F2α compared to progestogen treatment associated with equine chorionic gonadotropin (eCG) in Santa Inês breed ewes reared in Federal District, Brazil. Ciência Animal Brasileira, 11(2):417-424.

Simonetti, L., Blanco, M. R., y Gardón, J. C. 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. Small Ruminant Research, 38(3):243-247.

Sneer, A., Palade, M., Herscovici, B., Papp, E., y Constantin, E. 1968. Study of the urinary elimination of ascorbic acid and adrenal corticoids under the influence

of the administration of vitamin C in rats. Archives des Sciences Physiologiques, 22(4):547-552.

Sompol, P., Ittarat, W., Tangpong, J., Chen, Y., Doubinskaia, I., Batinic-Haberle, I. y Clair, D. S. 2008. A neuronal model of Alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress–mediated mitochondrial injury. Neuroscience, 153(1):120-130.

Sönmez, M., Türk, G., y Yüce, A. 2005. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. Theriogenology, 63(7):2063-2072.

Sosa, C., Abecia, J. A., Forcada, F., Vinoles, C., Tasende, C., Valares, J. A., y Meikle, A. 2006. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. Reproduction, Fertility and Development, 18(4):447-458.

Spellacy, W. N., y Goetz, F. C. 1963. Plasma insulin in normal late pregnancy. New England Journal of Medicine, 268(18):988-991.

Spencer, R. P., Purdy, S., Hoeldtke, R., Bow, T. M., y Markulis, M. A. 1963. Studies on intestinal absorption of L-ascorbic acid-1-C^{14}. Gastroenterology, 44(6): 768-773.

Thiéry, J. C., Chemineau, P., Hernández, X., Migaud, M., y Malpaux, B. 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. Domestic Animal Endocrinology, 23:87-100.

Tilly, J. L., y Tilly, K. I. 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. Endocrinology, 136(1):242-252.

Tsao, C. S., Xu, L. F. y Young, M. 1990. Effect of dietary ascorbic acid on heat-induced eye lens protein damage in guinea pigs. Ophthalmic Research, 22(2):106-110.

Ungerfeld, R. 2011. Combination of the ram effect with $PGF_{2\alpha}$ estrous synchronization treatments in ewes during the breeding season. Animal Reproduction Science, 124(1-2):65-68.

Ungerfeld, R., y Rubianes, E. 1999. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. Animal Science, 68(3):349-353.

Uttara, B. Singh, A.V. Zamboni, P. y Mahajan, R.T. 2009. Oxidative stress and neurodegenarative diseases: A review of Upstream and Downstream antioxidant terapeutic options. Current Neuropharmacology, 7:65-74.

Vega, M., Devoto, L., Castro, O., y Kohen, P. 1994. Progesterone synthesis by human luteal cells: modulation by estradiol. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 79(2):466-469.

Wagner, F., Hofmann, K. D., Preibsch, W., y Koob, G. 1970. Ascorbic acid content of the human ovary. Zentralblatt fur Gynakologie, 92(33):1060-1061.

Wallerstein, R. O., y Wallerstein, J. R. 1976. Scurvy. In Seminars in hematology, vol. 13, No. 3, pp. 211-218.

Wang, A. H., y Still, C. 2007. Old world meets modern: a case report of scurvy. Nutrition in Clinical Practice, 22(4):445-448.

Williams, L. M., y Helliwell, R. J. 1993. Melatonin and seasonality in the sheep. Animal Reproduction Science, 33(1):159-182.

Wiltbank, M. C., Salih, S. M., Atli, M. O., Luo, W., Bormann, C. L., Ottobre, J. S., y Sartori, R. 2012. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. Animal Reproduction, 9(3):242.

Wise, T. 1987. Biochemical Analysis of Bovine Follicular Fluid: Albumin, Total Protein, Lysosomal Enzymes, Ions, Steroids and Ascorbic Acid Content in Relation to Follicular Size, Rank, Atresia Classification and Day of Estrous Cycle 1. Journal of Animal Science, 64(4):1153-1169.

Wittwer, F., y Böhmwald, H. 1983. Manual de patología clínica veterinaria. Facultad deficiencias veterinarias. Universidad austral de chile. Valdivia. Chile, pp. 179-178.

Yassein, S. A., Mahmoud, K. G. M., Maghraby, N., y Ezzo, O. H. 2008. Hot climate effects and their amelioration on some productive and reproductive traits in rabbit does. In World Rabbit Science. World Rabbit Science, 16(3):2008-7.

Yokoyama, M. T. y Johnson, K. A. 1993. Microbiology of the Rumen and Intestine in the Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. D.C. Church, Edited by Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp. 125-144.