



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**«EFECTO MACHO» EN LA
DINÁMICA FOLICULAR DE
OVEJAS DE LANA
SUPEROVULADAS**

MANUEL DOMÍNGUEZ ISLAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

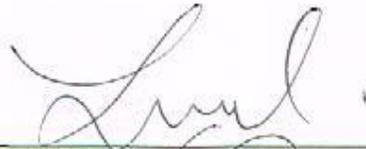
2012

La presente tesis titulada «Efecto macho» en la dinámica folicular de ovejas de lana superovuladas, realizada por el alumno Manuel Domínguez Islas, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

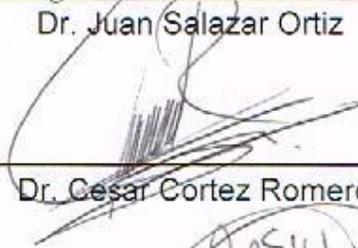
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Juan Salazar Ortiz

ASESOR



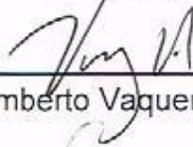
Dr. Cesar Cortez Romero

ASESOR



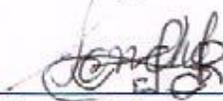
Dr. Jaime Gallegos Sánchez

ASESOR



Dr. Humberto Vaquera Huerta

ASESOR



M. C. Carlos Sánchez Del Real

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre del 2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darnos fuerza en los momentos en que más lo necesitamos y estar siempre con nosotros.

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

Al colegio de posgraduados, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, y por el financiamiento otorgado a través del fideicomiso (No. Registro CONACyT 238036/2010) y al Laboratorio de Ovinos y Caprinos (LaROCa).

A la línea prioritaria de investigación 5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal (LPI-5) por el financiamiento para la investigación.

Al Dr. Juan Salazar Ortiz, por la dirección de esta tesis, confianza y amistad.

Al Dr. César Cortez Romero, por su dedicación, valiosas observaciones, por el tiempo invertido para la realización, dirección y la redacción final de esta tesis y principalmente por su confianza, apoyo e invaluable amistad.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta, por su valioso apoyo y paciencia en el análisis de los datos. Por su amistad.

Al Dr. Jaime Gallegos Sánchez y al M.C. Carlos Sánchez del Real, por su tiempo, dedicación y valiosas observaciones para la redacción final de esta tesis.

Al M.C. Said Cadena Villegas, Dra. Alejandra Herrera Corredor y M.C. Jorge Alberto Ortiz Salazar, Dr. Carlos Guillermo Germán Alarcón por su amistad y apoyo incondicional en la fase experimental.

Al personal académico y administrativo del programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, a los alumnos y trabajadores de LaROCa (Marcial y Joaquín).

A las secretarías de la orientación en ganadería, Celsa, Lupita, Verito y Anita.

DEDICATORIA

A mis padres Manuel Domínguez Ramírez y Herlinda Islas Zambrano les dedico a ustedes este logro, por que sin su cariño, ayuda y comprensión esto no seria posible. Quiero darles las gracias por que si estoy en este lugar en este momento, es gracias al apoyo que me han brindado a lo largo de toda mi vida.

Quiero dedicar de forma muy pero muy especial a mi pequeñita Regina, ya que este logro es también tuyo, ya que tu también formas partes de las decisiones y actividades realizadas dentro de nuestro entorno familiar.

A “mony come galletas” por tu apoyo, tener fe en mí, estar siempre a mi lado y por aguantarme (sobre todo).

A mis hermanos Leylany, Yissel, Gustavo, Julio y Karen, son muchísimas las aventuras que hemos pasado tanto muy buenas, buenas y malas, pero todas ellas nos han permitido estar donde estamos, les dedico este logro a las 2, ya solo faltas tu werajjjjjjj.

A mi familia: quiero dedicar de forma especial a mi familia porque de una u otra forma han intervenido a la realización de este logro a mi abuelitos (Elías†, Gustavo, Isidra† y Matilde†) a mis tíos (Alicia, Carmen, Catalina, Dina, Elena, Gloria, José†, Leandro David, Lucia, Marcelino, María, Norberto, Raymundo, Roberto†, Rosa, Rosalío), a mis primos y a mis sobrinos.

A mis amigos: Ameriko, Carlos, Guille, Ismael, Karen, Lili, Luis A., Marco A., Mauricio, Ramón, Marco, Leo, Rossy, gracias por los momentos que compartimos juntos, por todos sus apoyos y consejos; sin ustedes no hubiera sido lo igual de agradable mi estancia en la vida.

A mis amigos y compañeros dentro de mi estancia en CP: Gamero, Liberia, Daniel, Procoro, Erika, Marlene, Balan, Mónica A.,

Gracias a ti, que formas parte de mí utopía, siempre estarás a mí lado para darme fuerza (M.S.V).

EL “EFECTO MACHO” EN LA DINÁMICA FOLICULAR DE OVEJAS DE LANA SUPEROVULADAS

Domínguez Islas Manuel, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2012

Se evaluó la incorporación del “efecto macho” a un protocolo de superovulación. Se utilizaron 20 ovejas de lana de la raza Suffolk, Hampshire y Dorset, de condición corporal (cc) 3.1 ± 0.4 , con edad promedio de 3.9 ± 0.8 años, durante época de transición de anestro a temporada reproductiva en los meses de junio-julio del 2011. Se asignaron 10 ovejas de manera aleatoria en dos lotes. Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento 1 (T1): se introdujo un CIDR (considerado día 0) a cada ovejas durante 9 días, 48 horas previas al retiro, se administro 500 μg de Cloprostenol, además de 300 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) y 250 UI de gonadotropinas hipofisarias de cerdo cada 12 horas (48, 36, 24, 12, 0 previas al retiro y 12 h después del retiro) administrando 75 y 50, 37.5 y 37.5, 25 y 25 UI FSH/LH respectivamente. El tratamiento 2 (T2): similar al T1, sin embargo a partir del día 7 y hasta el día 9, se introdujeron en forma alterna 2 carneros provistos de mandil al corral de las hembras durante 20 minutos en la mañana (6:40-7:00) y por la tarde (4:00 – 4:20). La dinámica folicular se registro diariamente a partir del día 6 (después de colocar el CIDR). El registro de folículos ≥ 5 mm diámetro, en la lectura 4 y 5, para T1, 5.0 ± 4.1 y 8.3 ± 3.17 ($p < 0.05$) fue mayor a las encontradas en T2, 2.8 ± 3.0 y 5.3 ± 2.94 . El celo se presentó primero en T1, 13.60 ± 1.7 horas ($p < 0.05$) diferente de T2 que mostró, 14.75 ± 2.07 horas postretiro de CIDR. Las ovejas presentaron en promedio 8.0 ± 4.3 cuerpos lúteos sin diferencia ($p > 0.05$). Por lo anterior se concluye que el “efecto macho” no aumentó el número folículos ≥ 5 mm de diámetro en dinámica folicular en protocolos de superovulación en ovejas de lana.

Palabras clave: Efecto macho, ovejas, anestro, gonadotropinas, folículo.

FOLLICULAR DYNAMICS IN SUPEROVULATED WOOL EWES INCORPORATING THE "MALE EFFECT"

Domínguez Islas Manuel, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2012

We evaluated the incorporation of the "male effect" to superovulation protocol. We used 20 ewes wool Suffolk, Hampshire and Dorset breeds, body score (bs) 3.1 ± 0.4 , mean age 3.9 ± 0.8 years old, during transition anestrus to breeding season in June-July 2011, 10 ewes were assigned randomly into two pens. The treatments were: Treatment 1 (T1): CIDR was introduced (considered day 0) to each sheep for 9 days, 48 hours prior to retirement, was given 2 mL of prostaglandin, plus 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 250 IU of swine pituitary gonadotropins administered as decreasing doses at 0, 12, 24, 36, 48, 60 hours prior to intravaginal device removal. Treatment 2 (T2): same as T1, but from day 7 until day 9, were introduced alternately 2 rams fitted with an apron to the pen of females for 20 minutes in the morning (6:40 - 7:00) and afternoon (4:00 - 4:20). Follicular dynamics was recorded daily began day 6 (after insert the CIDR). There were follicles ≥ 5 mm diameter, recording 4 and 5, for T1, 5.0 ± 4.1 and 8.3 ± 3.17 ($p < 0.05$) was higher than those found in T2, 2.8 ± 3.0 and 5.3 ± 2.94 . The estrus was presented first in T1, 13.60 ± 1.7 hours ($p < 0.05$) was different from T2, 14.75 ± 02.07 hours withdrawal CIDR. The ewes had on average 8.0 ± 4.3 corpus luteum no difference ($p > 0.05$). Therefore we conclude that the "male effect" does not increase the number of follicles ≥ 5 mm in diameter in follicular superovulation protocols in wool ewes.

Keywords: male effect, ewes, anestrus, gonadotropins, follicle.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. CRECIMIENTO FOLICULAR	2
2.1.1. <i>Crecimiento “lento”</i>	3
2.1.2. <i>Crecimiento “rápido”</i>	4
2.2. DESARROLLO FOLICULAR	4
2.3. CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LA GRANULOSA	6
2.4. CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LA TECA	6
2.5. CONTROL DE RECLUTAMIENTO, SELECCIÓN Y DOMINANCIA	7
2.5.1. <i>Reclutamiento</i>	7
2.5.2. <i>Selección</i>	8
2.5.3. <i>Dominancia</i>	9
2.5.4. <i>Ovulación (Ruptura folicular)</i>	11
2.5.5. <i>Formación del cuerpo lúteo</i>	12
2.5.6. <i>Regresión lútea</i>	13
2.6. CARACTERÍSTICAS DE LA DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN	14
2.7. ESTACIONALIDAD	18
2.7.1. <i>Balace de energía</i>	19
2.7.2. <i>Factores predictores de estacionalidad</i>	21
2.7.3. <i>Melatonina (Mel)</i>	26
2.8. EFECTO MACHO	28
2.8.1. <i>Feromonas</i>	31
2.8.2. <i>El órgano vomeronasal</i>	33
2.8.2.1. <i>Transducción sensorial de las señales de feromonas</i>	36
2.8.2.2. <i>Mapa de activación de receptores de feromonas en el cerebro de mamíferos</i>	36
2.8.2.3. <i>Detección de feromonas a nivel molecular</i>	37
2.9. TRACTOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA FEROMONA	39
2.10. SECRECIÓN DE GNRH	40

2.11. PERFIL DE SECRECIÓN DE FSH Y LH	41
2.12. EL COMPORTAMIENTO ESTRAL EN OVINOS	42
2.13. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (AI)	43
2.13.1. <i>Concentración espermática necesaria para uso de IA laparoscópica</i>	44
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1. LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	46
4.2. TIPO DE ANIMALES Y ALIMENTACIÓN	46
4.3. MANEJO DE LOS ANIMALES PREVIO AL PERIODO EXPERIMENTAL.....	46
4.3.1. <i>Manejo de las hembras</i>	46
4.3.2. <i>Manejo de los carneros</i>	47
4.4. TRATAMIENTOS.....	47
4.5. MANEJO DE LOS ANIMALES DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL.....	48
4.5.1. <i>Toma de datos para la dinámica folicular</i>	48
4.6. VARIABLES EVALUADAS.....	51
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1. DINÁMICA FOLICULAR (DF)	53
5.2. PORCENTAJE DE OVEJAS EN ESTRO	55
5.3. INICIO DEL CELO (IC).....	55
5.4. NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS (CL).....	56
VI. CONCLUSIÓN	59
VII. LITERATURA CITADA	60
ANEXOS	68
ANEXO 1. ANÁLISIS PROXIMAL DEL ALIMENTO COMERCIAL, BORREGA PLUS, ALIMENTOS UNIÓN TEPEXPAN.....	68

LISTA DE CUADROS

Página

CUADRO 1 .ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN OVEJAS EN DIFERENTES LATITUDES.....	24
CUADRO 2. COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE CINCO RAZAS EN EL ALTIPLANO MEXICANO.....	26
CUADRO 3. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ESTRAL EN LA OVEJA	43
CUADRO 4. COMPARACIÓN DE LECTURA 3 (L3) VS LECTURA 5 (L5) DENTRO DE CADA TRATAMIENTO.....	54
CUADRO 5. VARIABLES RESPUESTA DE LOS TRATAMIENTOS TESTIGO VS EFECTO MACHO	56

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CRECIMIENTO DE FOLÍCULOS ANTRALES DEL OVARIO	14
FIGURA 2. IMAGEN ECOGRÁFICA DE AMBOS OVARIOS DE UNA OVEJA SOMETIDA A UN TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN	15
FIGURA 3. BALANCE DE ENERGÍA RESPECTO A LAS PRIORIDADES DE VARIAS FUNCIONES FISIOLÓGICAS EN LOS MAMÍFEROS.	21
FIGURA 4 REPRESENTACIÓN DE LA SECCIÓN SAGITAL A TRAVÉS DE LA CAVIDAD NASAL EN OVINOS.....	35
FIGURA 5. ANATOMÍA Y ORGANIZACIÓN CELULAR DE LOS DOS EPITELIOS OLFATORIOS EN MAMÍFEROS	38
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS ESTRUCTURAS MÁS IMPORTANTES DE LOS TRACTOS OLFATORIOS PRINCIPALES (LÍNEAS CONTINUAS) Y ACCESORIOS (LÍNEAS DISCONTINUAS).....	39
FIGURA 7. EXAMINACIÓN TRANSRECTAL DEL TRACTO REPRODUCTIVO CON LA OVEJA EN PIE.....	49
FIGURA. 8. ESQUEMA DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE EL EXPERIMENTO	50
FIGURA 9. POBLACIÓN FOLICULAR EL DURANTE TRATAMIENTO A BASE DE GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS (FSH/LH), CON Y SIN "EFECTO MACHO"	53
FIGURA 10. CURVA DE SUPERVIVENCIA DE PROBABILIDAD ACUMULADA DE INICIO DE CELO DESPUÉS DEL RETIRO DE CIDR POR RAZA (H: HAMPSHIRE, D: DORSET, S: SUFFOLK).....	55

I. INTRODUCCIÓN

El inventario nacional ovino para el 2010 se estimó en 8,105,562 cabezas, concentrándose la producción en la zona centro (lugar de mayor consumo en el país), los estados con mayor inventario ganadero se en cuentan México, Hidalgo, Veracruz y Oaxaca, mostrando una tasa de crecimiento anual promedio de 1%; a nivel nacional se producen 56,546 toneladas en canal para el 2011, sin embargo, este ritmo de crecimiento no es suficiente para satisfacer el consumo nacional, ya que solo se alcanza a cubrir el 45% del consumo nacional aparente en el territorio nacional. (SIAP-SAGARPA, 2011).

Los procesos reproductivos son consecuencia de la interacción de mecanismos de regulación neuroendocrina endógena y factores ambientales. El fotoperíodo, nutrición, factores socio-sexuales, genética y sus interacciones afectan directamente las actividades reproductivas a nivel cerebral; la intervención de cada uno de estos factores, promoverán cambios en la eficiencia reproductiva. En el escenario actual de aumento del precios de insumos, es necesario buscar alternativas para aumentar la rentabilidad y la competitividad de la ganadería (Viñoles *et al.*, 2009). En pequeños rumiantes, las técnicas de superovulación y transferencia de embriones constituyen en la actualidad, una herramienta para difundir razas al ser integrados a programas de mejora genética destinados a aumentar la producción ganadera. Se fundamenta en el incremento del número de ovulaciones y de embriones viables por hembra seleccionada y ciclo mediante tratamientos hormonales. Sin embargo, y a pesar de las mejoras alcanzadas en los últimos años en cuanto a eficacia de protocolos utilizados, los rendimientos de estas técnicas se encuentran afectados por una alta variabilidad entre animales dentro del mismo grupo; la cual ha sido relacionada con la influencia de factores intraováricos; concretamente, población folicular y relaciones entre los folículos presentes en el ovario en el inicio del tratamiento (González-Bulnes *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, el objetivo planteado fue probar que al incorporar el “efecto macho” en protocolos de superovulación en ovejas de lana, incrementa la tasa de ovulación, el numero de cuerpos lúteos y el porcentaje de ovejas en estro.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Crecimiento folicular

La oveja es un rumiante estacional poliestrica con patrones de reproducción dominados por dos ciclos distintos (Viñoles, 2003). El primero es de 16 a 17 días del ciclo estral (Chemineau *et al.*, 1992; Bister *et al.*, 1999), si no se lleva a cabo una gestación y el segundo es un ciclo anual de actividad ovárica la cual está determinado por el fotoperiodo (Thimonier y Mauléon, 1969; Chemineau *et al.*, 1992). El ciclo estral es una secuencia de eventos endocrinos reguladas por el hipotálamo (y su secreción de la hormona liberadora de gonadotropina, GnRH), la glándula pituitaria (con la secreción de la hormona luteinizante, LH y hormona folículo-estimulante FSH), el folículo (que secreta esteroides e inhibina), el cuerpo lúteo (CL), que produce progesterona, oxitocina y prostaglandina F2 α y el útero (que es el responsable de la producción de prostaglandina F2 α), con cada evento en la secuencia de inicio de los cambios hormonales posteriores (Viñoles, 2003; Goodman e Inskeep, 2006). Analizando las interacciones fisiológicas, existen dos factores que son de suprema importancia; primero es la acción en particular de hormonas que son importantes en el control del ciclo ovárico, deben ser evidentes a concentraciones fisiológicas y segundo, son los cambios circulantes de las mismas, que ocurren en una secuencia específica en tiempos muy predecibles durante el ciclo estral (Goodman e Inskeep, 2006).

En ovinos, la formación de folículos primordiales comienza en la línea ovígera cerca de la interfase en la corteza y la medula del ovario fetal, alrededor de los 75 días de gestación, un tiempo en que el número máximo de células germinales se encuentran dentro del ovario. Inicialmente cada folículo primordial consiste en un ovocito rodeado por una simple capa de células granulosas escamosas, aunque en algunos casos, una o muchas de esas células son cuboides (Goodman e Inskeep, 2006).

El número de células de la granulosa por folículo primordial es altamente variable, pero se correlaciona con el diámetro del ovocito. Más del 75% de las células germinales se pierden alrededor del día 90 de gestación probablemente por apoptosis. Los ovarios de una oveja joven contienen de 40,000 a 300,000 folículos primordiales. En la oveja joven son altos al nacimiento y disminuyen e incrementan en varios tiempos en periodo prepúber sin un patrón claro de oleadas foliculares. En varios periodos de 10 días de observación hubo en promedio 2.4 picos de concentraciones de FSH, pero solo hay en promedio 0.8 folículos que crecen hasta 5 mm (Goodman e Inskeep, 2006). La duración de la foliculogénesis, desde el folículo primordial hasta la ovulación es notablemente consistente entre ovejas y vacas en aproximadamente 4-6 meses (Driancourt, 1991; Hunter *et al.*, 2004) y 180 días (Cahill y Mauleón, 1980; Souza *et al.*, 1997; Viñoles, 2003). El desarrollo folicular es muy complejo e implica la integración de señales de múltiples sistemas de órganos. Mientras que la foliculogénesis temprana parece estar influenciada directamente por las señales dentro del ovario; las hormonas endocrinas provenientes de la pituitaria son necesarias para su desarrollo, para continuar más allá de estos estadios tempranos. A su vez, el ovario produce un número de retroalimentaciones y retroacciones de hormonas que regulan la fisiología de la pituitaria. El desarrollo folicular está dividido en dos etapas en función de su crecimiento, las cuales se dividen en fase de crecimiento “lento” y fase de crecimiento “rápido”

2.1.1. Crecimiento “lento”

Esta fase se agrupan los folículos primordiales de 0.03 mm hasta 0.2 mm, los cuales no son dependientes de gonadotropinas (Souza *et al.*, 1997; Viñoles, 2003, Hunter *et al.*, 2004) esta etapa dura 130 días antes de desarrollarse el antro, el cual inicia su desarrollo cuando la granulosa está formada por alrededor de 5,000 células, en este periodo existe cambios en el ovocito, con la ampliación y el desarrollo de la zona pelucida, el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II (IGF-II) esta probablemente involucrado en la diferenciación de células de estroma.

Los receptores de FSH pueden ser identificados en las células de la granulosa durante esta etapa, y células de la teca expresan receptores para LH. Para que los folículos alcancen el diámetro de 0.2 a 0.7 mm, lo que lleva 30 días para esta etapa, existe ligera producción de estradiol cuando el folículo alcanza 0.5 mm (Viñoles, 2003; Mihm y Bleach, 2004), la formación del antro inicia cuando la granulosa tiene alrededor de 5,000 células, alcanzando el diámetro folicular de 0.85 mm e incrementa lentamente el tamaño del antro hasta finalmente alcanzar 93% del folículo preovulatorio en esta fase se cuenta con 3,300,000 células en la granulosa (Cahill y Mauléon, 1980).

2.1.2. Crecimiento “rápido”

Esta etapa es considerada de crecimiento rápido, ya que el folículo pasa de 0.8 mm a 2.5 mm en solo 5 días, el porcentaje máximo de proliferación de células de la granulosa se alcanza cuando el folículo tiene diámetro de 0.85 mm, la aromatasa incrementa su actividad celular (Mihm y Bleach, 2004) paralelo a la sensibilidad de las células de la granulosa a FSH, el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) estimula la proliferación de la granulosa y tiene efecto sinérgico con FSH en la diferenciación de la granulosa (Viñoles, 2003), no se ha encontrado diferencia estadística entre ciclo, raza o estación reproductiva en sobre el diámetro del ovocito en relación con el tamaño folicular durante la etapa de desarrollo del antro, la proporción del folículo ocupado por el antro o el número de células en granulosa (Cahill y Mauléon, 1980).

2.2. Desarrollo folicular

Los folículos dependientes de gonadotropinas tienen diámetro de 2-3 mm, los cuales tienen solo dos alternativas: que se degraden a través del proceso llamado “atresia” o que ovulen, cuando alcanzan este diámetro es posible observarse con ayuda de ecografía y son capaces de inferir cambios en los

estados fisiológicos y endocrinos (Driancourt *et al.*, 1991; Viñoles, 2003,); ya que las gonadotropinas probablemente no están involucradas en el inicio del crecimiento folicular; por otra parte, en las primeras etapas del desarrollo folicular, las gonadotropinas no parecen ser una función sobre el desarrollo folicular, sin embargo, el crecimiento folicular en etapas posteriores es claramente dependiente de gonadotropinas provenientes de hipófisis: LH y FSH. Estas hormonas proporcionan los principales mecanismos de control folicular: reclutamiento, selección y dominancia a través de inhibición de retroalimentación negativa unidos con la unidad hipotálamo-hipófisis (Hunter *et al.*, 2004)

Conceptos que describen los cambios dinámicos que suceden durante el crecimiento y la regresión; 1) en el reclutamiento los folículos son extremadamente dependientes de gonadotropinas, usualmente se reclutan de 2 a 5 folículos; 2) en la selección el número excesivo de folículos reclutados son destinados a la atresia con el fin de alcanzar el número de ovulaciones típico de cada especie/raza; y 3) el folículo sobreviviente después de la selección es usualmente llamado dominante (Driancourt, 1991).

La ecografía de las observaciones en ovarios de ovinos muestra que durante el ciclo estral como la fase lútea, antes de la pubertad o durante el anestro, muestran que existe crecimiento folicular en “oleadas”. Además, cada vez que un folículo dominante está presente, puede ser ovulado a través de una inyección de hCG lo que indica que se han diferenciado los receptores de LH en las células de la granulosa (Driancourt, 1991).

Conforme avanza la fase folicular disminuye progresivamente la actividad mitótica de las células de la granulosa y la teca a diferenciación celular, el crecimiento folicular se logra a través de la acumulación de líquido antral. Algunos de estos reguladores locales implicados son IGF1, factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y dos importantes proteínas, inhibina y activina, producidas por las células de la granulosa. Por el contrario, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) es producida por las células de la teca, mientras que el factor transformador de crecimiento beta (TGF- β) es producido por las células de la teca y la granulosa.

En cultivos de folículos de ovejas a corto plazo se ha observado en la granulosa que la FSH es capaz de aumentar la incorporación de 3H timidina al ADN de las células de la granulosa, aunque su efecto dura poco tiempo. Sin embargo, en cultivos a largo plazo de las células de la granulosa son claros los efectos de estimulantes de IGF1 y de EGF en la incorporación de 3H timidina y/o la división celular (Driancourt, 1991). Los factores anteriores además desempeñan una función reproductiva (antes y después de la pubertad, la preñez, postparto) y en el estado nutricional (Mihm y Bleach, 2004).

2.3. Control de la diferenciación celular de la granulosa

La aromatización solo se llevará a cabo cuando los receptores de LH son escasos. La FSH es la principal hormona que controla el crecimiento folicular en ganado bovino, ovino y porcino a través de la inducción de la aromatización y estimula la actividad de la aromatasa *in vivo*. Sin embargo, se ha encontrado que existen un número de factores de crecimiento/proteínas que modulan la acción de FSH en el proceso de aromatización. IGF1, TGF β y activina potencializan la acción de FSH; mientras que inhibina y la folistatina son inhibidores, EGF y IGF unen proteínas que estimulan la aromatización inducida por FSH (Driancourt, 1991). El aumento de FSH en el momento de la regresión del cuerpo lúteo en ovejas y vacas estimula el desarrollo de una serie de folículos antrales que comienzan a adquirir una serie de propiedades clave como el aumento de citocromo P450 de la cadena lateral de división y la actividad del citocromo P450 aromatasa (Hunter *et al.*, 2004)

2.4. Control de la diferenciación celular de la teca

Las células de la teca secretan andrógenos, principalmente androstenediona, al ser estimulados por LH y no FSH. Las acciones de LH en las células de la teca son moduladas por factores de crecimiento y proteínas; al igual

que las células de la granulosa IGF1 incrementa mientras que EGF disminuye, LH estimula la producción de andrógenos (androstenediona). La inhibina y activina tienen actividades opuestas, mientras que inhibina estimula la producción de LH y por lo tanto de androstenediona, activina suprime la respuesta a LH (Driancourt, 1991).

2.5. Control de reclutamiento, selección y dominancia

Las gonadotropinas son esenciales en el control del reclutamiento, selección y dominancia, ya que cuando existe ausencia (ya sea por hipofisectomía inmunización contra GnRH), no se realiza reclutamiento. Por lo anterior, el reclutamiento, selección y dominancia pueden ser inducidos cuando se aplican gonadotropinas exógenas siempre que exista ausencia de las mismas en el animal. En el fluido folicular existen componentes que modulan la acción hormonal, dichos componentes interactúan sobre el mismo folículo (regulación autocrina) o sobre otros folículos (regulación paracrina) (Driancourt, 1991).

2.5.1. Reclutamiento

En ovejas el desarrollo folicular es bloqueado por ausencia de gonadotropinas, la FSH es capaz de inducir el reclutamiento (Soboleva *et al.*, 2000), mientras que niveles basales de LH también son requeridos dentro de esta fase, aunque no en forma pulsátil. El reclutamiento ocurre durante las fases folicular y lútea temprana. No todos los folículos reclutados son iguales, el más pequeño es abundante en EGF, por lo que es más sensible a efectos inhibitorios de EGF durante la diferenciación celular. Por lo anterior, el efecto estimulante de FSH en la diferenciación folicular (aromatasa) es más marcado en el folículo más grande y débil en los folículos más pequeños en la oleada folicular durante el reclutamiento. La estimulación de foliculogénesis comienza cuando los folículos alcanzan 2 mm en ovejas y 4 mm en bovinos (Driancourt, 1991).

2.5.2. Selección

Durante la selección pueden interferir folículos mayores (durante la oleada) sobre la capacidad de los más pequeños y de esta forma los folículos más pequeños recibirán menos suministro de gonadotropinas. Esto se puede llevar cabo mediante dos vías. En el caso de “vía pasiva” el folículo dominante maduro indirectamente inhibe el crecimiento de los folículos menos maduros mediante la reducción de las concentraciones de FSH por debajo del umbral necesario para mantener otros folículos. En la “vía activa” el folículo dominante inhibe de forma directa el crecimiento de los menos maduros mediante la secreción vía sangre que reduce la sensibilidad a FSH (Driancourt, 1991).

El estradiol e inhibina presentes en líquido folicular, interactúan para controlar la secreción de FSH. Se ha encontrado que los folículos de mayor tamaño producen mayores cantidades de dichas hormonas, actuando a través de retroalimentación negativa para suprimir las concentraciones de FSH por debajo del umbral necesario para la supervivencia de folículos reclutados, lo que resulta en la selección del folículo ovulatorio, ya que si se aplica un apoyo limitado de gonadotropina durante la mitad de la fase folicular eleva la tasa de ovulación en la mayoría de las razas ovinas (Driancourt, 1991).

Cuando se cauterizan folículos grandes durante fase lútea o folicular no mejora el tratamiento de superovulación. Al realizar cultivos *in vitro* de folículos grandes junto con pequeños, no disminuye la incorporación de 3H timidina sobre los folículos pequeños o la producción de estradiol por los folículos de tamaño medio. En el caso de bovinos se ha observado que la presencia de un folículo grande disminuye la respuesta superovulatoria de PMSG o pFSH (Hunter et al., 2004).

2.5.3. Dominancia

El efecto de dominancia en el ovino esta marcado por un aumento significativo en diferencia de tamaño entre el folículo ovulatorio y el resto, los cuales comienzan a disminuir su tamaño al entrar en atresia. Sin embargo, el efecto de dominancia por parte del folículo preovulatorio es también diferente del observado en vacuno, ya que no estaría determinado por una anulación sino por un descenso en el reclutamiento de folículos gonadotropo-receptivos y por una disminución de su crecimiento hasta categorías superiores (González-Bulnes *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios para conocer la forma en que el folículo dominante sigue madurando en presencia de concentraciones de FSH insuficientes para madurar a los folículos menos maduros, se han encontrado dos características: una entrega preferencial y un aumento en la sensibilidad de este folículo a las gonadotropinas. No se ha observado un incremento de flujo sanguíneo, sin embargo se han encontrado cambios en la permeabilidad vascular, que se ha asociado con la maduración que podría causar una acumulación selectiva de las gonadotropinas en el líquido folicular del folículo dominante, por lo que es más sensible que los folículos subordinados (González-Bulnes *et al.*, 2002).

Los folículos dominantes tienen altas producciones de estradiol (E_2) y aunado a FSH estimula la producción de IGF1, que a su vez, estimula la aromatización y aumentan aún más los niveles de estradiol, así como los receptores a LH y de esta forma desempeña un papel clave en el mantenimiento de dominación (Driancourt, 1991). El mecanismo para producir dominancia folicular esta relacionado con la dependencia a FSH que muestran los folículos antrales para crecer. Los folículos de tamaño preovulatorio secretan altos niveles de inhibina y estradiol, con lo que disminuyen los niveles de FSH y causan la atresia de los folículos menores (González-Bulnes *et al.*, 2002).

Los folículos preovulatorios (FP) evitan su propia entrada en atresia cambiando sus necesidades de FSH hacia LH; en respuesta, crecen y maduran hasta el estadio ovulatorio. Sin embargo, durante la fase luteal, la frecuencia de pulsación de LH permanece baja debido al efecto inhibitor de progesterona y los FP no tienen oportunidad de establecer su dominancia. En fase folicular, la desaparición del cuerpo lúteo provoca el descenso de los niveles de progesterona y el aumento de los niveles de LH; es el momento en que la dominancia puede ser establecida (González-Bulnes *et al.*, 2002). Otra de las características del folículo dominante que podría contribuir a la dominación es la presencia de receptores a LH en las células de la granulosa. Dado que tanto FSH como LH tienen acción sobre adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el desarrollo de receptores a LH en esta etapa del ciclo donde la secreción de LH es alta, podría ayudar a mantener los altos niveles intracelulares de AMPc, ya que compensa la disminución de los estímulos del AMPc como consecuencia de la disminución en las concentraciones de FSH (Driancourt, 1991). Los tratamientos con PMSG sola o combinada con FSH son comúnmente usadas para superovular, Las gonadotropinas exógenas actúan reclutando folículos pequeños, protegiendo los reclutados de atresia, aunque no rescata atresicos. En razas prolíficas como Booroola, Finn y Romanov, las células de la granulosa solo contienen alrededor de 30% de la cantidad normal de hormonas; por lo anterior, los folículos (F) solo producen alrededor de 30% de E₂ y 50% de inhibina, en comparación con razas no prolíficas; pFSH no es tan activa como PMSG en estimular la división celular, puesto que pFSH estimula los F que tienen alrededor del 50% de células de granulosa y el complemento de la estimulación folicular es realizada por PMSG. La PMSG imita los cambios ocasionados por pFSH sobre el número de células de la granulosa en ovejas. Al realizar incubación de F intactos por una hora *in vitro*, se observa que la producción de E₂ y testosterona, es más activa cuando se emplea PMSG que FSH. Hasta hace recientes años se creía que las gonadotropinas eran los únicos factores que controlaban la función ovárica, sin embargo de igual forma intervienen factores de crecimiento, proteínas ováricas y componentes inmunomoduladores (Driancourt, 1991).

2.5.4. Ovulación (Ruptura folicular)

Antes de la ovulación debe ocurrir la transformación del folículo dependiente de gonadotropinas capaz de ovular, requiere una baja concentración de FSH. Los folículos ovulatorios poseen en células de granulosa un mayor número de receptores a LH y FSH. El aumento en el tamaño del folículo se debe al incremento en número de células de granulosa y de líquido folicular en antro. La actividad de la aromatasa es máxima razón por la cual se produce gran cantidad de estradiol (Viñoles, 2003).

Un efecto inicial del pico de LH ocasiona un incremento del AMPc por 4 a 12 horas que bloquean la aromatasa y por consiguiente, la síntesis de estradiol-17 β vía testosterona; el resultado del incremento en progesterona (P₄) en tejido folicular es el incremento en la producción de prostaglandinas. A nivel de membrana del folículo ovulatorio, concentraciones de PGE₂ y PGF₂ α incrementan durante 8 horas, manteniéndose elevadas por 12 horas, y PGE₂ pero no PGF₂ α , disminuye de 16 a 20 horas, la presencia de LH o FSH incrementan la producción de PGE₂ en las células de la granulosa y ambas prostaglandinas en la teca, se realiza la conversión de PGE₂ a PGF₂ α , se lleva a cabo a través de la enzima 9-keto- PGE₂-reductasa. Por lo anterior, el incremento de la secreción de ambas hormonas son necesarias para la ruptura folicular (Goodman e Inskeep, 2006).

Se ha encontrado que se requiere del factor de necrosis tumoral- α (Necrosis Factor-TNF- α) para ocasionar colágenolisis en el folículo preovulatorio. Este factor se libera por células apicales del endotelio de la teca al aproximarse la ovulación, LH estimula la liberación del activador plasminogeno tipo uroquinasa (urokinase-type plasminogen activator-uPA) del epitelio de la superficie del ovario, el cual estimula la conversión de plasminogeno intersticial a plasmina, que activa colagenasas latentes en la membrana del ápice folicular y libera TNF- α de la teca del endotelio (Goodman e Inskeep, 2006).

El colesterol es precursor de los progestágenos: pregnenolona y progesterona ambos son precursores de la síntesis de androstenediona en las células internas de la teca. Posteriormente el andrógeno (androstenediona) luego de atravesar la membrana basal del folículo se dirige a las células de la granulosa donde es metabolizado hasta transformarse a estradiol 17- β . (Fortune y Quirk, 1988). La GnRH proveniente del hipotálamo estimula la secreción de LH en pituitaria anterior, que produce la ovulación de un folículo grande y estimula la luteinización de los restos foliculares (Viñoles, 2003). El diámetro de folículos preovulatorios en ovinos es de 6-8 mm (Bister *et al.*, 1999), 5-7 mm (Viñoles, 2003; Hunter *et al.*, 2004), 5mm (Goodman e Inskeep, 2006).

2.5.5. Formación del cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria formada por un muro de células de folículos de Graff antes de liberar el huevo; el muro de folículos después de la ovulación viene precedido de pérdida y la vascularización de la membrana granulosa, ocurre simultáneamente la degeneración de la lamina basal bajo la influencia de un complejo de mecanismos morfológicos involucrados y cambios bioquímicos. Es una glándula endocrina dinámica que muestra variaciones en tamaño, estructura y actividades esteroideogénicas en diferentes estados del ciclo estral y preñez. El diámetro máximo se presenta en los días 6-9 después de la ovulación y la regresión inicia entre los días 13 y 16 del ciclo estral en la oveja (Fields y Fields, 1996).

La formación del cuerpo lúteo es la continuación del proceso de maduración folicular, incluye la hipertrofia, hiperplasia y migración; esta formada por células de granulosa y teca interna junto con células endoteliales, pericitos, células del musculo liso, fibrocitos, macrófagos, leucocitos y en ocasiones células del plasma, con gran variación en número, ultraestructura química y función durante el desarrollo, diferenciación y regresión del CL (Sangha *et al.*, 2002).

2.5.6. Regresión lútea

La luteolisis es definida como la muerte estructural del cuerpo lúteo, marca el comienzo de la fase folicular; la disminución de niveles de progesterona conduce al aumento en la frecuencia de pulsos de LH y la estimulación de la secreción de estradiol del folículo ovulatorio para obtener tanto celo como el pico de LH (Baird y Scaramuzzi, 1976; Karsch *et al.*, 1980). El pico de LH, a su vez, pone fin a la secreción de E_2 mediante la inducción de la ovulación y la luteinización de manera que el próximo ciclo puede comenzar. Los productos secretados por el CL y el folículo ovulatorio desencadenan eventos que conducen a la destrucción de cada estructura (Viñoles, 2003).

Durante la lúteolisis se pierde la capacidad de sintetizar y secretar progesterona seguido por la pérdida de las células que componen el cuerpo lúteo. En rumiantes la lúteolisis es dependiente de la presencia prostaglandina $F_2\alpha$ del útero, la cual es secretada en útero e inhibe la secreción de P_4 y lo hace en dosis que no induce lúteolisis estructural. (Goodman e Inskeep, 2006) La $PGF_2\alpha$ actúa de la manera siguiente:

Primero: $PGF_2\alpha$, estimula la secreción de oxitocina dentro de 2 a 5 minutos después de una inyección intramuscular (i.m.)

Segundo: es un rápido decremento del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo (detectado a 4 horas).

Tercero: disminuye la secreción de progesterona (detectado tempranamente a 1-2 horas y usualmente a las 4 horas) debido a la activación de la Proteína quinasa C (PKC) vía segundo mensajero.

Cuarto: $PGF_2\alpha$ induce incremento del calcio intracelular que parece causar muerte celular por vía mecanismo apoptosis y lúteolisis estructural.

Quinto: se encuentra envuelto la estimulación de la producción lútea de factores vaso activos, prostaglandinas, endotelinas, angiotensina II y óxido nítrico, los cuales son intermediarios o colaboradores en la cascada luteolítica.

2.6. Características de la dinámica folicular durante el tratamiento de superovulación

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio (Fig. 1) La aplicación de la ecografía durante el tratamiento de superovulación permite conocer las variaciones que se producen en la población folicular por influencia de las gonadotropinas exógenas (Fig. 2). En los estudios realizados en ganado ovino, la administración de FSH en los protocolos habituales, con inyecciones cada 12 horas, comienza a actuar sobre la población folicular presente en el ovario de la oveja entre 12 y 24 horas del inicio del tratamiento. A partir de ese momento, y hasta las 48 horas, se observa un marcado crecimiento de los folículos desde los 2 mm de diámetro hasta los 5 mm. Los folículos en crecimiento alcanzaran el tamaño preovulatorio entre las 36 y 60 horas, pero especialmente entre las 48 y 60 horas (González-Bulnes *et al.*, 1995).

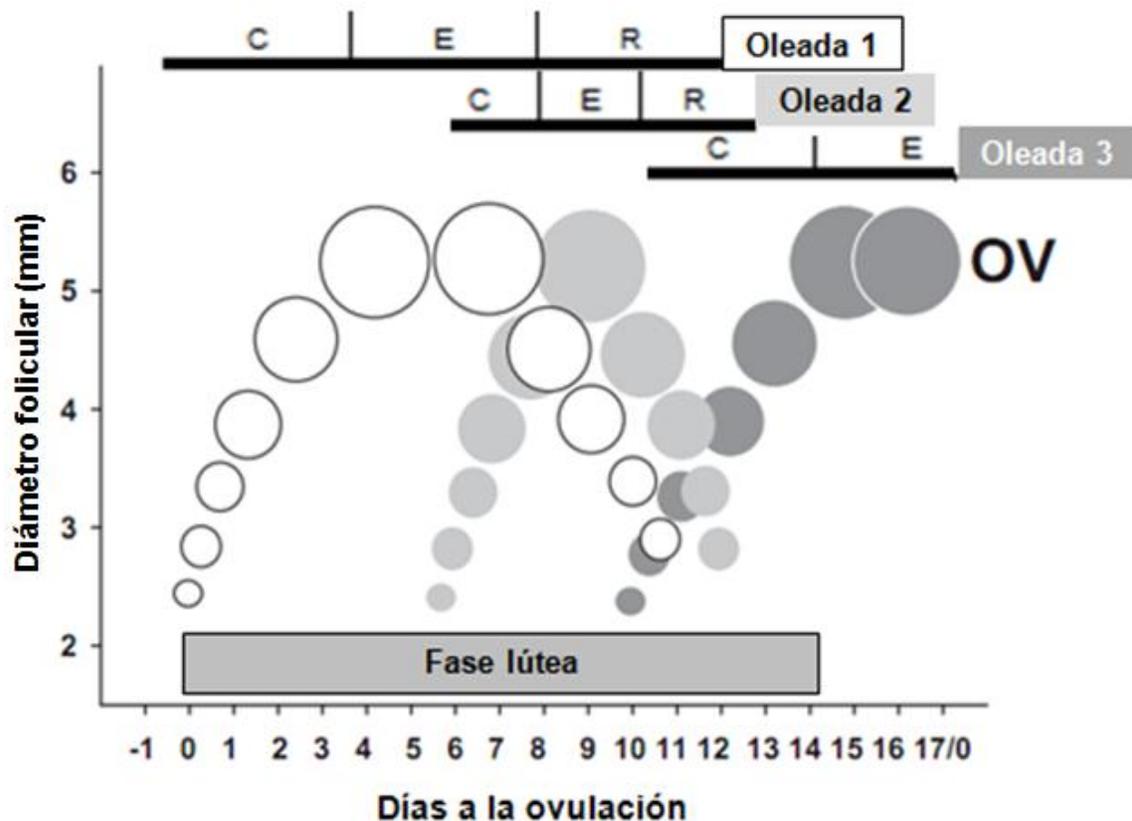


Figura 1. Ilustración esquemática del crecimiento de folículos antrales del ovario (Modificado de Bartlewski *et al.*, 2011)

Los folículos emergen de 2-3 mm de diámetro durante el ciclo estral en la oveja. Los folículos más largos crecen aproximadamente al diámetro preovulatorio de ≥ 5 mm antes de la regresión o la emergencia de la ovulación en sucesión ordenada durante el intervalo interovulatorio de 17 días, en las cuales ocurren de 3 a 4 oleadas foliculares. OV=ovulación. Duración aproximada de las fases de crecimiento (C), estático (E) y regresión (R) de la vida de los folículos durante las oleadas (Bartlewski *et al.*, 2011).

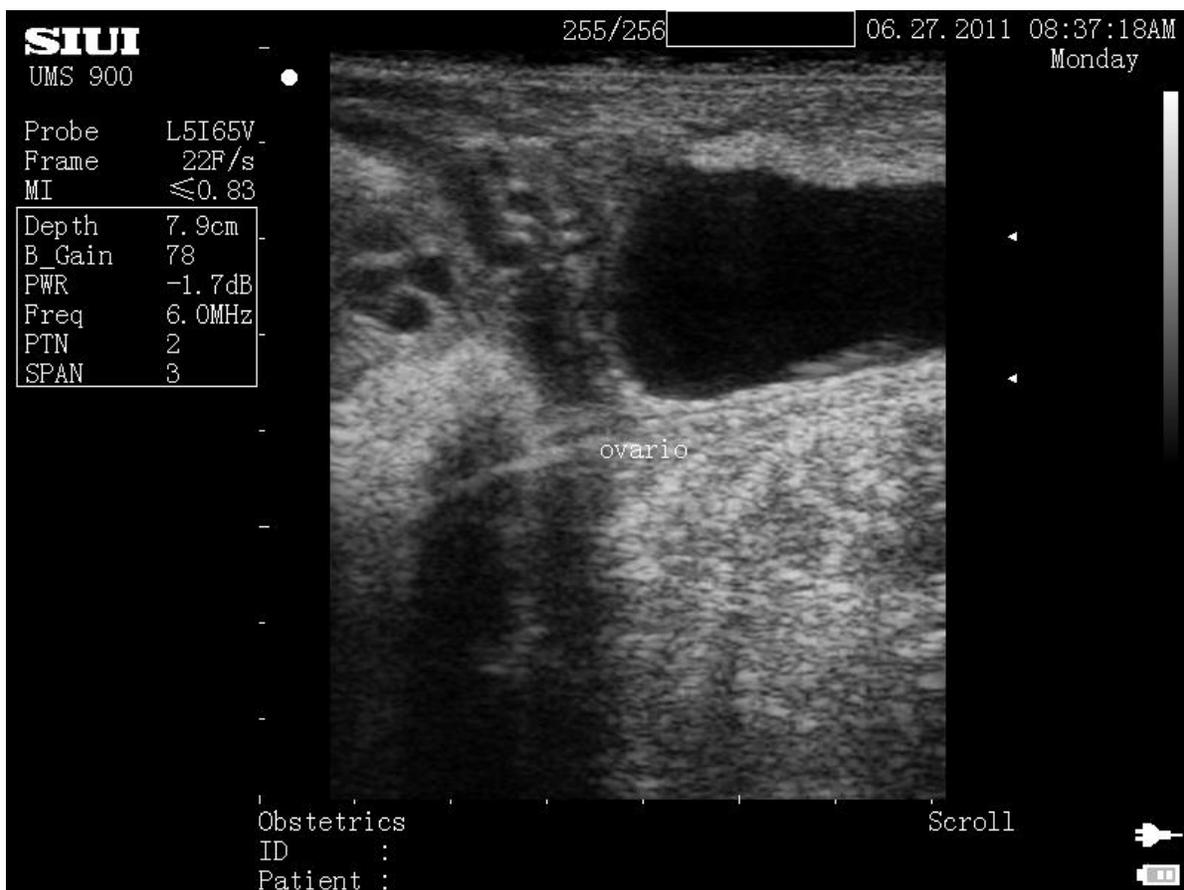


Figura 2. Imagen ecográfica de ambos ovarios de una oveja sometida a un tratamiento de superovulación

Se ha encontrado que en las razas Texel, Ile de France y Suffolk durante la época reproductiva el desarrollo folicular se caracteriza por la presencia de ondas foliculares, ocurriendo en tres ocasiones durante el ciclo estral, dos ondas durante la fase lútea (ondas I y II) y una onda (Onda III) durante la fase folicular; cada oleada folicular tiene una duración de aproximadamente 6 días (Noel *et al.*, 1993). Todos los folículos de las dos primeras oleadas foliculares continuaron su desarrollo hasta atresia, y solo uno ó 2 folículos de la última oleada durante la fase folicular están destinados a ovular (Bister *et al.*, 1999). En ovejas Western White Face se ha observado que ocurren cuatro ondas foliculares en las tres primeras ondas foliculares sin diferencia ($P > 0.05$) en la producción de FSH y estradiol (2 ng mL^{-1} , 5 ng mL^{-1} , respectivamente). Sin embargo en la cuarta oleada (oleada ovulatoria) se encontró que existe una mayor producción de FSH y Estradiol (3 ng mL^{-1} , 6.5 ng mL^{-1} respectivamente), respecto las tres oleadas anteriores (Toosi *et al.*, 2010) mientras que Souza *et al.* (1997) reportó concentraciones de hasta 3 ng mL^{-1} y Cahill *et al.* (1981) reportó concentraciones de 2 ng mL^{-1} de FSH.

En la mitad del ciclo estral en ovejas Suffolk, se observan que los diferentes tipos de folículos, muestran una distribución de frecuencia tri-modal, para lo anterior se debe realizar una clasificación agrupando los folículos en tres categorías en función de su tamaño: pequeños (2 mm), medios (3-4 mm) y grandes (≥ 5 mm). La relación entre la secreción de FSH y el desarrollo folicular es muy estrecha: cada incremento en el nivel de FSH en plasma se asocia con la presencia de un grupo de folículos pequeños y una secreción de FSH sostenida se asocia con el comienzo de una oleada de crecimiento folicular (Ginther y Kot, 1994); los folículos de tamaño medio y grandes aparecen cuando los niveles de FSH comienzan a declinar (Bister *et al.*, 1999). Al comparar el crecimiento folicular al inicio, mitad y al final de la época reproductiva, se observa que el número total de folículos pequeños, medianos y grandes no son diferentes durante los tres periodos; durante el periodo de anestro estacional los folículos más grandes alcanzaron un tamaño similar a los que se encuentra en la fase folicular del ciclo estral, pero todos ellos se convirtieron en atrésicos. Del mismo modo, la secreción de FSH durante anestro estacional muestra un ciclo de secreción y las oleadas

están ligadas a la secreción en la misma amplitud que en época reproductiva (Bister *et al.*, 1999). El número total de folículos normales con un número >3 capas de células de granulosa en ovejas Ile-de-France fue similar en época reproductiva o anestro, aunque hubo más folículos antrales en el segundo. Existe una alta correlación positiva en cada oveja entre el número de folículos y el promedio de índice mitótico por clase, lo que sugiere que la existencia de mecanismos intraováricos que regulan la foliculogénesis (Cahill y Mauléon, 1980).

Durante un ciclo estral normal en la estación reproductiva en ovejas de la raza Suffolk, en cada oleada folicular inician el desarrollo 5 folículos conforme avanza el crecimiento se observa atresia hasta alcanzar el 100% en las 2 primeras oleadas; mientras que en la tercer oleada solo ovulan alrededor de 1.2 ± 0.4 folículos del total (Bister *et al.*, 1999); En el caso de trabajos realizados por Evans (2003), se reportan tres oleadas foliculares por ciclo estral. Durante la fase folicular se ha observado que el tratamiento FSH/LH no produce un aumento de progesterona (P_4); por el contrario, la administración de gonadotropinas produce un aumento en la producción de androstenediona (Δ_4) y estrógenos (E_2) inmediatamente después de su administración (Soboleva *et al.*, 2000). En la fase lútea, los folículos producen altas cantidades de P_4 y Δ_4 pero pocas cantidades de E_2 , en comparación con los folículos durante la fase folicular. Por otra parte, la producción de E_2 no se incrementó al aplicar el tratamiento FSH/LH (Bister *et al.*, 1999).

Se ha observado que al inicio de la época reproductiva, la esteroidogénesis *in vitro* es idéntica en términos de actividad basal a la observada en la mitad de la época reproductiva aunque la respuesta es mayor en la segunda. Los folículos que se obtienen al final de la época reproductiva y son cultivados *in vitro* producen alta cantidad de P_4 y bajas en E_2 , aunque la producción no es influenciada al ser tratados con LH o FSH, la secreción basal de Δ_4 es comparable a la obtenida a la mitad de la estación reproductiva aunque la respuesta a la estimulación es significativamente mayor a la primera. En anestro, los folículos presentan mayor producción de P_4 y Δ_4 , pero menor E_2 , en comparación a los

obtenidos durante la fase folicular en la mitad de la época reproductiva; sin embargo, conservan la capacidad de aromatización en respuesta a la exposición a FSH / LH. (Bister *et al.*, 1999). Cuando se aplica tratamiento con PMSG en la tercera oleada folicular no tiene efecto sobre la tasa de crecimiento, aunque apoya el crecimiento de folículos pequeños: su número se incrementó y la tasa de atresia se redujo. Aunque es ineficaz en folículos de tamaño medio (Bister *et al.*, 1999).

2.7. Estacionalidad

Cuando los mamíferos aparecieron por primera vez hace 250 millones de años, el mundo se estaba calentando y secando y sólo había una masa de tierra en existencia, el súper continente de Pangea. Algunas de sus partes experimentaban ciclos extremos estacionales de clima y disponibilidad de alimento, mientras que otros no lo hicieron. Así, algunos de los primeros mamíferos probablemente sólo se reproducían estacionalmente, mientras que otros se reproducirán durante todo el año. Como Pangea se rompió y los nuevos continentes se repartieron por todo el mundo, el clima de la Tierra continuó desplazándose de un extremo al otro y el creciente número de mamíferos se siguió adaptando reproductivamente. La extinción masiva del Cretácico hace 65 Millones de años abrió la puerta a la adaptativa masiva y en la actualidad más de 4.000 especies de mamíferos se pueden encontrar sobreviviendo y reproduciéndose en una gran diversidad de hábitats, la mayoría se caracteriza por cierto grado de variación estacional (Bronson, 2009).

Existen dos factores que son de especial atención para generar conductas estacionales. La primera es la búsqueda de alimento, para mantener en equilibrio el balance energético. El segundo incluye las señales de predicción como el fotoperíodo (Chemineau *et al.*, 1992). El balance de energía y el fotoperíodo intervienen en las vías neuroendocrinas sobre las neuronas en el cerebro que secretan hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Las neuronas productoras de GnRH están ampliamente distribuidas en el cerebro anterior, pero la mayoría se encuentran en el hipotálamo anterior y área pre-óptica; terminan en la

eminencia media, donde la GnRH entra en el sistema portal hipofisario y regula la secreción de las gonadotropinas. Las gonadotropinas controlan la secreción de los esteroides gonadales y, a su vez, la retroalimentación de esteroides para controlar la secreción de gonadotropinas. La retroalimentación negativa ocurre habitualmente en ambos sexos y en hembras la retroalimentación positiva finaliza con la ovulación. A pesar de que las neuronas productoras de GnRH se originan en el cerebro anterior, son capaces de actuar de manera sincronizada, en la generación de pulsos distintos en el lanzamiento de este neuropéptido. Así surge el concepto de utilidad de un generador de pulsos de GnRH a pesar de que aún no está completamente definido neurológicamente. La actividad del generador de pulsos de GnRH a menudo se mide indirectamente por la frecuencia de los pulsos de la hormona luteinizante (LH) en la sangre, algunos pulsos no se ven o son mínimos en animales inactivos reproductivamente mientras que se puede apreciar perfectamente en animales activos reproductivamente (Bronson, 2009).

2.7.1. Balance de energía

Cuando los costos energéticos por alimentación exceden las calorías que obtenidas, el resultado es un balance energético negativo y ésto deprime la generación de pulsos de GnRH. Este modo de regular la reproducción es una característica de todos los mamíferos, es lo suficientemente determinante, ya que anula cualquier factor que desencadene la reproducción. Como se muestra en la figura 3, las calorías de los alimentos obtenidos de un mamífero puede ser utilizado para hacer trabajo o ser almacenada como glucógeno en el hígado o en forma de lípidos en grasa corporal. Algunas de las muchas necesidades energéticas del cuerpo deben estar satisfechas o el mamífero morirá. Se incluyen en esta categoría las actividades básicas celulares, tejidos y órganos, que son necesarios para mantener la homeostasis, así como los costos energéticos para la termorregulación. Funciones como crecimiento y reproducción se pueden ver afectados, cuando las condiciones necesarias para alimentación son demasiado costosas energéticamente y ambas no se llevaran a cabo cuando el balance energético negativo es muy severo (Bronson, 2009).

Existe un interés experimental para conocer la(s) vía(s) neuroendocrina (s) a través del cual el balance energético negativo suprime la generación de pulsos de GnRH, lo que ha dado lugar a un gran número de hipótesis. Una hipótesis es la "hipótesis de combustible metabólico". La cual sugiere que las células en el área postrema del cerebro posterior monitorean los niveles circulantes de combustibles metabólicos oxidables tales como glucosa y ácidos grasos. Cuando no hay suficiente combustible metabólico en circulación para llevar a cabo las funciones en la figura 3, esta información se transmite al cerebro anterior a través de las catecolaminas y neuropéptido Y en las proyecciones que deprimen la generación de pulsos de GnRH, ya sea en forma relativamente directa o indirectamente a través de hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Schneider, 2004).

Si bien existe una relación relativamente directa entre los niveles circulantes de los combustibles metabólicos y la generación de pulsos de GnRH, esto podría no ser la única vía energética relacionada que influye en la secreción de este neuropéptido. El control general del balance de energía es un proceso inmensamente complejo y un número de rutas de acceso participan en ella en segundo lugar, la actividad de las neuronas de GnRH podrían influir. Señales periféricas que influyen en el balance de energía y por lo tanto la secreción de GnRH podría estar influenciada por la actividad del hígado, el páncreas, el estómago, el duodeno o el tejido adiposo, y estas señales pueden ser enviadas al cerebro a través del nervio vago o por hormonas como la leptina, la insulina, factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 o la grelina. Estas hormonas pueden actuar directamente sobre los circuitos neurales que controlan las neuronas GnRH o pueden actuar modulando la disponibilidad de combustible metabólico. Del mismo modo, los neuropéptidos que regulan la secreción de GnRH en el cerebro anterior también podrían incluir galanina, orexinas, urocortinas y opioides endógenos (Bronson, 2009).

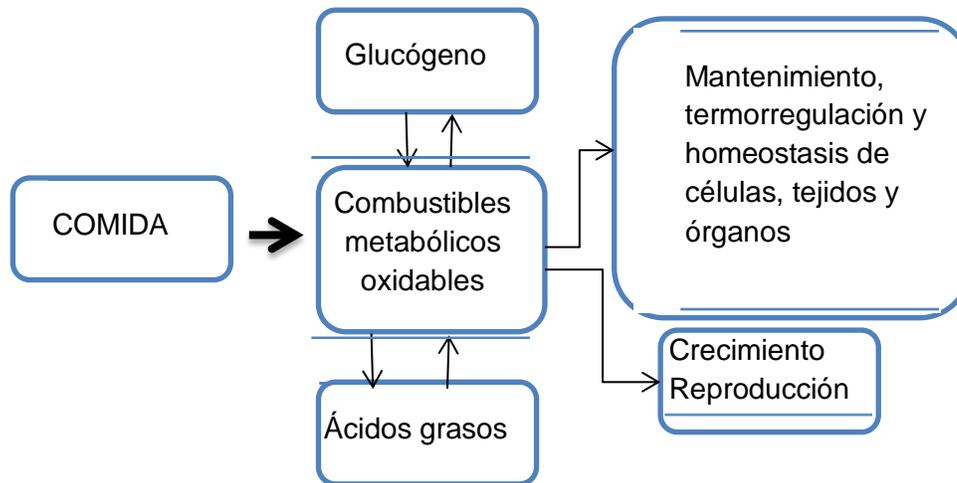


Figura 3. Balance de energía respecto a las prioridades de varias funciones fisiológicas en los mamíferos. Tomado de Bronson (2009).

2.7.2. Factores predictores de estacionalidad

Muchos mamíferos que viven en las latitudes más altas se basan en la variación en la duración del día para prepararse a los cambios estacionales, la capacidad de hacer esto requiere de mecanismos endógenos de tiempo, tal como los circuitos que unen la retina con las neuronas secretoras de GnRH. Las especies de vida mayor a un año, con largos periodos de gestación se basan en un mecanismo de reloj endógeno que oscila periódicamente a lo largo de un año a través de las estaciones anuales. El anestro en ovejas se caracteriza por la ausencia de estro y ovulación, debido a la disminución de la frecuencia del pulso de LH en respuesta a un aumento de la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa efecto de estradiol. Existe cierto crecimiento folicular durante el anestro, con una mayor incidencia de folículos pequeños y medianos que grandes, sugiere que solo existe soporte parcial de gonadotropinas en este periodo. Durante el anestro se puede inducir la ovulación, aunque a través de tratamientos hormonales externos, aunque dichos tratamientos resultan en una alta proporción con regresión lútea prematura, la histerectomía impide la regresión lútea prematura, lo que implica que el útero está relacionado en este proceso (Leyva *et al.*, 1998).

Las ovejas domésticas alojados fuera de la zona templada comienzan a reproducirse a principios de otoño y lo dejan de hacer en invierno. Esto asegura que los corderos nazcan en la primavera o principios del verano cuando los pastos están disponibles al máximo y son nutritivos al máximo. En la oveja, se trata de un reloj endógeno, el ciclo anual que impulsa la sensibilidad sobre la generación de pulsos de GnRH a la retroalimentación negativa de estradiol. La exposición a largos días de verano, aumenta la sensibilidad de las neuronas productoras de GnRH al estradiol; por lo tanto, deprime la pulsación de GnRH e inducción de la temporada en anestro. La exposición a días cortos de otoño, disminuye la sensibilidad de las neuronas productoras de GnRH al estradiol, lo que induce ciclos estrales (Bronson, 2009).

Los estudios que utilizan una gran variedad de mamíferos han puesto de manifiesto varios componentes de la vía, mediante la cual la duración del día regula el generador de pulsos de GnRH independiente de los mecanismos del tiempo señalado anteriormente. Información sobre la duración del día pasa de la retina a través del tracto retino al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, cuando se integre con un oscilador circadiano. El SNC proporciona la entrada al núcleo paraventricular y de allí pasan caudalmente proyecciones neuronales en los ganglios cervical superior de la médula espinal. A partir de ahí las neuronas simpáticas adrenérgicas pasan de regreso a la glándula pineal donde la melatonina (Mel) es secretada a una tasa mucho más alta durante el período de oscuridad que durante el período diurno. La duración de la oscuridad produce un aumento en los niveles circulantes de Mel, proporcionando una forma para que el cerebro mida y reaccione a la variación en la duración del día. Se cree que la señal de Mel se decodifica en el nivel molecular en las células que expresan receptores de Mel en lugar de directamente sobre las neuronas GnRH, pero el circuito de acoplamiento estas dos entidades no es claro hasta el momento, como lo son los mecanismos moleculares implicados en el reloj biológico y los del reloj circadiano. Es probable que todos los mamíferos tengan al menos algunos elementos de una vía que se inicia con la retina y termina en el generador de

pulsos de GnRH. En algunas especies, la vía es completa y funcional, en otros, no lo es. El fuerte movimiento de las placas continentales en los últimos 250 millones de años que se han asegurado de que en algún lugar en el linaje de cada una de las especies actuales son los antepasados que experimentaron variación estacional lo suficientemente potente como para que la selección natural ha favorecido captar la señal del fotoperíodo (Bronson, 2009).

En la actualidad la producción ovina de México tiene características regionales como consecuencia de los diferentes tipos raciales predominantes en las distintas zonas del país. La región norteña se caracteriza por la producción de lana, en la zona centro predomina la producción de carne con base en la cría y engorda de ganado criollo cruzado con razas ovinas de "cara negra" (Suffolk y Hampshire). En las áreas tropicales la producción se lleva a cabo con razas de pelo, como las denominadas en México, Tabasco o Pelibuey, y la Blackbelly o Panza Negra, debido a su capacidad de adaptación a estas regiones del país (Porrás *et al.*, 2003).

Normalmente los ciclos ovulatorios se producen en la mayoría de las razas de ovejas en finales del verano y otoño (época reproductiva), pero ovulación cesa en el invierno y la primavera (temporada no reproductiva). Desde el punto de vista adaptativo, esta restricción de la actividad ovárica a finales verano y otoño, asegura que los corderos nazcan a finales de invierno y principios de primavera, cuando las condiciones ambientales para su supervivencia son favorables, esta estrategia reproductiva está presente en razas que viven en latitudes iguales o mayores a los 35° norte y sur (Viñoles, 2003), mientras que Chemineau *et al.*, (1992) mencionan que por regla general en ovinos y caprinos deben ser superiores a latitudes de 40°, en este medio los cambios ambientales (temperatura, precipitación pluvial, disponibilidad de alimentos) son contrastantes en las diferentes estaciones del año, la necesidad de tener partos estacionales provocó que evolucionara un patrón reproductivo anual, caracterizado por la existencia de un periodo reproductivo y otro de anestro o inactividad ovárica.

El intervalo de cinco meses entre la concepción y el parto propio (para el caso de ovinos), determina el momento del año en que tiene lugar la época reproductiva (Porras *et al.*, 2003). Sin embargo, Lindsay (1991) encontró que las razas ovinas de latitudes extremas $\geq 35^\circ$ de latitud norte y sur muestran un periodo de estacionalidad de 5 meses y en ocasiones hasta 8 meses, mientras que las razas originarias de latitudes bajas (menores a 35°) no supera los tres meses (Cuadro 2), mientras que Chemineau *et al.* (1992) mencionan que muchas razas de latitudes menores a 40° son sexualmente activos todo el año; entendiéndose estacionalidad como la manifestación de un periodo de actividad sexual caracterizado por la presencia de ciclos estales consecutivos y otro con ausencia de los mismos, en la mayoría de las razas ovinas originarias de zonas templadas (De Lucas *et al.*, 1997).

Lugar	Latitud	Raza	Periodo de anestro (mes)												anestro (d)
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Islandia	64° N	Ovejas nativas				x	x	x	x	x	x	x			219
Escocia	56° N	Finnis-Landrace				x	x	x	x	x	x				166
		Tasmania-Merino			x	x	x	x	x	x					181
		Scottish-Blackface		x	x	x	x	x	x	x	x	x			235
Francia	47° N	Romanov Solognote		x	x	x	x	x	x	x	x			164	
			x	x	x	x	x	x	x	x			210		
Francia	48° N	Ile-de-France Préalpes		x	x	x	x	x						179	
						x	x	x						114	
E.U.A.	33° N	Whestern whiteface		x	x	x	x	x	x					~91.5	
Inglaterra	53° N	Dorset-Horn Welsh-mountain		x	x	x	x	x						100	
				x	x	x	x	x						183	
Israel	32° N	Finn-Cross				x	x	x	x	x				152	
España	40° N	Manchega				x	x	x	x	x				97-114	
España	39° N	Merino				x	x	x	x	x				~91.5	
Argelia	36° N	Tamid				x	x							52	

Cuadro 1 .Estacionalidad reproductiva en ovejas en diferentes latitudes.

Adaptado de Lindsay (1991).

La estación reproductiva de ovejas es una sucesión de ciclos de 16 a 18 d de celo, que suele comenzar a finales del verano o principios del otoño y termina en el final del invierno o principios de primavera. La domesticación ha producido un cambio en el calendario de la temporada de cría de otoño a verano, aunque, a diferencia de bovinos domésticos, la mayoría de los pequeños rumiantes domésticos han conservado la mayoría de las expresiones fisiológicas de estacionalidad reproductiva (Forcada y Abecia, 2006).

Forcada y Abecia (2006) mencionan que la actividad sexual en el ganado ovino está fuertemente influenciada por el fotoperíodo, que es el principal factor ambiental responsable de la estacionalidad de la reproducción en poblaciones con latitudes altas. Sin embargo, las ovejas se extendieron por el mundo, y la descripción general de la época reproductiva en los pequeños rumiantes no se puede aplicar universalmente. Alrededor del 60% de las ovejas del mundo se encuentran entre los 35° N y 35° S, un área en la que una estrategia reproductiva que se basa únicamente en las señales fotoperíodo, que podría no ser el más adecuado. El clima entre los 35° N y 35° S, considerado como "Mediterráneo", podría extenderse a 40-41° N; dicha región se caracteriza por la estacionalidad en la disponibilidad de alimentos y pérdida de peso por las ovejas en el otoño, época de apareamiento natural. Por lo tanto, las razas del Mediterráneo se adaptan a las estrategias reproductivas debido a su reducida estacionalidad reproductiva, y su respuesta al fotoperíodo puede ser modulada por otros problemas ambientales (nutrición) o factores sociales (efecto macho o el contacto permanente carneros con las ovejas). En un estudio realizado por Cahill y Mauléon (1980), no encontraron diferencias significativas en el índice mitótico al tamaño de los folículos de las ovejas estudiadas en diciembre y junio. Tampoco hubo diferencia en la proporción de folículos activos. Los folículos que finalmente ovularon en la época de reproducción debieron haber comenzado su crecimiento en la época de anestro, 6 meses antes. De Lucas *et al.* (2008) encontraron que las ovejas de la raza Columbia que manifiestan reproducción estacional en Estados Unidos de América, donde se originaron y se encuentra la mayor población, sin embargo en México de marzo a julio (periodo de anestro) al realizar análisis de progesterona

se encontró que el 36% de las ovejas estaba en actividad cíclica normal, mientras que el resto se encontraba en anestro. Al realizar una comparación el comportamiento reproductivo entre las razas Rambouillet, Criolla, Romney Marsh, Corriedale y Suffolk; a 19° N, De Lucas *et al.* (1997) encontró que las tres últimas razas muestran un comportamiento reproductivo estacional bastante definido, con un periodo de actividad sexual de cuatro a cinco meses y uno de anestro en los restantes. Mientras que las ovejas de las razas Rambouillet y criolla mantuvieron un comportamiento de apareamiento prácticamente continuo a lo largo del año, con solo algunos animales presentando anestro. Se puede apreciar en el cuadro 3 que tanto la raza Rambouillet como la raza criolla iniciaron antes que las otras razas.

Cuadro 2. Comportamiento reproductivo de cinco razas en el altiplano mexicano. Adaptado De Lucas *et al.* (1997).

RAZA	Fecha promedio de 1er estro	Fecha promedio de último estro	Duración promedio de estación de apareamiento (d)
Rambouillet	1/julio	26/enero	209.8
Criolla	11/julio	16/febrero	205.6
Romney Marsh	6/agosto	2/enero	148.0
Corriedale	8/agosto	19/diciembre	131.5
Suffolk	14/septiembre	21/enero	123.5

2.7.3. Melatonina (Mel)

La Mel (N-acetil-5-motxitriptamina) esta hormona (como se mencionó con anterioridad) regula la actividad reproductora, particularmente en animales de reproducción estacional. Esta hormona parece jugar un papel muy importante, si no determinante, en la regulación de la síntesis y liberación de gonadotropinas, es secretada por la glándula pineal con un ritmo bien definido en la noche. Las células parenquimatosas de la glándula pineal captan el aminoácido triptófano de la circulación y lo convierten en melatonina (Hafez *et al.*, 2006). En las ovejas, los niveles circulantes son bajos durante el día ($<10 \text{ pg mL}^{-1}$) y alta en la noche (unos pocos cientos pg mL^{-1}). La duración de los altos niveles de secreción es casi

idéntica en toda la noche. La Pinealectomía hace desaparecer la diferencia entre los niveles diurnos y nocturnos, por lo anterior los animales se vuelven insensibles a los cambios en la duración del día. Los efectos del fotoperíodo en la reproducción pueden ser reproducidos en animales pinealectomizados mediante la infusión de Mel para imitar la secreción los perfiles de día corto (8 horas de luz al día) o largo (16 horas de luz por día). El perfil de secreción de melatonina es por lo tanto, una señal endocrina que transmite la información de fotoperíodo para el eje reproductivo. Además, esta hormona puede ejercer un efecto inhibitorio sobre el inicio de la pubertad, al menos, parcialmente al nivel de la hipófisis (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua. 2002). Como los días cortos se caracterizan por una mayor duración de secreción de Mel que los días largos, se han realizado diferentes intentos para imitar el efecto de los días cortos de prolongar artificialmente la duración de los altos niveles de circulación de Mel (English *et al.*, 1986). También se ha administrado Mel en forma de implantes de esponjas de poliuretano impregnadas con melatonina (Nowak y Rodway. 1987), por vía oral (3 mg oveja⁻¹) por la tarde o por inyección subcutánea (1g) una gran cantidad de melatonina durante la tarde (English *et al.*, 1986).

La exposición de las ovejas a días cortos, pueden ser remplazados por tratamientos de Mel para mantener niveles constantemente elevados, de esta forma imitar el efecto del día corto (Poulton y Robinson. 1987). La aplicación de implantes impregnados de Mel en el mes de junio a ovejas expuestas artificialmente a largos días, induce la ovulación en ovejas y cabras. El enfoque de este tratamiento consiste en mantener altos niveles de las concentraciones plasmáticas de Mel durante todo el período de 24 horas por los dispositivos de la melatonina de liberación constante. Este tratamiento también da lugar a la estimulación de la actividad reproductiva cuando se aplica en animales expuestos a días largos. Dos mecanismos pueden ser utilizados para explicar la acción de los implantes de melatonina: imitar la señal de día corto (noche de larga duración) o eliminar la información del fotoperíodo (que es inhibitorio en ese momento) debido a la ausencia de un ritmo detectable (Chemineau *et al.*, 1992).

Es posible inducir la actividad reproductiva de forma artificial alternando la duración de la iluminación de forma artificial, en el caso de la raza Ile de France y Suffolk, se ha encontrado que la actividad reproductiva inicia alrededor de 50 días después de realizar el cambio de días largos a días cortos, sin embargo los animales permaneces activos reproductivamente solo entre 60-80 días y posteriormente se vuelven refractarios después de 120 días de duración del foto tratamiento sin cambiar de régimen (días cortos), para evitar este periodo refractario se debe alternar días cortos y largo (Thimonier, 1989). El uso de tratamientos de melatonina y/o luz tiene la finalidad de promover la actividad sexual fuera de la época reproductiva. En el macho promueve la activación de la espermatogénesis durante cierto tiempo para producir buena calidad y cantidad de espermatozoides para ser almacenados en epidídimo para realizar monta natural (MN) o inseminación artificial (IA); mientras que en la hembra tiene el objetivo de inducir dos o tres ciclos estrales consecutivos con la finalidad de alcanzar la fertilidad similar a la época reproductiva (Chemineau *et al.*, 1992).

2.8. Efecto macho

La eficiencia reproductiva (ER) es una de las grandes limitantes en la producción ovina y el principal factor que afecta el retorno financiero en los sistemas de producción de esta especie. El uso de sistemas intensivos de apareamiento en ovinos es una opción para incrementar dicha eficiencia. Sin embargo, la estacionalidad reproductiva que afecta a diversas razas limita la posibilidad de mantener un ritmo y ER similar en todos los apareamientos, dado que usualmente alguno de ellos se sitúan en la época de baja o nula actividad (De Lucas *et al.*, 2008). La técnica de bioestimulación ofrece una forma potencialmente útil y práctica, considerando que el costo de su aplicación es casi nulo para mejorar la ER en las especies de ganado, especialmente en cerdos, ovejas, cabras y ganado bovino (Rekwod *et al.*, 2001; Viñoles *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004).

En la producción ovina existen herramientas que permiten obtener mejor eficiencia productiva de las explotaciones, y que desafortunadamente son poco empleadas a pesar de los beneficios que aportan. Tal es el caso del llamado “efecto macho”, que se refiere al estímulo que ejercen los carneros sobre las ovejas en anestro poco profundo, o en aquellas próximas al inicio de la estación de apareamiento. El efecto provocado por la introducción repentina de los carneros estimula un proceso que culmina con la ovulación y la presentación de estro (De Lucas *et al.*, 2008). Aunque la información acerca de las características que hacen a los carneros mejores estimuladores es escasa, se ha observado que los carneros adultos son mejores inductores que los carneros jóvenes en términos de porcentajes de ovejas que ovulan y manifiestan celo, además de obtenerse mayores tasas ovulatorias y de concepción (Ungerfeld *et al.*, 2008).

Los primeros trabajos realizados por Signoret (1980) muestran que la presencia del macho puede inducir estro sincronizado en ovejas adultas. En ovejas en anestro estacional o en la lactancia, al ponerse en contacto con el carnero la primer respuesta es un aumento la frecuencia de liberación pulsátil de LH en pocos minutos, esta alta frecuencia es mantenida por al menos 12 horas (no se ha visto de otra forma), pero la amplitud de los pulsos comienza a caer después de una o dos horas, ya sea como una consecuencia del agotamiento de las reservas de LH en pituitaria o debido a que el aumento en los niveles de estradiol inducidos por una mayor frecuencia de pulsos de LH, que reduce la respuesta de la glándula pituitaria a los pulsos de GnRH que llegan desde el hipotálamo.

El aumento de la frecuencia del pulso, es un paso crítico en el efecto macho, ya que tiene que ser de magnitud suficiente y se mantendrá durante el tiempo suficiente para que el proceso ovulatorio sea un éxito. La amplitud de pulsos no es importante, ya que no existen diferencias en la respuesta de LH entre las ovejas que ovulan y aquellas que no ovulan. El retraso entre el momento de la introducción de los carneros y el primer incremento en la liberación de LH es del orden de 2 a 4 minutos, posiblemente sólo suficiente para que el olor atraviese la

distancia entre los animales (menos de un metro) y provoque la respuesta neuroendocrina detectada en sangre de la yugular; lo que resulta en un pico preovulatorio de 24 horas más tarde, seguido de la ovulación, pero por lo general no muestran comportamiento estral. Sin embargo, el desarrollo del cuerpo lúteo es anormal en la mitad de los casos, dando lugar a un ciclo estral corto anormal de 7 días. Durante el celo en sí, la presencia del macho reduce notablemente la duración de la receptividad sexual y acelera la ovulación. (Martin *et al.*, 1985).

Mientras que en ovejas Pelibuey se ha encontrado que a 19° N durante la época considerada de anestro en México se encontró una alta proporción de (entre 84.6 y 100%) de las ovejas adultas mostraron actividad regular estral en los meses de enero a mayo mientras que el 38% de las ovejas mostraron ciclicidad estral durante los meses de diciembre a julio; empleando machos provistos de mandil para ayudar a detectar celo, cuando se realizaba detección de ciclos reproductivos a través de punción de yugular se encontró que era menor en comparación de la detección con carnero, lo que sugiere que carnero estimula la actividad ovárica en las ovejas, de igual forma se encontró que durante los meses de anestro, tanto la actividad estral como la ovulatoria es menor en ovejas nulíparas que en adultas (Valencia *et al.*, 2006). Romano *et al.* (2001) encontraron que en poca reproductiva al comparar la exposición continua (Ec) Vs intermitente (Ei), se observó en las ovejas que cuando están en Ec al semental en el rebaño, muestran más rápida conducta de celo (32.9 y 45.3 h, respectivamente) y el intervalo de remover esponja a ovulación (62.0 y 72.0, para cada uno) es menor respecto a la Ec; mientras que no hubo diferencia entre la duración del estro y el tiempo de ovulación. Cushwa *et al.* (1992) encontraron al comparar el efecto macho en ovejas aisladas a 1.5 km de los machos Vs 15 m de distancia de separación; encontraron una respuesta de 84% y 85% respectivamente sin diferencia estadística ($p > 0.05$) mientras que al comparar la exposición las hembras al carnero en los meses de mayo y junio encontraron una mejor respuesta en el segundo (92 y 80% respectivamente); considerándose junio como mes transitorio entre la época de anestro y la reproductiva; por lo que el aislamiento de las ovejas a los carneros no parece ser esencial para obtener una

respuesta de alta al efecto macho. De hecho, las diferentes formas de exposición a los carneros (contacto directo con los carneros o con 15 m de separación) para un máximo de 90 días antes del parto no disminuyó la respuesta cuando los carneros fueron introducidos. Provocando en la oveja disminución en el inicio de la época reproductiva normal.

2.8.1. Feromonas

El termino feromona – de las raíces griegas *pherin*, para trasferir y *hormone*, para excitar- fue inicialmente designado para designar la actividad biológica de sustancias producidas por un insecto que cuando son percibidas por otros miembros de la misma especie, es capaz de inducir reacciones específicas tales como proceso de comportamiento particular o un determinado comportamiento. Hoy en día existe una proposición de definición mas completa la cual dice que las feromonas son complejos químicos producidos por individuos de una determinada especie y son definidos en el contexto de beneficio mutuo en la comunicación entre miembros de la misma especie. Las feromonas originalmente fueron descubiertas en los insectos. Existen al menos dos tipos de especies de feromonas: feromonas “liberadoras” que son de acción rápida que están en animales no humanos que pueden desencadenar inmediatamente respuestas conductuales, como la intercomunicación sexual; mientras que otras denominadas feromonas “cebadores” que son sustancias que pueden influir en cambios a largo plazo en el comportamiento o estado endocrino de niveles hormonales, como aquellos que tienen lugar durante el ciclo menstrual y al iniciar la pubertad o preñez. Muchas feromonas son mezclas de multicomponentes, presentes en cantidades de *nanogramos* o *picogramos* (García *et al.*, 2008).

Ahora se sabe que la comunicación a través de feromonas juega un papel importante el comportamiento en mamíferos y los procesos reproductivos. La comunicación química de feromonas es un medio de transmisión de información. En los mamíferos, las feromonas de señalización y transducción se cree que actúan de forma individual o en combinación a través del olfato, auditivo, visual

(vista) o estímulos táctiles. Las feromonas son transportadas por el aire, las sustancias químicas ("señales"), presentes en la orina, las heces de animales, en saliva, sudor o secretado por las glándulas cutáneas que son percibidos por el sistema olfativo y que provocan tanto del comportamiento y las respuestas endocrinas en sus congéneres (Rekwod *et al.*, 2001; Rodríguez. 2004). Los numerosos estudios en los insectos, roedores, cerdos, ovejas, cabras y vacas han establecido la importancia de las feromonas en la fuerte influencia ejercida por los machos sobre la actividad reproductiva en la hembra. Las feromonas en la lana, la grasa y la orina de un carnero es suficiente para estimular las ovejas a ovular, mientras que el macho cabrío tiene un fuerte olor característico durante la temporada reproductiva. La presencia del verraco al momento de la inseminación en la cerda, mejora el transporte de espermatozoides y la ovulación, mientras que la presencia del toro vasectomizado acelera el inicio de la pubertad en vaquillas y también la pronta reanudación de la actividad ovárica en vacas para el siguiente parto. Las feromonas y otras señales pueden ejercer un profundo efecto sobre la actividad reproductiva a través del sistema hipotalámico-hipofisario-gonadal que genera pulsos de GnRH (Rekwod *et al.*, 2001).

La señalización (la liberación) las feromonas en mamíferos evocan una respuesta de comportamiento, ya que la señal sólo implica la transferencia de información y no la naturaleza de la respuesta. Por lo general, se trata de una señal olfativa que se transforma en información específica y por lo tanto provoca un comportamiento específico. Las señales olfativas, transmiten información específica y dan lugar a respuestas de comportamiento específico e inmediato en el macho, son al parecer producidas en orina o secreciones vaginales de las hembras. Estos olores, presentes durante el celo y proestro, pero no en cualquier otro momento. El carnero investiga la orina y región ano-genital de hembras, utilizan estas señales olfativas para determinar el estadio del ciclo estral femenino. Las feromonas de señalización tienen más de una función en el comportamiento, funcionando como atrayentes y/o inductores de la actividad sexual (Rekwod *et al.*, 2001).

Los machos ungulados rutinariamente investigan la región ano-genital y/o la orina de las fémimas. Los componentes de la investigación por parte del carnero incluyen oler, lamer, y acariciar la región genital, que suele provocar la orina en las hembras. El macho luego pone su nariz y la boca directamente en el flujo de orina o huele y lame el sustrato empapándose de orina. Después de oler y lamer, muestra la postura típica de la cabeza levantada con la boca abierta y el labio superior rizado (Flemen). Este comportamiento se observa en muchas especies de ungulados, tanto machos como hembras, en respuesta a olores. El olfateo, lamido y acariciando de la región ano-genital de las hembras se relacionan con el órgano vomeronasal (OVN) también conocido como “órgano de Jacobson”, el cual es parte del sistema olfatorio accesorio presente en gran variedad de vertebrados no humanos.

2.8.2. El órgano vomeronasal

La mayoría de los mamíferos tienen dos sistemas olfativos, el sistema principal, que recibe entradas sensoriales de la mucosa olfativa y se conecta al resto del sistema nervioso central a través de los bulbos olfatorios principales, y el sistema accesorio que recibe entradas desde el órgano vomeronasal ("órgano de Jacobson") y se conecta con otros centros en el cerebro a través de los bulbos olfatorios accesorios. En ambos sistemas hay vías hacia los bulbos olfatorios en el hipotálamo. Estas conexiones son importantes debido a que los centros de control de la reproducción (en particular los que controlan la secreción de LH), se encuentran en esta área y los efectos de las feromonas son mediados a través de estas conexiones en roedores y ungulados (Martin *et al.*, 1986).

El VNO fue descubierto por Ruysch en 1703, un doctor militar, en un soldado con daño facial; el órgano fue llamado poco después Jacobson por quien publicó sus hallazgos en animales, pero no en humanos en 1811 (Rekwod *et al.*, 2001). El OVN en el ganado ovino se encuentra localizado bilateralmente en la base tercio anterior del septum nasal, esta formado por estructuras muy grandes y

visibles, se compone de dos tubos epiteliales de aproximadamente 8cm de largo, rodeada por un cartílago de 1 cm de altura, que se extiende a ambos lados de la base del tabique basal como se observa en la figura 4 (Cohen-Tannoudji *et al.*, 1986). El VNO esta alineado por epitelio columnar pseudoestratificado de 60 μm de profundidad, la porción más gruesa se sitúa dentro del sótano de la membrana. El neuroepitelio vomeronasal esta formado por tres distintos tipos morfológicos celulares; células basales, células oscuras y células claras. Las células basales son pequeñas, poligonales, con manchas oscuras, miden en promedio 6 μm de diámetro. Las células oscuras son grandes, delgadas; por su lado las células columnares con un citoplasma muy denso. Las células claras son largas, células columnares, parecidas a las células oscuras, se extienden del sótano de las membranas a la parte libre de la superficie del epitelio ellas difieren de las células aledañas del epitelio respiratorio en la nariz ya que carecen de cilios (Rekwod *et al.*, 2001). El saco bilateral, en el ganado bovino, ovino y caprino se abre en el conducto incisivo conducto o nasopalatino. El OVN se ha implicado como un quimiorreceptor especializado que participa en la detección de celo y de la liberación, control y coordinación de la actividad sexual. El OVN se cree que contiene los receptores de feromonas de baja volatilidad en secreciones vaginales y orina. Parece que la investigación de la región ano-genital en las hembras por parte del macho participa en el transporte de las señales no volátiles olfativas de la cavidad oral del epitelio sensorial del OVN. Otras funciones a estímulos olfativos del OVN son mantener y estimular la actividad sexual (Rekwod *et al.*, 2001).

Los genes que codifican a nivel molecular los componentes de las respuestas sensoriales del OVN sugiere que las neuronas expresan un conjunto único de moléculas de reconocimiento y traduce las señales de las feromonas en la actividad eléctrica neuronal. La identificación, incluye genes para receptores de feromonas, que ofrecen una nueva oportunidad de descubrir las bases principales de sensores del procesamiento de feromonas y un importante aspecto del desarrollo del órgano vomeronasal (Dulac, 2000).

El olor es un importante factor gobernante en el comportamiento animal. En mamíferos, las señales de olor, obtienen respuestas cognitivas y son adaptadas a los cambios en el comportamiento que pueden ser sustancialmente alterados por la experiencia sensorial. En contraste una discreta clase de señales químicas relacionadas por animales (las feromonas) están preprogramadas genéticamente para desencadenar comportamientos como: el apareamiento, la defensa territorial y cambios neuroendocrinos en la hembra como el ciclo estral y el macho el aumento de testosterona (Dulac, 2000).

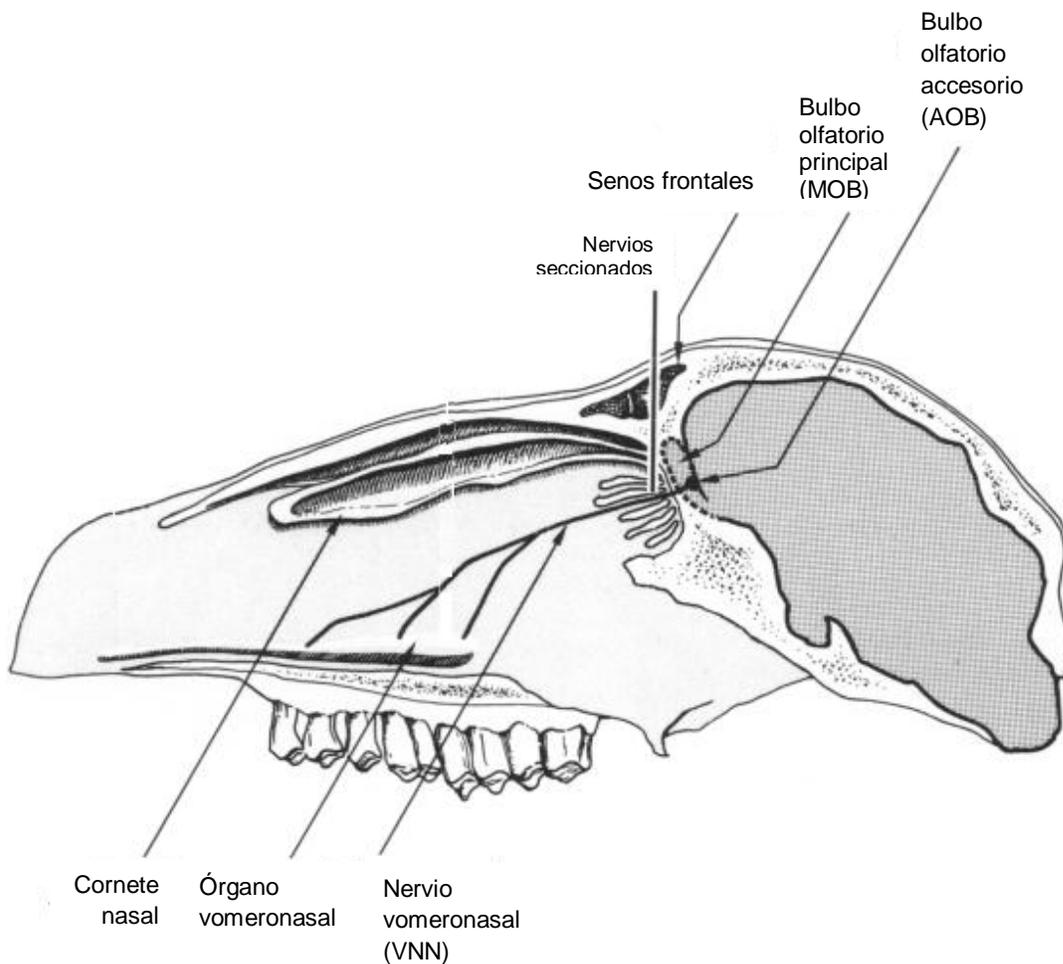


Figura 4 Representación de la sección sagital a través de la cavidad nasal en ovinos (Adaptado de Cohen-Tannoudji *et al.*, 1986).

2.8.2.1. Transducción sensorial de las señales de feromonas

Los elementos esenciales responsables de la transducción del epitelio olfatorio principal (MOE), incluye la proteína G con la subunidad alfa $G_{\alpha_{of}}$ un tipo de adenil ciclasa III y la unidad activa al canal cerrado de nucleótidos cíclicos (Cyclic-nucleotide-gated-channel (CGNC), que no son expresadas en el OVN. Es por lo tanto probable que el OVN, la primera conductancia inducida por activación de receptores de feromonas no es atribuida al CGNC. Las membranas del receptor potencial transitorio (TRP), familia del canal de iones están envueltos en la G-protein-regulated y cyclic-nucleotide-independent de las vías de transducción en una variedad de sistemas sensoriales en invertebrados, por su parte, en el caso de mamíferos ocurre algo similar, un canal homologo de TRP puede desempeñar un papel para retener la respuesta a las feromonas. La proteína rTRP2 aparece alta y específicamente localizada en las microvellosidades sensoriales de OVN que son el sitio propuesto para la transducción sensorial de feromonas. El Canal rTRP2 puede representar la activación de la conductancia primaria por la señal de las feromonas o podría mediar una segunda amplificación o modificar la respuesta sensorial (Dulac, 2000).

2.8.2.2. Mapa de activación de receptores de feromonas en el cerebro de mamíferos

La visualización de las proyecciones neuronales del OVN al Bulbo Olfatorio Accesorio (AOB), ofrece la primera pauta de codificación sensorial molecular de feromonas. Destacando diferencias dramáticas de organización funcional del sentido del olfato. En el sistema olfatorio en vertebrados, las neuronas sensoriales olfatorias individuales expresan solo un gen receptor olfatorio, proporcionando así un marco celular simple para la distinción de receptores. En conjunto de MOE de las neuronas, expresan el mismo estado de sinapsis, los receptores con una específica subpoblación de células mitrales en glomérulos con posiciones fijas dentro del Bulbo Olfatorio Principal (MOB), como se muestra en la Figura 5c. La activación de sustancias discretas de receptores

olfatorios por lo tanto provoca un patrón específico de activación glomerular en el cerebro. A través de más imágenes ópticas sobre las fibras vomeronasales, revela la existencia de dos anatómicas y posibles subdivisiones funcionales a lo largo del AOB a lo largo de la parte anterior y posterior del axón.

2.8.2.3. Detección de feromonas a nivel molecular

El evento inicial de detección quimiosensorial requiere la activación de receptores específicos y la transducción de la activación, ocasionando cambios sobre el potencial de membrana. Se ha demostrado que MOE y las neuronas sensoriales del OVN usan juegos de genes no relacionados evolutivamente para reconocer y traducir información olfatoria en la señalización eléctrica neural como se muestra en la Fig. 5 b y c. En el MOE existe un reconocimiento específico de olores que son archivados por la expresión de una larga familia de alrededor de un millón de receptores olfatorios, G-protein-coupled (ORs); mientras que en OVN se han aislado dos familias independientes de receptores vomeronasales (*VR*), conocidos como *V1R* y *V2R*, que codifican nuevamente la identificación, las proteínas que codifican estos genes son conformados por siete proteínas transmembranales (llamada rodopsina-like) (Rodríguez. 2004). Tanto *V1Rs* y *V2Rs* son expresados por dos familias distintas subpoblaciones de neuronas del OVN, dentro de cada subpoblación, la expresión de cada gen receptor limitado a pequeños (1-0.1%) que no se superponen las subpoblaciones de neuronas del OVN, lo que sugiere que individualmente las neuronas, probablemente solo expresen un gen del receptor. Existe un patrón de expresión que sugiere un modelo de señalización vomeronasal acorde a la unión de las feromonas a receptores específicos a la activación de subpoblaciones distintas a subpoblaciones de neuronas del OVN. Las familias de receptores *V1r* y *V2R* son segregadas únicamente por la población de neuronas sensoriales. Las neuronas que recubren el lumen (o el ápice) a la mitad del neuroepitelio co-expresa *V1Rs* así como la proteína G subunidad $G_{\alpha_{i2}}$. En contraste, la mitad basal del epitelio del OVN contiene neuronas como *V2R*-y G_{α_o} - proyecciones de fibras positivas a la mitad posterior del AOB y las fibras positivas de $G_{\alpha_{i2}}$ reaccionan con la porción

posterior del AOB. Los receptores de la familia V2R esta compuesta de una secuencia similar a G-protein-coupled-receptors, los cuales comprenden: receptores-detectores de Ca^{2+} (CaSRs), el receptor glutamato metabotropico (Dulac, 2000). La actividad nasal de los mamíferos contienen dos juegos independientes de neuronas olfatorias (Fig. 5a). Las neuronas olfatorias del MOE localizada en el hueco posterior de la cavidad nasal, detecta una larga variedad pequeñas químicas volátiles, que son trasportadas por el aire durante la respiración. La información detectada a través del olfato por el MOE es procesada en el bulbo olfatorio principal (MOB) y en el múltiple cortical y centro neocortical del cerebro, el olfato para el desarrollo cognitivo y la respuesta emocional al oler. Las feromonas, en contaste, son primeramente detectadas en el órgano vomeronasal (VNO), una estructura sensorial bilateral de la nariz de los mamíferos esas líneas del septum nasal ventral. Las neuronas quimiosensoriales de la línea del VNO el fluido en el lumen que abre en la ranura ventral de la cavidad nasal, y es por lo tanto accesible ya que las feromonas son solubles el agua y transportadas en el mucus nasal. La ablación amputación quirúrgica del VNO en roedores muestra una dramática disminución del apareamiento, estado de dominancia y reconocimiento de género. Las proyecciones sensoriales se mantienen separadas de las que pertenecen a MOE: neuronas VNO que envía fibras al bulbo olfatorio accesorio (AOB) localizado dorsalmente al MOB; el AOB, a su vez, a núcleos específicos de la amígdala y del hipotálamo ventromedial que desempeña una función reproductiva y en respuestas agresivas (Dulac. 2000).

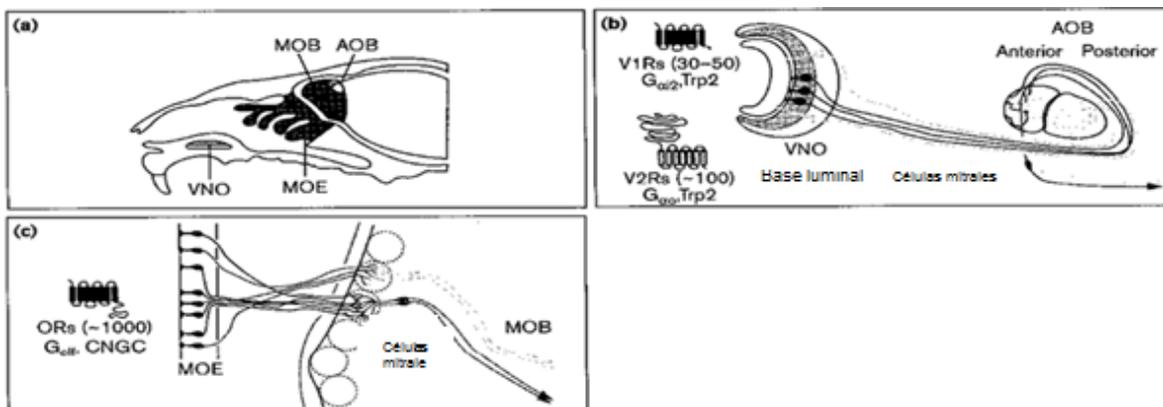


Figura 5. Anatomía y organización celular de los dos epitelios olfatorios en mamíferos Adaptado de Dulac (2000).

2.9. Tractos implicados en la respuesta feromona

La proyección de las neuronas del bulbo olfatorio principal a la corteza olfativa, desde donde una vía importante inervación eferente del hipotálamo circula a través de una vía que incluye la amígdala y el formix (Fig. 6). Las neuronas del bulbo olfativo accesorio no se proyectan a la corteza olfativa, sino simplemente a la amígdala (una región diferente a la inervada por vía principal) y luego a través de la estría terminal (incluida la capa del núcleo) en el área preóptica medial y el núcleo ventromedial del hipotálamo, que pueden estar implicados en las respuestas de feromonas en mamíferos (Fig. 6). Estas regiones son muy importantes en el control de la secreción de LH y el comportamiento sexual. Marchlewska-Koj (1984) concluyó que esta vía mide las respuestas feromonales con mayor probabilidad en ratones, la evidencia más convincente es la inhibición completa de la respuesta endocrina de ratones hembra al macho después de la eliminación del órgano vomeronasal. Cohen-Tannoudji *et al.* (1986) al introducir carneros a ovejas que padecían de anosmia dio lugar a respuestas normales tanto en la liberación tónica de LH como la ovulación al introducir a sementales, respecto al grupo de ovejas control.

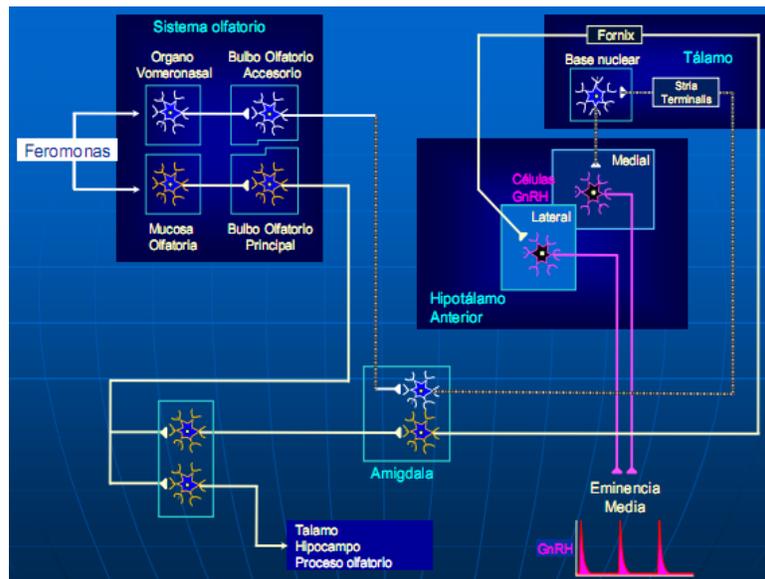


Figura 6. Representación esquemática de las estructuras más importantes de los tractos olfatorios principales (líneas continuas) y accesorios (líneas discontinuas). Adaptado de Martin *et al.* (1986). Tomado de Morales (2010).

2.10. Secreción de GnRH

Esta hormona es un decapeptido (10 aminoácidos) que se aisló y se identificó su estructura alrededor del año 1971, el gen que codifica la GnRH ha sido aislado de la rata, ratón y el hombre, se encuentra localizado en el brazo corto del acrosoma 8 para el humano. La prehormona es una hormona formada por 92 aminoácidos, originando GnRH y un péptido de 56 aminoácidos llamado GAP (péptido asociado con GnRH). La secuencia lineal en mamíferos es la siguiente pyro Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. Tiene un peso de 1,183 Daltons (Hafez *et al.*, 2006).

Se produce en las neuronas productoras de GnRH, las cuales tienen su origen embrionario fuera del sistema nervioso central, y derivan de una placa olfatoria durante la gestación temprana; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo, junto con o parte del nervio terminal a través de la lamina claviforme; cuando existen defectos en la migración de estas neuronas resultan en la deficiencia de GnRH asociada con la ausencia de bulbo olfatorio en humanos (síndrome de Kallmann). En hipotálamo, neuronas parvicelulares secretoras de GnRH se encuentran en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica. De estas zonas la GnRH es transportada a la eminencia media y liberada al sistema portal hipotálamo-hipofisario, preferentemente en el surco infundíbular (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua. 2002).

La hormona GnRH, se libera en forma de pulsos, los cuales suelen ser liberados por señales externas al hipotálamo, tales como las hormonas esteroideas. Se ha calculado una vida media de 10 minutos en el humano, dado que la vida media de esta hormona es muy corta, resulta difícil medir su actividad, por lo que esta es valorada indirectamente a través de la concentración de LH circulante, los receptores para la GnRH se encuentran exclusivamente en membranas citoplasmáticas. El principal sitio blanco de esta hormona son los gonadotropos de hipófisis anterior. Los primeros estudios que intentaron elucidar

el mecanismo a través del cual se realiza la liberación de LH estimulada por GnRH, sugirieron la participación de los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP, como los segundos mensajeros en la transducción de esta señal. Sin embargo, hasta ahora es claro que el cAMP no es el segundo mensajero en la liberación de LH estimulada por GnRH, pero este nucleótido sí parece tener un papel importante en la síntesis de esta hormona. Diversas evidencias, han mostrado que el calcio intracelular pudiera ser el segundo mensajero en la liberación de esta hormona, ya que éste estimula la liberación aguda de LH en respuesta a GnRH. Además, el tratamiento con bloqueadores de canales de Ca^{++} como verapamil y metoxinerapamil bloquean su liberación. El calcio activa a la calmodulina, bloqueadores de esta proteína pueden inhibir la liberación de LH estimulada por GnRH, promueve la activación de la proteína cinasa C con lo cual se produce la liberación de gonadotropinas. El generador del pulso hipotalámico, es influido por varios factores entre los que se encuentran: el péptido opioide endógeno, así, la β -endorfina inhibe la liberación de GnRH del hipotálamo mediobasal en humano, el GABA también produce inhibición de GnRH en tanto que, esta hormona es estimulada por dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT). Otras hormonas. Además de los neurotransmisores antes mencionados, hormonas como inhibina y activina (factores no esteroideos de las gónadas) regulan la liberación de LH y FSH. La inhibina previene la “up regulation” de los receptores para bloquear la estimulación de la síntesis del receptor GnRH producida por la misma hormona, mientras que la activina estimula la síntesis del receptor a GnRH, en cultivo de células hipofisarias.

2.11. Perfil de secreción de FSH y LH

Esta glucoproteína pituitaria, desempeña una función esencial en la reproducción. Durante la fase folicular, las concentraciones de FSH declinan hasta el punto más bajo un día anterior al pico preovulatorio de LH. Hay una oleada coincidente con la secreción pulsátil de LH y FSH, las concentraciones caen en paralelo con LH en el punto más bajo de 8 a 12 horas después del pico preovulatorio. Entonces FSH se incrementa hasta alcanzar un segundo pico de 20

a 28 horas después del primero seguido un segundo punto mas bajo entre 36 a 48 horas posteriores. Un gradual incremento en las concentraciones de FSH es a menudo observado en ocasiones entre los días 4 y 6 de la fase lútea, la cual esta correlacionada con el desarrollo de la segunda oleada folicular. Pequeños incrementos en FSH que perduran por alrededor de un día, ocurren a intervalos de 3 a 6 días a lo largo de la fase lútea cada uno que precede al desarrollo de una oleada folicular. La secreción pulsátil durante en ciclo es inversamente correlacionada a la función lútea por lo tanto las concentraciones de LH declinan a partir del día 1 al 9, mientras que la progesterona se incrementa, los restos mas bajos se detectan hasta el día 14 y entonces se incrementa durante la fase folicular a la siguiente luteolisis.

2.12. El comportamiento estral en ovinos

Cuando existe un acercamiento por parte del macho, a la oveja en estro se quedara quieta con la cabeza baja. Ella a menudo moverá la cola y mirara por encima de su hombro mientras que el carnero dará codazos en el flanco de ella o en la región ano-genital (Goodman e Inskeep. 2006). Existen diferentes grados para clasificar el comportamiento estral en ovejas (cuadro 1), las ovejas que se encuentran en la clasificación 1, 2 o 3 se consideran que están en estro (Parsons y Hunter. 1967). En el pico del estro, la oveja puede buscar activamente al carnero e iniciar el episodio sexual con codazos en el cuarto delantero. El comportamiento de cortejo es usualmente seguido por monta y copula, pudiendo ocurrir varias copulas durante un solo periodo estral. En general el comportamiento estral dura de 26 a 36 horas en la oveja aunque la duración del estro es 50% más largo en razas con altas tasas de ovulación. En inicio del estro esta acoplado con el pico preovulatorio de LH de modo que la ovulación ocurre dentro del promedio de 24 a 36 horas después de iniciado el comportamiento de celo; debido a esta correlación, el inicio del estro es usualmente usado como un marcador del ciclo estral ovino en e l tiempo, el primer día del estro (y el pico de LH) esta designado como el día 0 del ciclo estral (Goodman e Inskeep. 2006).

Cuadro 3. Sistema de clasificación del comportamiento estral en la oveja

Grado	Descripción del comportamiento en la oveja
1	La oveja se mueve hacia el carnero, o el carnero la localiza y monta a la oveja poco después de entrar al corral, la oveja espera inmóvil ser montada
2	El carnero espera pocos minutos antes de montar a la oveja; existe poco movimiento por parte de la oveja cuando es montada
3	La oveja se mueve pocos pasos cuando el carnero la monta, pero el carnero es capaz de llevar cabo el servicio
4	La oveja corre cuando el carnero la monta y el carnero no es capaz de llevar a cabo la copula
5	La oveja se aleja cuando el macho la intenta montar, por lo que la monta no se lleva cabo
6	La oveja sale disparada huyendo del carnero cuando este se le acerca o intenta montarla; por lo tanto, el carnero muestra poco interés por la oveja
7	La oveja provoca solo breve interés por el carnero

Adaptado de Parsons y Hunter (1967).

2.13. Inseminación artificial (AI)

El objetivo de un programa de inseminación artificial consiste en crear una descendencia mejorada, y el logro de este objetivo dependerá de los valores de cría del carnero y oveja seleccionados. La AI vía laparoscópica está siendo utilizada en la industria de las ovejas para extender el uso de carneros superiores, y ofrecer al productor la oportunidad de maximizar el potencial reproductivo de ovejas con alto valor genético. La infusión rápida de los rasgos genéticos conocidos de sementales superiores en el rebaño es el principal beneficio económico de la IA laparoscópica. Una vez que la selección y preparación de la oveja se han logrado, uno de los pasos más importantes en el programa es la sincronización correcta de la hembra para entregar los óvulos necesarios en el sitio de fertilización en un momento específico. Uno de los mejores métodos de

sincronización para IA laparoscópica es el uso de productos a base de progesterona por un período de tiempo controlado (Gourley y Riese. 1990). La detección oportuna de la aparición del estro es esencial, con ayuda de carneros, para determinar con precisión cuando comienza cada oveja su celo o en su defecto usar inseminación artificial a tiempo fijo, la cual consiste en realizar la IA a un tiempo determinado sin realizar la detección de celo de ovejas tratadas con progestágenos. Maxwell et al. (1984) mostró que la deposición intrauterina de semen congelado por vía laparoscópica a 60 horas después del retiro de esponjas y la inyección de PMSG podría ser tan eficaz como la inseminación cervical de semen fresco 55 horas después del tratamiento de sincronización. En estudios posteriores Maxwell (1986) encontró que cuando se utilizan esponjas para sincronizar celo se ha encontrado que el tiempo promedio de ovulación ocurre (con un límites de confianza de 95%) en 55.8 h (54.61-57.09) después de remover la esponja vaginal, se han obtenido las mejores tasa de concepción realizando la IA entre 48-72 h después de retirar la esponja vaginal. Mientras que Evans (1988) menciona que el momento de IA en ovejas superovuladas tratadas con esponjas impregnadas de progestágenos parece ser óptima en 44-48 horas después de retirar esponjas.

2.13.1. Concentración espermática necesaria para uso de IA laparoscópica

El mínimo necesario para inseminación artificial (IA) por vía laparoscópica en razas de lana es de 20×10^6 espermatozoides móviles normales, sin embargo, las ovejas americanas más estacionales y menos fértiles necesitan aproximadamente de 40 a 50×10^6 espermatozoides móviles, normales para lograr una tasa fertilidad aceptable (Gourley y Riese. 1990). Sin embargo Evans (1988) menciona que para obtener una alta tasa de fertilización de ovocitos en protocolos de superovulación se deben usar altas dosis en un orden de 60 a 100 millones.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En pequeños rumiantes, las técnicas de superovulación y transferencia de embriones constituyen, en la actualidad, una herramienta para el desarrollo tanto de programas de conservación de recursos genéticos en razas, como de programas de mejora genéticas destinadas a aumentar la producción ganadera (Gibbons y Cueto, 1995). Su fundamento es el incremento del número de ovulaciones y de embriones viables por hembra seleccionada y ciclo mediante tratamientos hormonales. Sin embargo, a pesar de las mejoras alcanzadas en los últimos años en cuanto a eficacia de los protocolos utilizados, los rendimientos de estas técnicas se encuentran afectados por una alta variabilidad; entre grupos de tratamiento y entre animales dentro del mismo grupo (González-Bulnes *et al.*, 2002). El uso de la ultrasonografía constituye una aportación muy significativa para el desarrollo de estudios sobre los factores limitantes de la respuesta ovulatoria a un tratamiento de superovulación, tanto los dependientes del tratamiento hormonal como aquellos dependientes del animal, que pueden conducir a mejorar los protocolos de superovulación utilizados (Viñoles, 2003). Por otro parte, El “efecto macho”, que se refiere al estímulo que ejercen los carneros sobre las ovejas en anestro poco profundo, o en aquellas próximas al inicio de la estación de apareamiento (De Lucas *et al.*, 2008; Viñoles *et al.*, 2009), la reacción inicial provocada en la hembra, es un aumento en la frecuencia de pulsos de LH, que estimula el crecimiento folicular y la secreción de estradiol (E2) por los ovarios. La subsiguiente acumulación de E2 en la sangre tiene dos efectos: en el corto plazo (en las primeras 2-12 horas) reduce los niveles de la Hormona Folículo-Estimulante (FSH) y la amplitud de pulsos de la hormona luteinizante (LH); a largo plazo (12-48 horas) Induce oleadas de LH y FSH. El aumento de LH induce ovulación y formación de cuerpos lúteos (Martin *et al.*, 1986).

La hipótesis planteada fue:

El “efecto macho” aunado a protocolos de superovulación en ovejas de lana mejora la tasa de ovulación, aumente el número de cuerpos lúteos e incrementa el porcentaje de ovejas en estro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área de estudio

El estudio se realizó durante mayo a julio 2011 en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Esta localizado geográficamente a 19° 29' N y 98° 53' O, a una altitud de 2250 msnm. El clima es Cb(wo)(w)(i) g, templado húmedo con lluvias en verano y una precipitación media anual de 636.5 mm, donde el porcentaje de lluvias invernales es menor al 5% total. La temperatura media anual es 15.2 °C (García, 1988).

4.2. Tipo de animales y alimentación

Se utilizaron 20 ovejas de lana de la raza Suffolk, Hampshire y Dorset, de condición corporal (cc) 3.1 ± 0.4 (escala de 1 a 5; Russel *et al.*, 1969) y de edad promedio de 3.9 ± 0.8 años, durante época de transición de anestro a la época reproductiva que comprende los meses de junio-julio. Durante el experimento, las ovejas se alojaron en corrales provistos con sombra, comederos, bebederos. Las ovejas consumieron una dieta a base de 1.5 kg oveja⁻¹ d⁻¹ de alimento comercial (Borrega Plus; Alimentos Unión Tepexpan ®; Anexo 1) y forraje de buena calidad a libre acceso.

4.3. Manejo de los animales previo al periodo experimental

4.3.1. Manejo de las hembras

Previo al experimento todas las ovejas fueron despezñadas, desparasitadas y vitaminadas (Virbamec ADE, Virbac, México). Las ovejas fueron sometidas a un examen de preñez con ayuda del ultrasonido Digital Ultrasound Imaging System UMS 900 (Bedford Hills, New York, 2009) con ayuda de la sonda abdominal de baja frecuencia de onda (3.5 MHz), indicada para este fin.

4.3.2. Manejo de los carneros

Durante el experimento se utilizaron 2 carneros adultos de lana de las razas Hampshire y Suffolk. Previo al experimento se realizó, por un lado, un análisis físico del macho, evaluando cc, libido, condición de los testículos y epidídimo; y por otro lado, se evaluaron los eyaculados, considerando volumen, concentración, motilidad masal e individual, normalidad, cantidad de vivos y muertos. Los sementales fueron alternados para ser llevados al corral de las hembras provistos de un mandil 2 veces al día por 20 minutos en la mañana (6:40-7:00) y por la tarde (4:00 – 4:20).

4.4. Tratamientos

La distribución de las ovejas, se realizó de manera aleatoria en dos lotes diferentes asignando a 10 ovejas a cada uno. Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento 1 (T1): consistió en insertar a ovejas un CIDR (considerado día 0) que contenía 0.3 g de progesterona natural (EAZI-BREED^{TR} CIDR G®, Inter Ag, Nueva Zelanda) durante un periodo de 9 días. Al 7° día, 48 horas previas al retiro del CIDR, se aplicaron 500 µg de prostaglandina sintética (cloprostenol, Celosil®, Schering Plough, México), más 300 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligon®, Intervet, México) (Blanco *et al.*, 2003); al igual las ovejas recibieron dosis decrecientes de gonadotropinas hipofisarias de cerdo (Pluset® ,Laboratorios Calier, Barcelona, España) cada 12 horas (48, 36, 24, 12, 0 previas al retiro y 12 h después del retiro), administrando 75 y 50, 37.5 y 37.5, 25 y 25 UI FSH/LH respectivamente (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2011). El tratamiento 2 (T2): similar al T1, sin embargo a partir del día 7 y hasta el día 9, se introdujo al carnero al corral de las hembras. El día 9 se procedió a realizar retiro del CIDR. El día 11 se realizó el servicio de inseminación a tiempo fijo a las 48 horas postretiro de CIDR (Maxwell, 1986), aplicando un mínimo de 50×10^6 espermatozoides móviles (Bettencourt *et al.*, 2008).

4.5. Manejo de los animales durante el periodo experimental

4.5.1. Toma de datos para la dinámica folicular

Los ovarios fueron observados con ayuda de ultrasonografía (Cortez-Romero *et al.*, 2011) y las características de los folículos fueron trazadas en los mapas. Para la exploración ovárica se utilizó el ultrasonido Digital Ultrasound Imaging System UMS 900 (Bedford Hills, New York, 2009), equipado con una sonda transductora con doble frecuencia de onda (5.0-7.5 MHz), indicada para el examen rectal de grandes especies. Cada imagen seleccionada en el monitor fue congelada para medir las estructuras estudiadas y se dibujó la posición relativa de los ovarios para hacer seguimiento de sus folículos.

Cada evaluación se realizó por la mañana antes de ofrecer alimento a las ovejas, de acuerdo a los siguientes pasos: 1) los exámenes rectales fueron realizadas por un solo operador, las ovejas fueron asegurados en la posición de pie en una manga de compresión, se retiraron las bolitas fecales de forma digital, se colocó gel (Carboxymethyl celulosa) dentro de un guante para uso en palpación rectal junto con la cabeza del transductor, el cual fue unido a una guía (para introducirla en el recto y ayudar a manipular el transductor desde el exterior) y sujetado con una ligadura. Posteriormente, 2) se colocó gel en el exterior del guante el cual actúa como lubricante, además es un medio de acoplamiento entre la pared del recto y el transductor; la vejiga urinaria sirve como guía de referencia para localizar los ovarios. Los ovarios fueron explorados en sentido dorso-ventral, lateral-medial y medial-lateral en un ángulo de 45° a 90° tal como se muestra en la Figura 7. Al final, 3) se midió el diámetro de los folículos presentes antes de iniciar en protocolo de sincronización, en el primer día que se colocó el dispositivo intravaginal y se realizó de forma consecutiva a partir del día 6 hasta al 9, periodo que coincidió con la introducción del macho al corral de hembras y el inicio del protocolo de superovulación. (Perea *et al.*, 1998)

Figura 7. Examinación transrectal del tracto reproductivo con la oveja en pie



El Brillo de las imágenes de ultrasonido se relaciona con la densidad del tejido. El líquido no es ecogénico, y por lo tanto, los folículos parecen esferas negras o anecoicas. El tejido sólido refleja las ondas de sonido, haciendo que el cuerpo lúteo para aparecer como áreas de color gris brillante o hipoeoicas respecto al estroma ovárico, distinguible debido a su aspecto granuloso. El tamaño de los folículos se midió con una función de pinzas después de la congelación de la imagen de la ecografía en la pantalla de vídeo de la consola, y los folículos fueron clasificados a partir de entonces en tres clases de tamaño: ≤ 2 mm, 3-4 mm y ≥ 5 mm de diámetro. Este sistema de clasificación fue seleccionado debido a su valor fisiológico, ya que folículos que posteriormente ovulan tienen al menos 5 mm de diámetro en el momento de la ovulación (Driancourt *et al.*, 1991; Goodman e Inskeep. 2006).

La dinámica folicular se registro por día como se muestra a continuación y en la Fig. 8.

- Medición 1, corresponde al día que se coloco el CIDR (considerado como día 0 del inicio del experimento).
- Medición 2, corresponde el día anterior al inicio del protocolo de superovulación (considerado como día 6 del inicio del experimento).
- Medición 3, corresponde al 1° día del inicio del protocolo de superovulación (considerado como día 7 del inicio del experimento).
- Medición 4, corresponde al 2° día del inicio del protocolo de superovulación (considerado como día 8 del inicio del experimento).
- Medición 5, corresponde al 3° y ultimo día del inicio del protocolo de superovulación así como retiro de CIDR (considerado como día 9 del inicio del experimento).

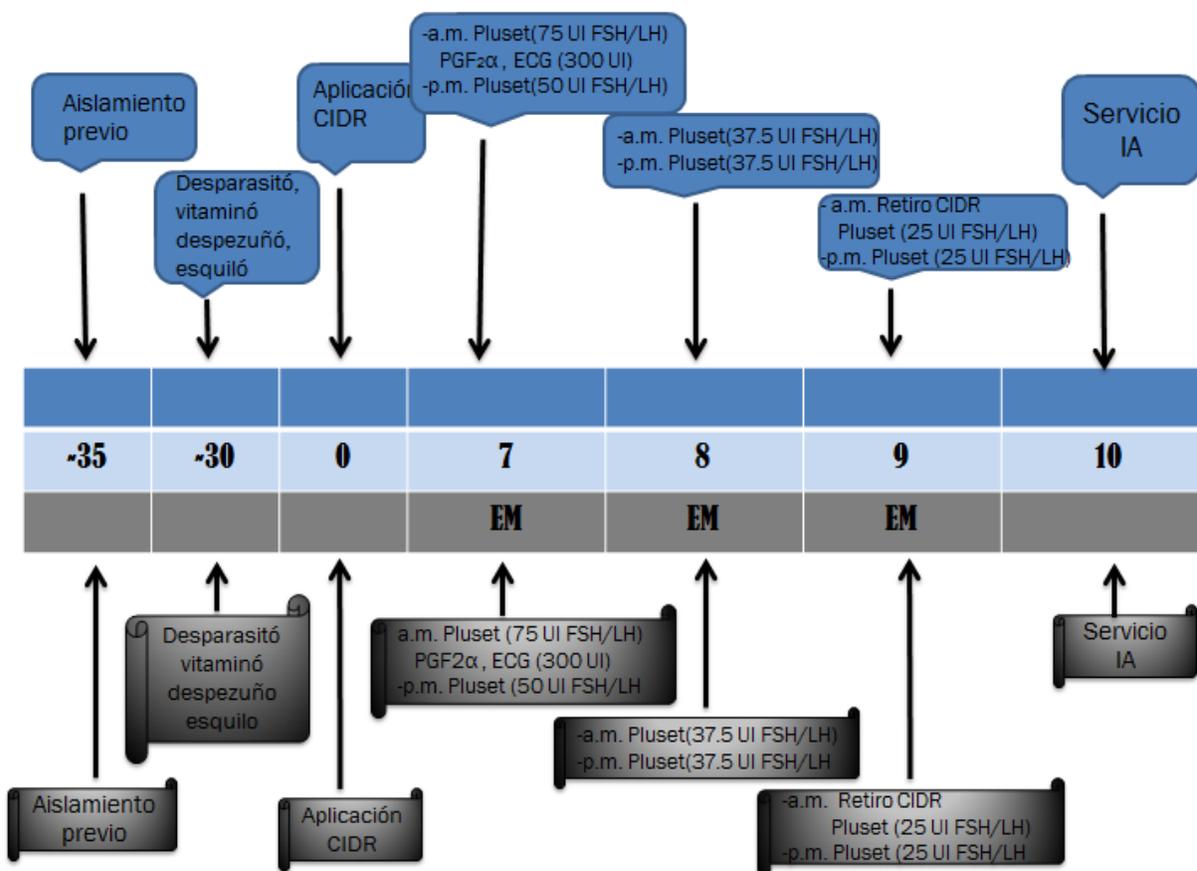


Figura. 8. Esquema de las actividades realizadas durante el experimento

4.6. Variables evaluadas

- **Dinámica folicular (DF):** Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio y posterior formación y regresión del cuerpo lúteo.
- **Porcentaje de ovejas en estro (OE):** Número de ovejas que están en estro divididas entre el total de ovejas dentro del mismo tratamiento.
- **Inicio del celo (IC):** Horas transcurridas después de retirar el dispositivo intravaginal hasta que la oveja presenta celo.
- **Cuerpos lúteos (CL):** Número de estructuras presentes en cada ovario, contabilizadas con ayuda de laparoscopia transabdominal.

4.7. Análisis estadístico

Para analizar el efecto de los factores de estudio, tratamiento sin efecto macho (TE) y con efecto macho (EM) sobre la dinámica folicular. De igual forma, para comparar el efecto de los factores de estudio, dentro de cada tratamiento se realizó un análisis sobre la dinámica folicular comparando los folículos de pequeños y medianos (Lectura 3) vs folículos grandes (Lectura 5) utilizando el procedimiento GLM (SAS, 2002). El modelo del diseño experimental utilizado fue el siguiente:

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

Donde:

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

μ = Media general

ε_i = Efecto del i-ésimo nivel de tratamiento, $i = TE$ y EM .

E_{ij} = error experimental

Para analizar la variable inicio de celo, se utilizó el método de comparación de curvas de supervivencia Log-Rank utilizando el procedimiento Life Test (SAS, 2002).

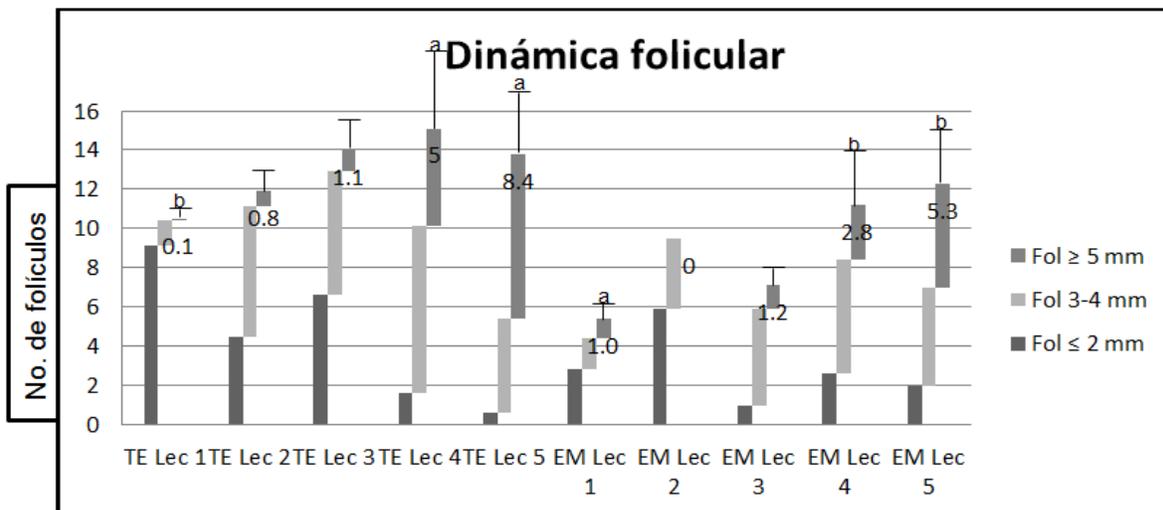
Para investigar el efecto de los valores de estudio, tratamiento sin efecto macho (TE) y con efecto macho (EM) y sobre la cantidad de cuerpos lúteos presentes en ovarios durante el experimento, se utilizó el modelo de regresión Poisson usando el procedimiento GENMOD (SAS, 2002).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Dinámica folicular (DF)

En la Grafica 8, se muestran los datos correspondientes al número de folículos agrupados en tres categorías, en función del diámetro. Se puede apreciar que a medida que avanzan los días correspondientes al tratamiento el número de folículos ≥ 5 mm se incrementa hasta tomar la lectura 5 (L5), mientras que se presenta un comportamiento contrario con los folículos de 2 mm, ya que en L5 los folículos se encuentran en menor cantidad al compararse con L2. En cuanto a los folículos de 3 a 4mm no presenta una tendencia clara de comportamiento, sin embargo en L4 presentan la mayor cantidad de folículos en ambos tratamientos. Cabe señalar que la proporción de folículos ≥ 5 mm en L5 es similar a la presentada en L4 en la categoría de 3-4 mm, mientras que Ali (2007) encontró en ovejas Ossimi una tasa de crecimiento de 1.02 mm d^{-1} en un tratamiento de superovulación a base de eCG. La cantidad de folículos pequeños y medianos al día del inicio del protocolo de superovulación (correspondiente a L3) fue menor en las ovejas correspondientes al tratamiento “efecto macho”, lo que pudo influir en la respuesta final.

Figura 9. Población folicular el durante tratamiento a base de gonadotropinas hipofisarias (FSH/LH), con y sin “efecto macho”



TE= Tratamiento testigo; EM= Tratamiento “Efecto macho”; Lec= Lectura

Se realizó un segundo análisis en el cual se comparó dentro de cada tratamiento los folículos de $\geq 5\text{mm}$ correspondientes a L5 (correspondiente al último día de superovulación) Vs L3 (conformados por los folículos presentes al iniciar el tratamiento hormonal) incluyendo folículos pequeños y medianos, como se muestra en el Cuadro 4; el cual muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el número de folículos presentes al inicio y final cuando se adicionó el “efecto macho”.

Cuadro 4. Comparación de Lectura 3 (L3) Vs Lectura 5 (L5) dentro de cada tratamiento

Tratamiento	Folículos	Lectura 3	Lectura 5 ($\geq 5 \text{ mm}$)
Testigo	Pequeños	6.6 ± 4.48	8.3 ± 3.17
Efecto macho	($\leq 2 \text{ mm}$)	1.0 ± 1.32 a	5.3 ± 2.94 b
Testigo	Medianos	6.3 ± 6.5	8.3 ± 3.17
Efecto macho	(3 a 4 mm)	4.9 ± 1.8	5.3 ± 2.94

^{a,b} Medias con diferente literal en la misma línea son diferentes estadísticamente ($p < 0.01$).

La respuesta obtenida en el tratamiento con “efecto macho” probablemente pudo deberse a que antes de iniciar el protocolo de superovulación la presencia de un folículo grande en crecimiento al momento del tratamiento de superovulación se asocia con una baja respuesta, menor ovulación, menor número de embriones transferibles y un desarrollo subnormal del cuerpo lúteo (Rubianes *et al.*, 1997).

Las observaciones realizadas en ovinos indican que el efecto del tratamiento sobre la tasa de ovulación podría verse determinado principalmente por el tipo de hormona utilizada y, especialmente, por su contenido en LH, ya que un aumento de LH disminuye la respuesta ovárica (Picazo *et al.*, 1996). González-Bulnes *et al.* (2002) encontraron que cuando existen presencia de LH en compuestos con FHS aumenta la tasa de regresión y disminuye sus posibilidades para ovular. Este último efecto se ve reforzado por el hecho de que los altos niveles de LH alteran, e incluso impiden, la descarga preovulatoria de esta hormona.

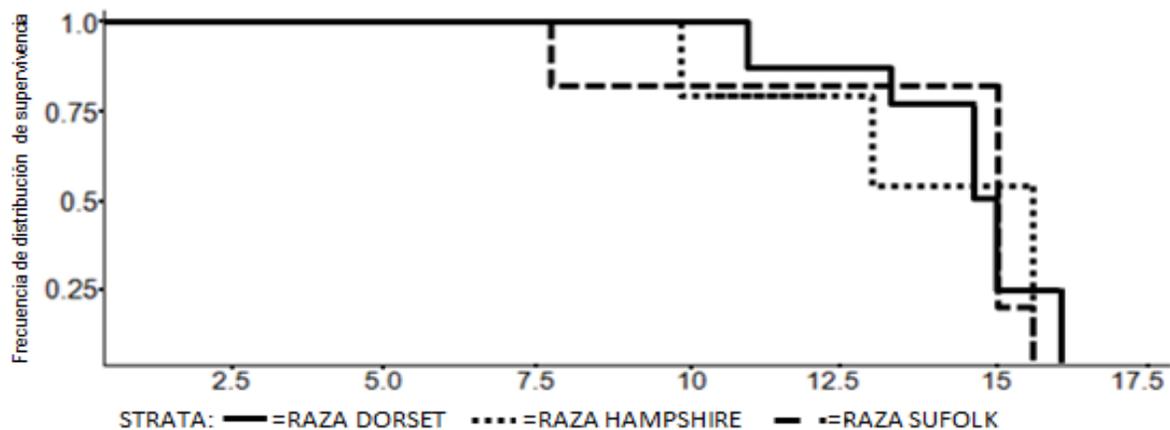
5.2. Porcentaje de ovejas en estro

En el Cuadro 5, se muestran los resultados del tratamiento con el uso de gonadotropinas porcinas (FSH/LH), en relación al porcentaje de ovejas en estro. Se muestra un 100% de respuesta para el “efecto macho” mientras que para el tratamiento testigo se obtuvo 90% de ovejas que respondieron al tratamiento de superovulación, dicho resultado es superior a los reportados por Wierzchos *et al.* (1992), D'Alessandro *et al.* (1996); Aké-López *et al.* (2002); Blanco *et al.* (2003); D'Alessandro *et al.* (2005) y Bettencourt *et al.* (2008); quienes usaron gonadotropinas porcinas y obtuvieron un 75%, 93.2%, 85%, 88.86%, 95% y 55.6%. Los resultados del estudio realizado por Bettencourt *et al.* (2008) a 37° N; quien utilizó Pluset (Laboratorios Calier, Barcelona, España) para superovular ovejas en verano y otoño, no encontró diferencia significativa entre ambas estaciones.

5.3. Inicio del celo (IC)

En el Cuadro 5, se muestran las diferencias ($p < 0.05$) encontradas entre tratamientos en relación al inicio del celo (IC). Se observó que en el tratamiento testigo las ovejas mostraron celo en menor tiempo ($13.60 \text{ h} \pm 1.70$) respecto al testigo ($14.75 \text{ h} \pm 2.07$). En la Fig. 9 muestra la curva de supervivencia de IC, sin diferencia estadística ($p > 0.05$) entre tiempo y por cada una de las razas.

Figura 10. Curva de supervivencia de inicio de celo después del retiro de CIDR por raza (H: Hampshire, D: Dorset, S: Suffolk)



Los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden explicar con lo reportado por Wierzchos *et al.*, (1992), menciona que la hora del comienzo y la duración de estro fue correlacionado con la cantidad de hormona administrada, cuando se utilizan protocolos de sincronización a base de gonadotropinas porcinas. Dicho resultado es mayor al reportado por Cordeiro *et al.*, (2003); mientras que fue menor al publicado por Wierzchos *et al.* (1992); D'Alessandro *et al.* (1996); Topoleanu *et al.* (2008) 12, 20, 22.85 y 48 respectivamente; con el uso de gonadotropinas porcinas (FSH/LH-pluset). López *et al.* (1990), Jabbour y Evans (1991), con el uso de FSHp, reportan que las ovejas manchegas mostraron celo en promedio 24.7 h después de remover la esponja vaginal. Con el uso de eCG, Blanco *et al.* (2003) reportan que ovejas presentaron celo 26.4 h después de retirar dispositivo intravaginal.

5.4. Número de cuerpos lúteos (CL)

En ovinos y caprinos se ha encontrado que el número de embriones transferibles, está directamente relacionado con la presencia de cuerpos lúteos normales y plenamente funcionales al día en que se realiza la colección embrionaria (Mejía *et al.*, 1998).

En el Cuadro 5, se muestran los resultados entre tratamientos en relación al número cuerpos lúteos (CL). Sin encontrar diferencia significativas entre los mismos ($p > 0.05$), mostrando en promedio 8 cuerpos lúteos totales.

Cuadro 5. Variables respuesta de los tratamientos testigo Vs efecto macho

Variable	Tratamientos	
	Testigo	Efecto macho
Porcentaje de ovejas en celo (%)	90	100
Inicio de celo (horas)	13.60 ± 1.70 b	14.75 ± 2.07 a
No. de CL	7.7 ± 5.02	8.2 ± 3.63

a,b Medias con la misma literal en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

El resultado anterior se puede explicar ya que en los estudios realizados por D'Alessandro *et al.* (2005) concluyeron que la respuesta ovárica es menor al emplear dosis con proporción constantes FSH/LH en comparación de dosis decrecientes de proporción FSH/LH. Aunado a lo anterior utilizando una cantidad alta de hormonas hipofisarias (1000 UI) y en dosis decrecientes se obtienen altas cantidades de cuerpos lúteos (D'Alessandro *et al.*, 1996). Se ha encontrado que utilizando dosis menores a 500 UI de gonadotropinas hipofisarias se obtiene un menor número de cuerpos lúteos el cual no rebasa 8 estructuras encontradas (D'Alessandro *et al.*, 1996; Wierzchos *et al.*, 1992), dichos resultados con parecidos a los obtenidos. El resultado de la investigación es igual a lo reportado por Mejía *et al.* (1998), mientras tanto fue menor a lo reportado por Aké-López *et al.* (2002) obteniendo en promedio 12.41 CL. Por otra parte Bettencourt *et al.* (2008) encontró que al realizar una comparación del mismo protocolo de superovulación en verano y otoño a 37° latitud norte, encontrando 9.3 y 11.8 CL respectivamente en cada estación sin diferencia estadística ($p > 0.05$), por lo que este factor pudo influir de forma poco significativa en el resultado obtenido. En esencia, la utilización de preparados comerciales con FSH purificada supone un mejor aprovechamiento de la población folicular, evitando la estimulación excesiva sin resultados prácticos en cuanto a ovulación y obtención de embriones (Taft *et al.*, 1996).

Se realizó un análisis para determinar la correlación entre el inicio de celo (horas) y el número de cuerpos lúteos CL, encontrándose un valor de -0.33916. El resultado anterior indica que existe cierta tendencia a que a mayor número de cuerpos lúteos el inicio de la hora de celo se reduce. Lo anterior se realizó para determinar la relación que guarda el inicio de celo (h) con el número de cuerpos lúteos (CL). Se utilizó CL ya que no se tienen datos sobre la cantidad de folículos preovulatorios presentes, sin embargo, se toma en cuenta que cada ovulo liberado generara un cuerpo lúteo (Mejía *et al.*, 1998). El pico de estradiol coincide con la receptividad de la hembra al ser montada por el carnero (Hafez *et al.*, 2006), por lo que al existir alrededor de 6.5 ng mL^{-1} de E2 en sangre (Toosi *et al.*, 2010) la

hembra muestra receptividad. Con base en los datos anteriores se consideró que al existir una mayor cantidad de folículos se presentara una mayor cantidad de estradiol en circulación por lo que la hembra presentara celo en menor tiempo.

Se realizó un segundo análisis para determinar si existe correlación entre la dinámica folicular correspondiente a la Lectura 5 (L5) y el número cuerpos lúteos (CL). Se encontró una correlación un valor de 0.05315 entre el número de folículos ≥ 5 mm presentes al realizar la última lectura, con respecto al número de cuerpos lúteos. Tomando en cuenta que el tamaño mínimo que alcanza un folículo para ovular es de al menos 5 mm de diámetro (Driancourt *et al.*, 1991; Viñoles, 2003; Hunter *et al.*, 2004 y Goodman e Inskeep. 2006). Se contabilizaron los folículos ≥ 5 mm en ambos ovarios y se compararon con el número total de folículos por oveja.

En ovinos y caprinos se ha encontrado que el número de embriones transferibles, está directamente relacionado con la presencia de cuerpos lúteos normales y plenamente funcionales al día en que se realiza la colección embrionaria (Mejía *et al.*, 1998).

VI. CONCLUSIÓN

El “efecto macho” aunado a una preparación de gonadotropinas en la respuesta superovulatoria en ovejas de lana, no aumento la tasa de ovulación ni el numero de cuerpos lúteos, tampoco redujo el inicio de celo en comparación con el tratamiento testigo. Sin embargo si se quiere dar continuidad al trabajo de investigación se sugiere agregar un mayor número de unidades experimentales.

VII. LITERATURA CITADA

- Ali A. 2007. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. *Small Ruminant Research* 72:33–37.
- Aké-López J. R., H. M., M. Aguilar Alfaro-Gamboa, F. Centurión-Castro y A. Rojas-Rodríguez. 2007. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. *Vet. Méx.* 34(3):225-233.
- Baird D.T. and R.J. Scaramuzzi. 1976. Changes in the secretion of ovarian steroids and pituitary luteinizing hormone in the periovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *J. Endocrinology.* 70:237-245.
- Bartlewski M.P., E.T. Baby and L.J. Goffin. 2011. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science* 124:259–268.
- Bettencourt E.M., C.M. Bettencourt, J. Chagas e Silva, P. Ferreira, C.I. Matos, C.M. Romão and A. Rocha. 2008. Effect of season and gonadotropin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Ruminant Research* 74:134–139.
- Bister j. L., B. Noël, B. Perrad, S. N. M. Mandiki, J. Mbayahaga and R. Paquay. 1999. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology* 17:315-328.
- Blanco M.R., L. Simonetti and O.E. Rivera. 2003. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. *Small Ruminant Research.* 47:183–191
- Bronson F. H. 2009. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364:3331-3340.
- Cahill L. P. and P. Mauléon. 1980. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fert.* 58:321-328.
- Cahill L. P., J. Saumande, J. P. Ravault, M. Blanc, J. Thimonier, J. C. Mariana and P. Mauléon. 1981. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 62:141-150.
- Chemineau P., B Malpaux, J. A. Delgadillo, Y. Guérin, J. P. Ravault, J. Thimonier and J. Pelletier. 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science.* 30:157-184.

- Cohen-Tannoudji J., C. Lavenet, A. Locatelli, Y. Tillet and P. Signoret. 1986. Non-involvement of the accessory olfactory system in the LH response of anestrus ewes to male odor. *J. Reprod. Fert.* 86:135-144.
- Cordeiro M. F., J.B. Lima-Verde, E.S. Lopes-Júnior, D.I.A. Teixeira, L.N. Farias, H.O. Salles, A.A. Simplício, D. Rondina and V.J.F. Freitas. 2003. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research* 49:19-23.
- Cortez-Romero C., J. Gallegos-Sánchez. 2011. Manual sobre Transferencia de Embriones en Ovinos. Colegio de Postgraduados y Fundación Grupo Produce DF. 1ra. edición. 64p. ISBN: 978-607-715-025-1.
- Cortez-Romero C., C.A. Herrera-Corredor, J. Gallegos-Sánchez, J. Salazar-Ortiz. 2011. Manual sobre Fisiología de la Reproducción, Inseminación Artificial y Ultrasonografía en Ovinos. Colegio de Postgraduados y Fundación Grupo Produce DF. 1ra. edición. 72p. ISBN: 978-607-715-024-4.
- Cushwa W.T., G.E. Bradford, G.H. Stabenfeldt, Y.M. Berger and M.R. Dally. 1992. Ram Influence on Ovarian and Sexual Activity in Anestrus Ewes: Effects of Isolation of Ewes from Rams Before Joining and Date of Ram Introduction. *J. Anim. Sci.* 70:1195-1200.
- D'Alessandro A., G. Martemucci, F. Toteda, M. Gambacorta, and A. Manchis. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. *Small Ruminant Research* 19:255-261.
- D'Alessandro A. G. Martemucci and L. Taibi. 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology* 63:1764–1774.
- De Lucas J. T., E.P. Gonzales y L.R. Martínez. 1997. Estacionalidad reproductiva en ovejas de cinco razas en el altiplano central mexicano. *Téc. Pecu. Méx.* 35(1):25-31.
- De Lucas T. J., L. A. Q. Zarco, P. C. Vásquez. 2008. Use of the male effect to induce reproductive activity in ovine intensive breeding systems. *Vet. Méx.* 39(2):117-127.
- Driancourt M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Reproductive physiology. I.N.R.A.* 35(1):65-79.

- Driancourt M.A., W.W. Thatcher, M. Terqui and D. Andrieu. 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrus cycle early pregnancy and in response to PMSG. *Domestic Animal Endocrinology*. 8(2):209-221.
- Ducal C. 2000. Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Current opinion in neurobiology*. 10:511-518.
- English J., A.L. Poulton, J. Arendt and A.M. Symons. 1986. A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewes. *J. Reprod. Fert.* 77:321-327.
- Evans G. 1988. Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 41:103-16.
- Evans, A. C. O. 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal reproduction Science*. 78:289-306.
- Fields M.J. and P.A. Fields. 1996. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrus cycle and pregnancy, *Theriogenology*. 45:1295-1326.
- Forcada F. and J.A. Abecia. 2006. The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:355–365.
- Fortune, J.E. and S.M. Quirk. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science* 66:1-8.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Ed. México. 194 p.
- García V. D., J. J. T. Marrero, and A. G. Ravelo. 2008. Roles of insect and mammals pheromones: Vomeronasal receptors. *Studies in natural products chemistry*. 34:393-451.
- Gibbons A. E. y M. I. Cueto. 1995. Manual de Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. INTA EEA Bariloche. Argentina. 32p.
- Ginther O. J. and K. Kot. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42:987-1001.
- González-Bulnes A., J. Santiago-Moreno, M. García-López and A. López-Sebastián. 1995. Ultrasonic monitoring of ovarian follicular development in ewes during administration of homologous FSH. *In: International symposium on life cycle of the ovarian follicle*, Florida.

- González-Bulnes A., J. Santiago-Moreno, R.M. García-García, M.J. Cocero and A. López-Sebastián. 2002. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes (Revisión). *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.* 17:37-48.
- Goodman R. L. and Inskoop E. K. 2006. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. *In: Physiology of Reproduction.* Knobil E. and Neill J.D. 3th ed. London. 44:2389:2447.
- Gourley D.D. and R.L. Riese. 1990. Laparoscopic artificial insemination in sheep. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.* 6(3):615-633.
- Hafez E.S.E., M.R. Jainudeen e Y. Rosnina. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. *In: Hafez E.S.E. y B. Hafez. Ed. McGraw Hill. Reproduccion e inseminación artificial en animales. 7th ed. Kiawah Island, South Carolina, USA. 2006.*
- Hunter M.G., R.S. Robinson, G.E. Mann and R. Webb. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science* 82–83:461–477.
- Jabbour H.N. and G. Evans. 1991. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. *Animal Reproduction Science.* 26:93-106.
- Karsch F.J., S.J. Legan, K.D. Ryan, and D.L. Foster. 1980. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 23:404-413.
- Leyva V., B.C. Buckrell and J.S. Walton. 1998. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrus ewes. *Theriogenology.* 50:377-393.
- Lindsay, D.R. 1991. Reproduction in the Sheep and Goat. *In: Reproduction in Domestic Animals.* Ed. Cupps, P.T. Academic Press. California, U.S.A. 1991.
- López S. A., Y Cognie, M.J. Cocero, J de la Fuente and N. Poulin. 1990. Effect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. *Theriogenology.* 34:175-180.
- Marchlewska-Koj A. 1984. Pheromones and mammalian reproduction. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 6:266-302.

- Martin G. B., J. T. B. Milton, R. H. Davidson, H. G. E. Banchemo , D. R. Lindsay and D. Blache. 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 82–83:231–246.
- Martin G. B., Y. Cognie, A. Schirar, A. Nunes-Ribeiro, C. Fabre-Nis and C. Thierry. 1985. Diurnal variation in the response of anestrus ewes to the ram effect. *J. Reprod. Fert.* 75:275-284.
- Martin G. B., M. Christopher, B. Oldham, Y. Cognie and D.T. Pearce. 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams — a review. *Livestock Production Science*, 15:219-247.
- Maxwell W.M.C., L.G. Butler, and H.R. Wilson. 1984. Intra-uterine insemination of ewes with frozen semen. *J. Agric. Sci. Cambridge.* 102:233-235.
- Maxwell W.M.C. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Animal Reproducción Science.* 10:301-308.
- Mejía O. V., C. M. Murcia, J. M. Valencia, F. A. Espinosa. 1998. Administración postmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Vet. Méx.* 31(2):129-135.
- Mihm M. and E.C.L. Bleach. 2004. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* 78:217–237.
- Morales T. G. 2010. Estrategias de manejo del enestro postparto en ovejas pelibuey. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. 93 p.
- Noel J.B., J.L. Bister and R. Paquay. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *Journal of reproduction and fertility.* 99:695-700.
- Nowak R. and R. G. Roadway. 1987. Length of melatonin exposure and onset of ovarian activity in anestrus ewes. *J. Reprod. Fert.* 80:343-347.
- Parsons S. D. and G. L. Hunter. 1967. Effect of the ram on duration of oestrus in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 14:61-70.
- Picazo R.A., M.J. Cocero, M.L. Barragán, A. López-Sebastián. 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology* 45:1065-1073.

- Perea G. F., F. R. González, A. R. Cruz, B. E. Soto, U. E. Rincón, S. C. González, M. P. Villamediana. 1998. Evaluación ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y en novillas mestizas. *FCV-LUZ*. 2 (1):14-24.
- Prieto-Gómez B. y M. Velázquez-Paniagua. 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. 45(6):252-257.
- Porras A. A., Q. L.A. Zarco y M. J. Valencia. 2003. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria* 9: 1-33.
- Poulton A.L. and T.J. Robinson. 1987. The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. *J. Reprod. Fert.* 79:609-626.
- Rekwod P.I., D. Ogwu, E.O. Oyedipe and V.O. Sekoni. 2001. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 65:157–170.
- Rodríguez I. 2004. Pheromone receptors in mammals. *Hormones and Behavior* 46:219–230.
- Romano J.E., D. A. Fernández and N. Villegas. 2001. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes. *Applied Animal Behavior Science* 73:193-198.
- Rubianes E., R. Ungerfeld, C. Viñoles, A. Rivero and G.P. Adams. 1997. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47:1479-1488.
- Russel J. F., J. M. Doney, R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal Agricultural Science*. 72:451-454.
- Sangha G.K., R.K. Sharma and S.S. Guraya. 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small ruminant Research*. 43:53-64.
- SAS. 2002. JMP. Statistic Visual. Version 9.0. Institute Inc. Campus Drive. Cary. NC 27517.
- Schneider J. E. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.* 81:289-317.
- SIAP. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Boletín del Mercado Nacional Agropecuario. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/ventana>.

- Signoret J. P. 1980. Effet de la présence du mâle sur les mécanismes de reproduction chez la femelle des mammifères. *Reprod. Nutr. Develop.* 20(2):457-468.
- Schneider J. E. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiology and Behavior* 81:289–317.
- Soboleva T. K., A. J. Peterson, A. B. Pleasants, K. P. McNatty, F. M. Rhodes. 2000. A model of follicular development and ovulation in sheep and cattle. *Animal Reproduction Science* 58(1):45–57.
- Souza C. J. H., B. N. Campbell, D. T. Baird. 1997. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biology of reproduction.* 56:483-488.
- Taft R., N. Ahmad, E.K. Inskeep. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 74:2985-2991.
- Thimonier J. 1989. Contrôle photopériodique de l'activité ovulatoire chez la brebis. Existence de rythmes endogènes. Thèse Doc. Univ. Tours, 112p.
- Thimonier J. et P. Mauléon. 1969. Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 9(2): 233-250.
- Topoleanu I., Nadolu D. and Zamfirescu S. 2008. Răspunsul ovarian după diferite tratamente de superovulație la capre. *Analele SNBC Date - Morfofiziologice și Biochimice.* 13(2):142-147.
- Toosi B.M., S.V. Seekallu, D.M.W. Barrett, K.L. Davies, R. Duggavathi, E.T. Bagu, N.C. Rawlings. 2010. Characteristics of peaks in serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes. *Theriogenology.* 73: 1192-1201.
- Ungerfeld R., M.A. Ramos, and S.P. González-Pensado. 2008. Ram effect: adult rams induce a greater reproductive response in anestrus ewes than yearling rams. *Anim. Reprod. Sci.* 103:271-277.
- Valencia J., A. Porras, O. Mejía, J. M. Berruecos, J. Trujillo, L. Zarco. 2006. Actividad reproductiva de la oveja pelibuey durante la época del anestro: influencia de la presencia del macho. *FCV-LUZ.* 16(2):136-141.

- Viñoles G. C. 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral thesis. Department of Clinical Chemistry. Swedish University of Agricultural Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Uppsala, Uruguay.
- Viñoles C., G. Banchemo, G. Quintans, R. Pérez-Clariget, P. Sosa, R. Ungerfeld, A. Bielli, A. D. Fernandez, M. M. Pereira y A. Meikle. 2009. Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia*. 13(3):59–79.
- Wierzchos E., Tischner M. and Maffii M. 1992. Superovulation of a low fecundity sheep breed using a porcine gonadotrophin extract with a defined LH content (Pluset). *Theriogenology*. 38:147-152.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis proximal del alimento comercial, Borrega Plus, Alimentos Unión Tepexpan ®

Nutrimento	Aporte
Proteína cruda	15.0% min.
Grasa cruda	3.0% min.
Fibra cruda	10.0% máx.
Cenizas	7.5% máx.
Humedad	12.0% máx.
ELN	52.0% min