



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

RESPUESTA OVÁRICA Y EMBRIONARIA EN OVEJAS PELIBUEY SUPEROVULADAS CON FSH Y FSH:LH DURANTE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA

MIGUEL PAUL CONDE HINOJOSA

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

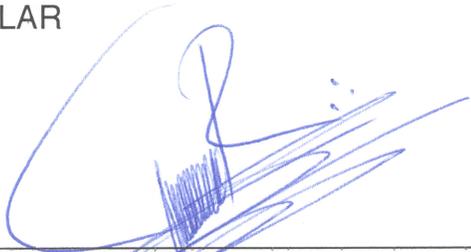
2014

La presente tesis titulada: “Respuesta ovárica y embrionaria en ovejas Pelibuey superovuladas con FSH y FSH:LH durante la época reproductiva”, **realizada por el alumno:** Miguel Paul Conde Hinojosa, **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

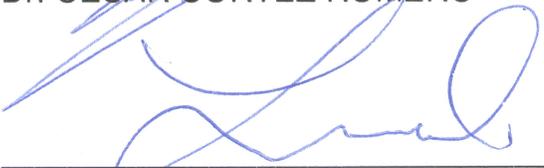
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. CESAR CORTEZ ROMERO

ASESOR:



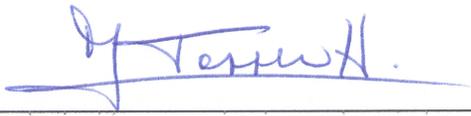
Dr. JUAN SALAZAR ORTÍZ

ASESOR:



Dra. ALEJANDRA HERRERA CORREDOR

ASESOR:



Dr. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2014

RESPUESTA OVÁRICA Y EMBRIONARIA DE OVEJAS PELIBUEY SUPEROVULADAS CON FSH Y FSH:LH DURANTE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA

Miguel Paul Conde Hinojosa, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

Existe un déficit en la producción de carne de ovino; es necesario divulgar biotecnologías que permitan a los ovinocultores incrementar su productividad. El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta ovárica y embrionaria en ovejas de la raza Pelibuey con diferentes tratamientos de superovulación con FSH y FSH:LH durante la época reproductiva. El estudio se realizó en el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Se utilizaron 24 ovejas Pelibuey de 1.7 años de edad \pm 0.24, con peso vivo de 39.1 ± 4.01 kg que se asignaron aleatoriamente a cuatro protocolos diferentes: T1: P4 + FSH + PGF2 α , T2: P4 FSH:LH + PGF2 α , T3: P4+PGF2 α y T4: estro natural. Se realizaron siete observaciones ováricas con intervalos de 12 horas; siendo la primera a las 60 h previas del retiro y la última 12 h después del retiro de CIDR en los tratamientos T1, T2 y T3; y para el T4 la primera observación fue 60 h antes y la última 12 horas después del inicio del estro. Los folículos se clasificaron en: pequeños (2-3 mm), medianos (4-5 mm) y grandes (≥ 6 mm). El registro de la tasa ovulatoria y estructuras colectadas se realizó mediante laparotomía, siete días después del retiro de los CIDR's en T1 y T2, y mediante laparoscopia en T3 (siete días después del retiro del CIDR) y T4 (seis días después del retorno a estro). Se encontró que los tratamientos T1 y T2 presentaron un mayor número de folículos preovulatorios ($p < 0.05$) en comparación con los tratamientos T3 y T4. Mientras tanto las ovejas del T1 presentaron una mejor tasa ovulatoria y un mayor número de embriones transferibles en relación al T2. La aplicación de FSH en dosis decrecientes contribuye a mejorar la respuesta ovárica y embrionaria en ovejas Pelibuey superovuladas en la época reproductiva.

Palabras clave: folículos, tasa ovulatoria, embriones, FSH, ovejas Pelibuey.

OVARIC AND EMBRYO RESPONSE OF PELIBUEY SHEEP SUPEROVULATED WITH FSH AND FSH:LH DURING BREEDING SEASON

Miguel Paul Conde Hinojosa, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

SUMMARY

There is a shortfall in production of sheep meat; important to disseminate biotechnologies that enable increased productivity. The objective of this study was to evaluate the ovaric and embryo response in Pelibuey sheep with different treatments to superovulation with FSH and FSH:LH during breeding season. The study was conducted at the Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Were used 24 Pelibuey ewes age 1.7 ± 0.24 years, with live weight of 39.1 ± 4.01 kg were randomly assigned to four different protocols: T1: P4 + FSH + PGF 2α , T2: P4 FSH:LH + PGF 2α , T3: P4+PGF 2α y T4: natural estrus. Seven ovarian observations were done with 12-hour intervals the first was 60 hours prior to withdrawal CIDR and the last 12 h after of the withdrawal in treatments T1, T2 and T3; and for T4 the first observation was 60 h before and the latest 12 hours after onset of estrus. The follicles were classified as small (2-3 mm), medium (4-5 mm) and large (≥ 6 mm). Registration of ovulation rate and collected structures was performed by laparotomy, seven days after the withdrawal of CIDR's at T1 and T2 and by laparoscopy T3 (seven days after CIDR removal) and T4 (six days after the return to estrus). It was found that the T1 and T2 treatments had a greater number of preovulatory follicles ($p < 0.05$) in comparison with treatments T3 and T4. Meanwhile the sheep of T1 showed better ovulation rate and a greater number of transferable embryos relative to T2. The application of FSH in decreasing doses helps improve ovaric and embryo response in Pelibuey sheep superovulated in the breeding season.

Key words: follicles, ovulation rate, embryos, FSH, Pelibuey sheep.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por éste regalo

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría

A la **LPI5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal** y a los campus Montecillo, Córdoba y San Luis Potosí del Colegio de Postgraduados, por el financiamiento otorgado para la investigación

Al **Dr. César Cortez Romero** por la oportunidad que me otorgó y el tiempo dedicado a la revisión de éste trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al **Dr. Juan Salazar Ortiz** por las facilidades que me otorgó para la realización de ésta investigación.

A la **Dra. Alejandra Herrera Corredor** por su contribución en la realización del presente estudio.

Al **Dr. Glafiro Torres Hernández** por la revisión del presente estudio.

Al **Dr. Humberto Vaquera Huerta** por su disposición y apoyo invaluable en el análisis estadístico de ésta investigación.

Al **personal administrativo** del postgrado en ganadería.

A todos los que me falta mencionar que con poco ó mucho, contribuyeron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios

A mi madre y mis hermanos

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
OBJETIVOS.....	4
HIPÓTESIS	5
3. REVISIÓN DE LITERATURA	6
3.1. ORIGEN Y PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA RAZA PELIBUEY	6
3.2. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA OVEJA.....	7
3.3. CARACTERÍSTICAS Y FISIOLOGÍA DEL CICLO OVÁRICO	8
3.3.1. Fase Lútea	9
3.3.2. Fase folicular	10
3.4. DESARROLLO FOLICULAR.....	11
3.4.1. Reclutamiento	14
3.4.2. Selección.....	14
3.4.3. Dominancia	15
3.5. SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL.....	17
3.5.1. Progestágenos	17
3.5.2. Prostaglandina F2 α	18
3.6. LA SUPEROVULACIÓN U OVULACIÓN MÚLTIPLE EN OVINOS.....	19
3.6.1. Antecedentes de superovulación	19
3.6.2. Selección y manejo de la hembra donante	20
3.6.3. Hormonas usadas en la superovulación: FSH y eCG.....	21
Hormona Folículo Estimulante (FSH)	21
Gonadotropina Coriónica Equina (eCG).....	23
3.7. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA SUPEROVULACIÓN	24
3.8. MÉTODOS DE RECOLECTA DE EMBRIONES	25
3.8.1. Método quirúrgico, laparotomía media ventral	25

3.8.2. Métodos no quirúrgicos	25
Laparoscopia	25
Transcervical.....	26
3.9. MÉTODOS DE EVALUACIÓN EMBRIONARIA	26
3.9.1. Métodos invasivos.....	26
Análisis genéticos preimplantación (AGP)	27
Hibridación fluorescente in situ	27
Transcriptómica	27
3.9.2. Métodos no invasivos.....	28
Respirometría.....	28
Metabolómica.....	28
Evaluación embrionaria por su morfología.....	29
3.10. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES POR SU ESTADO DE DESARROLLO	32
3.11. ECOGRAFÍA	35
3.11.1. Principio de la ecografía.....	35
3.11.2. Uso del ultrasonido en la producción animal.....	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1. LOCALIZACIÓN	38
4.2. ANIMALES	38
4.3. ALIMENTACIÓN	38
4.4. TRATAMIENTOS.....	39
4.5. MANEJO DE LAS HEMBRAS	40
4.5.1. Desarrollo folicular.....	40
4.5.2. Detección de estro y montas.....	41
4.5.3 Tasa ovulatoria.....	41
4.5.4. Procedimiento laparoscópico	42
4.6. RECOLECTA DE EMBRIONES	42
4.7. BÚSQUEDA DE EMBRIONES Y CLASIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS RECOLECTADAS.	44
4.8. VARIABLES RESPUESTA	45
4.9. MODELO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46

5. RESULTADOS	48
5.1 DESARROLLO FOLICULAR.....	48
5.2 MANIFESTACIÓN DE ESTRO	50
5.3 INICIO DEL ESTRO	50
5.4 TASA OVULATORIA, FOLÍCULOS GRANDES NO OVULADOS Y RESPUESTA OVÁRICA TOTAL.	52
5.5 ESTRUCTURAS COLECTADAS Y TASA DE RECUPERACIÓN	52
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES	59
8. LITERATURA CITADA	60
11. ANEXOS	84

ÍNDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro 1. Clasificación de embriones en base a sus características morfológicas.....	30
Cuadro 2 Categorías para la clasificación de embriones propuestas por la IETS.....	31
Cuadro 3 Características de los diferentes estadios de desarrollo embrionario encontrados al momento de recolectar embriones en ovejas entre los días 6 y 7.....	34
Cuadro 4. Manifestación de estro (%) por tratamiento en ovejas Pelibuey con diferentes tratamientos para sincronización o superovulación.....	50
Cuadro 5 Tiempo de inicio al estro (Media \pm error estándar) de ovejas Pelibuey con diferentes tratamientos para la sincronización o superovulación.....	51
Cuadro 6 Tasa ovulatoria, folículos grandes no ovulados y respuesta ovárica total (Media \pm error estándar) en ovejas Pelibuey tratadas con diferentes tratamientos para sincronización del estro o superovulación.....	52
Cuadro 7 Ovocitos, embriones y estructuras recolectadas de ovejas Pelibuey con dos tratamientos diferentes para superovulación (Media \pm error estándar.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Modelo para el crecimiento folicular en la oveja basado en la dependencia y la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas.....	13
Figura 2. Representación esquemática del desarrollo folicular durante el ciclo estral de la oveja.....	16
Figura 3. Representación de la cronología del desarrollo embrionario en la oveja (días post celo).....	33
Figura 4. Esquema de tratamientos utilizados para sincronizar el estro o superovular las ovejas Pelibuey en época reproductiva.....	40
Figura 5. Esquema representativo de la búsqueda embrionaria en las cajas Petri cuadriculadas.....	44
Figura 6. Promedio de folículos pequeños (2-3 mm) medianos (4-5 mm) y grandes (≥ 6 mm) en ovejas Pelibuey tratadas con T1: P4 + FSH + PGF2 α , T2: P4 FSH:LH + PGF2 α , T3: P4+PGF2 α y T4: estro natural.....	49
Figura 7. Curvas de supervivencia de inicio del estro, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento ($p < 0.05$).....	51

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C= Grados Celsius

ARN= Ácido Ribonucleico

CIDR= Dispositivo intravaginal liberador de progesterona

CL= Cuerpo Lúteo

eCG= Gonadotropina coriónica equina

FISH= Hibridación fluorescente in situ

FSH= Hormona folículo estimulante

GnRH= Hormona liberadora de las gonadotropinas

h= Hora

IETS= Sociedad internacional de transferencia de embriones

IGG= Factor de crecimiento insulínico

kg= Kilogramo

LH= Hormona luteinizante

mm= Milímetro

msnm= Metros sobre el nivel del mar

n= Número

oFSH= Hormona folículo estimulante de origen ovino

ONF= Ovocitos no fertilizados

P4= Progesterona

pFSH o FSHp= Hormona folículo estimulante de origen porcino

PGF2 α = Prostaglandina F2 alfa

SAS= Statistical analysis system

TO= Tasa ovulatoria

UI= Unidades internacionales

1. INTRODUCCIÓN

La oveja (*Ovis aries*) se encuentra dentro de los primeros animales que se domesticaron para la producción de lana y carne (Hafez *et al.*, 2000). En México, existen aproximadamente 8,405,902 cabezas ovinas (SIAP, 2013), de las cuales el 58.9 % se localiza en ocho estados de la república y sólo el 41.1 % se ubica en las 23 entidades federativas restantes (INEGI, 2013). Destacan el Estado de México e Hidalgo con el 23.3 % del total de la población ovina nacional, lugares que habitualmente concentran una gran parte de la producción, el comercio y la transformación de la carne. La producción nacional de carne de ovino durante el año 2011 satisfizo sólo el 70 % del consumo nacional aparente, el 30 % restante fue surtido con carne importada principalmente de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (SAGARPA, 2013).

Como se mencionó en el párrafo anterior, existe un déficit en la producción de carne de ovino; esto hace necesario divulgar las nuevas biotecnologías para que los ovinocultores conozcan las distintas opciones disponibles para incrementar su productividad.

En México, el manejo de los ovinos ha sido deficiente, ya que no se le ha dado la importancia suficiente a esta especie y por lo tanto, la generación de estrategias de manejo que permitan la mejora reproductiva y genética, es una necesidad en los sistemas de producción (González-Garduño *et al.*, 2010). Las tecnologías de reproducción asistida se han utilizado en la ganadería desde hace varias décadas para aumentar el potencial reproductivo de los animales de granja (Gordon *et al.*, 2005). En las ovejas, el uso de estas técnicas puede ayudar a mejorar la eficiencia reproductiva (Cognie *et al.*, 2003). A partir de los primeros estudios sobre superovulación, realizados por Hammond *et al.* (1944), la superovulación se ha implementado en la investigación y producción de las ovejas por más de 50 años (Driancourt *et al.*, 1992; Staigmiller *et al.*, 1992).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La conciencia de realizar un mejoramiento de la actividad pecuaria está teniendo una difusión importante entre los productores que buscan optimizar las características productivas y reproductivas de los animales, para ofrecer más y mejores productos al mercado (Duica *et al.*, 2007). En México, actualmente se está avanzando hacia la utilización de técnicas como la transferencia de embriones (TE), biotecnología más utilizada alrededor del mundo para reproducir animales de alto valor genético (Bó, 2000).

Para tener éxito, es necesario identificar los factores que limitan el éxito de la reproducción, tanto directa como indirectamente, ya que es fundamental para la utilización de las biotecnologías reproductivas (Leteliera *et al.* 2011). La eficiencia reproductiva de los rebaños está influenciada entre otros factores, por la prolificidad, parámetro determinado por la tasa de ovulación; un factor clave para la eficiencia reproductiva que puede ser mejorado (Scaramuzzi, 1988). Por otra parte, la tasa de ovulación se puede manipular mediante la administración de hormonas exógenas o modificación de la dieta durante períodos críticos del crecimiento del folículo (Lucy *et al.*, 1992; Hunter *et al.*, 2004)

La tasa ovulatoria se puede incrementar mediante la inyección de gonadotropinas como la gonadotropina coriónica equina (eCG), la hormona folículo estimulante (FSH), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Knights *et al.*, 2003). Los extractos de FSH y LH comerciales tienen una actividad LH bastante variable, que puede influir en la eficacia del tratamiento de superovulación (Casida *et al.*, 1942). Además, es importante conocer los elementos que están implicados en el desarrollo folicular, con la finalidad de plantear estrategias que permitan mejorar los aspectos reproductivos en los ovinos.

En la especie ovina, el conocimiento de los mecanismos que regulan la dinámica

folicular ha recibido especial atención (Viñoles, 2003), donde se sabe que el número de folículos que ovulan varía dependiendo de la raza (Hunter *et al.*, 2004). Por lo tanto, es importante conocer la dinámica folicular para establecer programas de superestimulación ovárica de manera que los protocolos puedan iniciar cuando no exista un folículo dominante en el ovario, con el objeto de obtener mayor número de embriones transferibles (Wolfsdorf *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001).

OBJETIVO

Evaluar la respuesta ovárica y embrionaria en ovejas de la raza Pelibuey superovuladas con FSH y FSH:LH durante la época reproductiva.

HIPÓTESIS

La respuesta ovárica y embrionaria es mejor en las ovejas a las que se les aplicó FSH:LH (Folltropin®-V) en dosis decrecientes durante la época reproductiva.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Origen y principales características de la raza Pelibuey

La raza Pelibuey se origina a partir del ovino peludo de África occidental (Muñoz, 2002). Es el resultado de algunos siglos de adaptación de las ovejas que fueron traídas durante la colonización española, a las condiciones cálidas que se presentan en Cuba (Bidot, 2004).

La raza Pelibuey fue introducida en América por los colonizadores españoles durante el siglo XVI, originaria de Islas Canarias y África; es una raza de pelo que se ha adaptado al clima tropical (Delgado *et al.*, 2000; Ulloa-Arvizu *et al.*, 2009). Se estableció en algunas islas del Caribe, llegó a Cuba y de ahí pasó a México por la Península de Yucatán. Ahora se encuentra distribuida en todo el territorio nacional (Partida, 2007). Las ovejas de pelo de México son primordialmente Pelibuey y Blackbelly. De acuerdo con González-Reyna *et al.* (1991), la raza Pelibuey constituye entre 90 y 95 % de la población total de ovinos de pelo en México.

Las ovejas de pelo se han convertido en un recurso genético muy valioso, no sólo para los países con climas tropicales, sino también para los lugares donde se crían razas de ovejas de lana (González *et al.*, 1992).

Los ovinos Pelibuey son animales rústicos y prolíficos que se adecúan muy bien a diversas condiciones ambientales (Lara, 2007; Partida y Martínez, 2010), tales como la humedad, el calor y la alimentación escasa (Carrillo y Segura, 1993). También presentan poca estacionalidad reproductiva entre los meses de febrero a abril (González-Reyna *et al.*, 1991), aunque Valencia y González (1983) reportan que los ciclos estrales parecen estar presentes durante todo el año.

Las ovejas Pelibuey son fértiles, se sabe que llegan a tener una fertilidad de 80 a 95 % y prolíficas, pueden parir de 1.4 a 1.95 crías por parto bajo las diversas condiciones climáticas del país (SAGARPA, 2013). Es una raza con una excelente resistencia a

diversas afecciones parasitarias (Morteo *et al.*, 2004; Partida y Martínez, 2010).

Son animales de conformación cárnica, cubiertos de pelo tupido y corto (INEGI, 2013); el color de la capa puede ser: canelo (tonalidad café en cualquier intensidad), blanco (se permiten pecas en las patas debajo de la rodilla, en las orejas y en el hocico) y pinto (cualquier proporción de manchas café en base blanca o viceversa) y los ojos deben ser color café (Romualdo *et al.*, 2004). La Pelibuey es una raza mediana; su cabeza tiene orejas cortas, sin cuernos tanto hembras como machos. Su cara puede presentar un tono más claro en algunos casos, su nariz es triangular, la lengua puede ser de color rosado sin pigmentación; el cuello debe ser proporcional al tamaño del animal, tienen pecho amplio, espalda recta y piernas con buena masa muscular (Henríquez *et al.*, 2010; SAGARPA, 2013). Ostentan un alto porcentaje de hueso en la canal si es comparada con otras razas de lana de conformación cárnica (Romanov *et al.*, 1983).

Un estudio realizado por Arredondo *et al.* (2013) mostró que la raza Pelibuey presenta un claro dimorfismo sexual, todas las medidas corporales y el peso vivo son más grandes en machos que en las hembras. El peso promedio en machos se encuentra entre 55 y 60 kg, mientras que para las hembras va de 34 a 41 kg. (Vilaboa *et al.*, 2010). Se localizan especialmente, en zonas subtropicales y tropicales; pero actualmente también se encuentran en climas templados (INEGI, 2013).

Pelibuey es la raza más importante para la producción ovina en las zonas tropicales de México (Romualdo *et al.*, 2004). De esta manera, los ovinos de pelo constituyen una opción factible para las áreas tropicales, considerando el potencial productivo y económico que presentan.

3.2. Características reproductivas de la oveja

Las ovejas son poliéstricas estacionales, lo que significa que tienen una época determinada de actividad reproductiva durante el año (Scaramuzzi *et al.*, 1988; Viñoles, 2003), durante la cual presentan varios ciclos estrales; ésta se presenta durante los meses con fotoperiodo corto. Macedo y Alvarado (2005) mencionan que los ovinos de

pelo manifiestan fluctuaciones en el comportamiento reproductivo, existiendo una época durante la cual la fertilidad se reduce sin llegar a considerarse un periodo de anestro. Las razas originarias de latitudes con climas más fríos hacia el hemisferio norte o el sur, tienen una estación reproductiva muy corta y limitada sólo a los meses de otoño e invierno (León *et al.*, 2008), mientras que las razas originarias de latitudes cercanas al ecuador manifiestan una estacionalidad menos definida y es común que un porcentaje relativamente alto de animales presente ciclos estrales durante todo el año (SAGARPA, 2013). El fotoperiodo es el principal elemento ambiental que regula estos eventos (Arroyo, 2011). El fotoperiodo es el transcendental en la estacionalidad aunque pueden influir otros factores como la genética, las prácticas de manejo (alimentación principalmente) y las interacciones sociales (Henderson y Robinson, 2008).

Algunos autores indican que la restricción en la temporada de cría se puede atribuir principalmente al efecto del fotoperiodo, pero este puede estar confundido con otras variables como son la temperatura, la humedad y el manejo nutricional (Macedo y Alvarado, 2005). La estacionalidad reproductiva de la oveja Pelibuey es menos marcada por ser una raza originaria de latitudes tropicales (Trujillo-Quiroga *et al.*, 2007). La gestación tiene una duración de 147 días en promedio, con algunas variaciones entre raza.

3.3. Características y fisiología del ciclo ovárico

El ovario realiza dos funciones principales; la primera es la producción cíclica de óvulos y la segunda es la producción de hormonas esteroideas (Hafez y Hafez, 2000).

El ciclo estral es una secuencia de eventos endocrinos (Scaramuzzi *et al.*, 1993) regulados por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo, las hormonas luteinizante y estimulante del folículo (LH y FSH) producidas en la glándula pituitaria, el estradiol e inhibina que produce el folículo, la progesterona y oxitocina producidas por el cuerpo lúteo y la prostaglandina F2 α del útero (McNeilly *et al.* 1991;

Cortez-Romero *et al.*, 2011). En las ovejas el ciclo estral tiene una duración de 16 a 17 días (McKenzie y Terrill, 1937), el estro tiene una persistencia de 24 a 36 h (Quirke *et al.*, 1979). La ovulación ocurre espontáneamente al final del estro (Goodman e Inskeep, 2006) y tiene lugar aproximadamente entre las 24-27 h después del inicio del estro (Henderson y Robinson, 2008).

El ciclo estral se divide comúnmente en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro (Ball y Peters, 2004), pero en la oveja el ciclo se describe mejor en función de la actividad ovárica, la cual consiste en dos fases; lútea (desde el día 2 hasta el 13), incluye el metaestro y diestro y, folicular (desde el día 14 hasta el primer día), incluye el proestro y estro (Driancourt *et al.*, 1985; Inskeep, 2005).

3.3.1. Fase Lútea

La GnRH estimula la secreción de LH de la pituitaria anterior, lo que produce la ovulación y estimula la luteinización de los residuos foliculares (Goodman, 1994); el cuerpo lúteo (CL) se forma a partir de los restos del folículo (McNeilly *et al.*, 1991). El CL es la estructura dominante durante la mayor parte del ciclo estral. La fase lútea se mide desde la ovulación hasta la luteólisis (Inskeep, 2005). La concentración de estrógeno disminuye paulatinamente después del pico de LH, mientras que la concentración de progesterona (P4) muestra un comportamiento opuesto, aumenta 20 a 24 horas después del pico de LH (Hytel *et al.*, 1991; (Viñoles, 2003), esto previene la ovulación y permite el establecimiento de la gestación (McNeilly *et al.*, 1991).

La función principal de las altas concentraciones de progesterona durante la fase lútea es preparar el útero para la recepción del embrión que puede haber resultado de la fecundación del óvulo derramado en la ovulación (Ball y Peters, 2004), la máxima concentración de progesterona se observa entre los días 10-12 y se mantienen hasta luteólisis, alrededor de los días 14-15 (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Los niveles de progesterona que se presentan durante la fase lútea, suprimen el desarrollo folicular

(Adams, 1999; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005). Entre los días 4 y 6 de la fase lútea se observa un aumento gradual en las concentraciones de FSH que se correlaciona con la segunda oleada de desarrollo folicular (Bister y Paduay, 1983; Souza *et al.*, 1998).

La aparición de la PGF2 α precede el final de la fase folicular (Rubianes *et al.*, 2003), donde su función es la luteólisis del CL (Weems *et al.*, 2006). Si la oveja queda gestante se suprime la producción de PGF2 α , permaneciendo activo el CL (Evans, 1990). Después de la regresión lútea, inicia la fase folicular que es relativamente corta, de dos a cuatro días (Inskeep, 2005).

3.3.2. Fase folicular

El aumento de la PGF2 α induce la luteólisis, en consecuencia las concentraciones de progesterona disminuyen; esto marca el inicio de la fase folicular (Goodman, 1994). La disminución en los niveles de progesterona provoca un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH (Karsch *et al.*, 1980), el aumento de la frecuencia de pulsos de LH promueve la maduración del folículo dominante (Inskeep, 2005), a medida que crece también aumenta la secreción de estradiol (Evans y Fortune, 1997) e inhibina (Evans *et al.*, 2002).

Las gonadotropinas activan los sistemas enzimáticos de la aromatasa en las células de granulosa, debido a esto incrementa la producción de estradiol (McNeilly *et al.*, 1991). El máximo nivel de estrógenos en la sangre se alcanza precisamente antes de la manifestación del estro (Valasi *et al.*, 2007). Las inhibinas reducen la secreción de FSH (Hafez y Hafez, 2000), los niveles de inhibina alcanzan su máximo nivel en sangre durante la fase de crecimiento del folículo dominante y disminuyen cuando el folículo deja de crecer (Taya *et al.*, 1996). Al final de la fase folicular se presenta un incremento de LH en las concentraciones sanguíneas, después de esto ocurre la ovulación (Lopez-Alonso *et al.*, 2005), las concentraciones de estradiol disminuyen y se aprecia un

incremento secundario de FSH el día de la ovulación, con la finalidad de iniciar una nueva oleada folicular (Inskeep, 2005).

3.4. Desarrollo folicular

La foliculogénesis es el proceso por el que las células germinales de las hembras se desarrollan entre las células somáticas del ovario y maduran hasta convertirse en un óvulo fertilizable (Elvin y Matzuk, 2001; Hunter *et al.*, 2003), mediante una secuencia regulada de desarrollo que promueve el crecimiento del ovocito y la diferenciación de las células somáticas asociadas (Rajkovic *et al.*, 2006). Aún se desconocen algunos factores participantes en estos cambios, pero se sabe que influyen hormonas transmitidas por la sangre como la FSH y la insulina (Richards, 1994), así como varios factores autocrinos, paracrinos y endocrinos que están involucrados simultáneamente o en una sucesión específica durante el complejo proceso (Demeestere *et al.*, 2005).

El proceso de foliculogénesis inicia durante la vida embrionaria (Guigon y Magre, 2006), alrededor del día 75 de la gestación (Sawyer *et al.*, 2002), en el feto las células germinales primordiales migran del saco vitelino a los ovarios en desarrollo (Frandsen *et al.*, 2009; Ball y Peters, 2004), donde una sola capa de células rodea una célula germinal predestinada a convertirse en un óvulo (Lundy *et al.*, 1999). Al igual que la mayoría de las hembras de las especies domésticas, al nacer, las corderas cuentan con una reserva de ovocitos que han interrumpido su crecimiento (Driancourt *et al.*, 1993); estos conforman los folículos primordiales, cuyo número fluctúa entre 40,000 y 300,000 por oveja (Scaramuzzi *et al.*, 1993). La nutrición durante la vida fetal en ovejas puede influir en el número de folículos (Robinson *et al.*, 2002). Si no existen los factores necesarios para su maduración y ovulación dejan de crecer, en la pubertad, se establecen las condiciones hormonales y anatómicas necesarias para la ovulación regular (Ball y Peters, 2004). El desarrollo folicular en las ovejas se produce en un patrón en forma de oleadas (Souza *et al.*, 1997) reguladas por la progesterona y las gonadotropinas (Viñoles *et al.*, 2001). Se han descrito entre dos y cuatro oleadas

foliculares durante un ciclo estral en las ovejas (Smeaton y Robertson, 1971; Evans *et al.*, 2000). El número de oleadas en un ciclo parece estar influenciado por factores genéticos, nutricionales y por el medio ambiente (Fortune, 1993).

Las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) son necesarias para el crecimiento folicular, la maduración y la esteroidogénesis (Mahdi y Khallili, 2008). Algunos análisis hormonales indican que cada onda folicular es antecedida por un incremento temporal de las concentraciones de (FSH) en sangre, por lo que se concluye que la (FSH) está relacionada con el diámetro folicular (Souza *et al.*, 1997; Bartlewski *et al.*, 2000). Aunque se conoce que el crecimiento del folículo primordial y las primeras etapas de la foliculogénesis puede ocurrir sin hormona folículo estimulante (FSH) (Webb *et al.*, 2004; Inskeep, 2005), se sabe que existen receptores de hormona folículo estimulante (FSH) en las células de la granulosa de los folículos primarios (Tisdall *et al.*, 1995), pero se desconoce su función.

La duración de la foliculogénesis desde folículo primordial a la ovulación en las ovejas, es aproximadamente de 6 meses (Cahill y Mauleon, 1980; Cahill, 1981; Campbell *et al.*, 2003b; Hunter *et al.*, 2004), pero el estímulo que provoca la entrada en la fase de crecimiento de los folículos primordiales es incierto (Dufour *et al.*, 1979). Se sabe poco de las señales que inician el crecimiento y aún menos de cómo se regula este proceso (Fortune *et al.*, 2004). Más del 99 % folículos primordiales se pierden por atresia, un proceso que es poco conocido, pero que es esencial para reducir el número ovulaciones (Baird y Campbell, 1998). Actualmente la fisiología del folículo primordial se está investigando intensamente debido al poco conocimiento de los mecanismos de activación.

Scaramuzzi *et al.* (1993) presentaron un modelo para el crecimiento del folículo en base a su dependencia y sensibilidad a las gonadotropinas en ovinos; que consta de cinco tipos de folículos, los cuales son: primordial, folículos comprometidos, folículos sensibles a gonadotropinas, folículos dependientes de gonadotropinas y folículos ovulatorios (Figura 1).

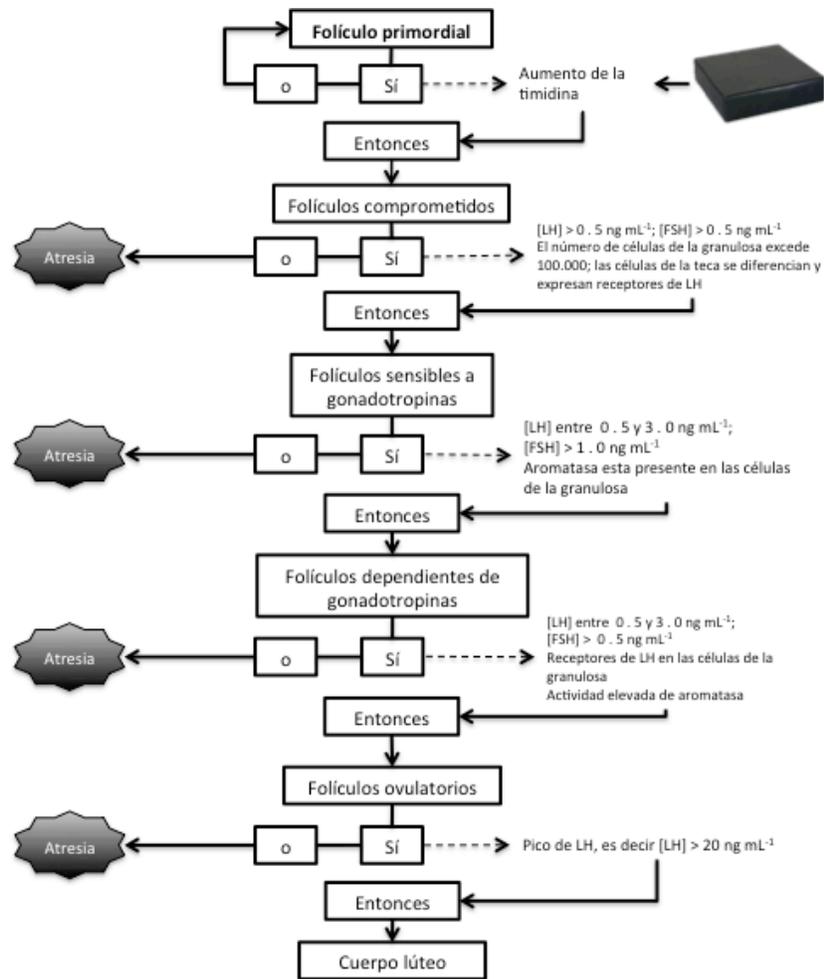


Figura 1. Modelo para el crecimiento folicular en la oveja basado en la dependencia y la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas. Modificado de Scaramuzzi *et al.* (1993).

La primera etapa de crecimiento se presenta desde la fase de folículo primordial hasta la fase de folículo preantral (Driancourt *et al.*, 1987), presentando proliferación celular y el apareamiento de receptores para la hormona folículo estimulante (FSH) en la granulosa y hormona luteinizante (LH) en la teca (Uribe-Velasquez *et al.*, 2009).

Goodman y Hodgen (1983) plantearon los términos de reclutamiento, selección y dominancia para detallar el desarrollo de los folículos antrales. Las gonadotropinas son de suma importancia en el control del reclutamiento, la selección y la dominancia (Driancourt, 1991).

3.4.1. Reclutamiento

La formación del antro anuncia las fases finales de la foliculogénesis y la transición de regulación intraovárica a extraovárica. Sólo una pequeña fracción del número total de oocitos en el ovario es ovulado en los mamíferos (Baird y Campbell, 1998). Se denomina reclutamiento al crecimiento simultáneo de un conjunto de folículos al inicio de una oleada folicular (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009), aunque se sabe que no todos los folículos reclutados son similares en tamaño (Hsu *et al.*, 1987). El reclutamiento origina un conjunto de folículos de los que se selecciona uno o más folículos pre-ovulatorios, mientras que otros sufren atresia (Hunter *et al.*, 2004).

Algunos estudios del desarrollo folicular han demostrado que la FSH es necesaria para el reclutamiento y crecimiento de los folículos (Adams *et al.*, 1992). La FSH es la hormona clave en la inducción del reclutamiento folicular (Haresign, 1985; Couzinet *et al.*, 1988); cada oleada folicular inicia por un pequeño aumento de FSH en la circulación (Picton *et al.*, 1990). Guthrie y Tornillo (1990) sugieren que las alteraciones en la relación FSH:LH son críticas en el proceso de reclutamiento.

Solamente los folículos mayores de 2 mm son idóneos para ser reclutados (Driancourt, 2001). Algunos experimentos en ovejas han demostrado que los folículos se vuelven dependientes a las gonadotropinas cuando miden entre 2-3 mm (Campbell *et al.*, 1995). Por otra parte, los folículos que miden 0.8 - 2 mm de diámetro son sensibles a las gonadotropinas y se activan cuando se inyectan gonadotropinas (Driancourt *et al.*, 1993). El reclutamiento se origina de forma similar durante la fase folicular temprana y la fase lútea temprana, mientras que los patrones de pulsatilidad de LH en estas dos etapas difieren (Driancourt *et al.*, 1985; Driancourt *et al.*, 1988).

3.4.2. Selección

La selección folicular es la fase mediante la que se reduce el número de folículos desarrollados en una oleada (Uribe-Velasquez *et al.*, 2009), la fase de selección

conduce a la diferenciación de un folículo terciario capacitado para ovular. El desarrollo de los folículos antrales de 2 a 4 mm en las ovejas es completamente dependiente de las gonadotropinas (Webb *et al.*, 2004). Durante esta fase, las células de la granulosa comienzan a expresar receptores para LH (Webb *et al.*, 2003); en la etapa de folículo secundario, su número y sensibilidad va incrementando desde que emergen en los folículos de 2.5 – 3.5 mm en ovejas (McNeilly *et al.* 1986; Campbell *et al.*, 2003).

En ovejas, se han descrito dos etapas para determinar el proceso de selección (Driancourt, 1991). La primera etapa, denominada: pasiva, ocurre cuando el folículo dominante aumenta las concentraciones de estrógenos e inhibina (Souza *et al.*, 1997); esto ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis y como consecuencia, disminuye progresivamente la secreción de FSH (Baird y Campbell, 1998; Souza *et al.*, 1998), hasta que las concentraciones plasmáticas descienden para alcanzar un nivel menor que al umbral necesario para el mantenimiento de otros folículos dependientes de gonadotropinas (Martin *et al.* 1988). En la etapa activa el folículo seleccionado suprime directamente el crecimiento de otros folículos mediante la secreción paracrina de una sustancia desconocida en la sangre (Driancourt, 1991).

En la selección de un folículo son fundamentales algunos cambios en el factor de crecimiento insulínico (IGF) intrafolicular para un mayor crecimiento (Fortune *et al.*, 2004). Al final de la selección folicular emerge un folículo dominante con un diámetro de 6 mm reservado para ovular (Uribe-Velasquez *et al.*, 2009).

3.4.3. Dominancia

El proceso final de la maduración resulta en una serie de cambios endocrinos y morfológicos (Quirk y Fortune, 1986; Hyttel *et al.*, 1991). Una vez seleccionado, el folículo ovulatorio se convierte en dominante y progresa hasta la ovulación, mientras que los folículos subordinados experimentan atresia (Hunter *et al.*, 2004); éste proceso se debe a que después de la selección, el folículo dominante adquiere receptores para

la LH y se convierte en dependiente de LH (Mihm y Evans, 2008). Los pulsos frecuentes de LH son necesarios para el desarrollo del folículo dominante más allá de aproximadamente 5 mm en ovejas (Inskeep, 2005).

El número de células de la granulosa en el folículo ovulatorio es abundante (Scaramuzzi *et al.*, 1993), lo que provoca la secreción de grandes cantidades de estradiol e inhibina en la vena de ovario; esto impide el crecimiento de los folículos dependientes de las gonadotropinas (Baird, 1983). Driancourt *et al.* (1991) menciona que posiblemente la dominancia folicular no se presenta en las ovejas. La razón es que la diferencia de tamaño entre el folículo dominante y el folículo subordinado más grande no es significativa (Driancourt, 2001).

Es importante destacar que, el folículo ovulatorio no puede ser identificado, basados en el diámetro más grande hasta 2 días antes del estro (Bherer *et al.*, 1977), después de la luteólisis la dominancia se vuelve evidente (González-Bulnes *et al.*, 2004). En la siguiente figura 2 se muestra un esquema del desarrollo folicular en ovejas.

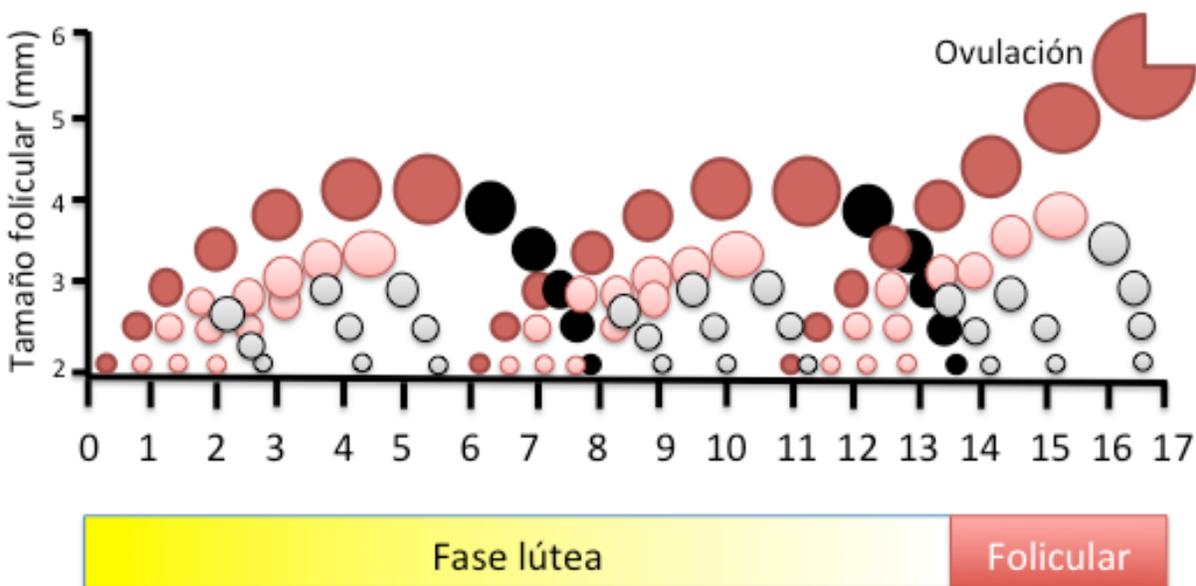


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo folicular durante el ciclo estral de la oveja. Modificado de Simonetti (2008).

3.5. Sincronización del ciclo estral

El desarrollo de tratamientos de sincronización de celo en ovejas, durante la década de 1960 facilitó el uso de biotecnologías, las cuales permiten agrupar el trabajo en pocos días (Menchaca *et al.*, 2004). La mayoría de las razas ovinas tienen actividad reproductiva en función de los cambios de estación, la longitud del fotoperiodo y otros factores como la latitud y longitud en la que se encuentran (Dogan y Nur, 2006). El ciclo reproductivo se relaciona con diversos fenómenos tales como: la pubertad, la madurez sexual, la estación reproductiva, el ciclo estral y la actividad sexual postparto (Hafez *et al.*, 2000).

Se han desarrollado múltiples métodos para conseguir sincronizar eficazmente el ciclo estral (Stellflug *et al.*, 1994; Fierro *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2014). La sincronización del ciclo estral se logra mediante el uso de tratamientos hormonales (Abecia *et al.*, 2011); estos tratamientos, permiten inducir y sincronizar el momento de la aparición del estro y de la ovulación (Martemucci y D'Alessandro, 2011).

Los métodos más usados son: la aplicación de progestágenos exógenos (Boscos *et al.*, 2002; Davis y Stevenson, 2005) o la aplicación de PGF2 α para inducir la lisis del CL, después de esto comenzará una fase folicular inducida y por lo tanto, las hembras ovulan (Olivera-Muzante *et al.*, 2011; Fierro *et al.*, 2013). Aunque los protocolos basados en progestágenos, son los preferidos por los productores pecuarios para manejar la reproducción de los rebaños (Gordon, 1999).

3.5.1. Progestágenos

La progesterona es un esteroide secretado por el cuerpo lúteo, y la placenta (Baril *et al.*, 1995) en las ovejas tiene dos funciones importantes (Inskeep, 2005); controlar la liberación de GnRH (Uribe-Velásquez *et al.*, 2008; Gómez-Brunet *et al.*, 2012) y su función principal; mantener la gestación, interviene en la preparación del endometrio

para la implantación del embrión y además, inhibe la movilidad del miometrio para mantener la gestación (Meikle *et al.*, 2001; Sosa *et al.*, 2008).

Los tratamientos con progestágenos se utilizan en las ovejas para inducir y sincronizar el estro (Baril *et al.*, 1993; Viñoles *et al.*, 2001; Zeleke *et al.*, 2005; Karaca *et al.*, 2009). Algunos estudios recientes se han centrado en la duración de los tratamientos de sincronización estral a base de progestágenos (Jackson *et al.*, 2014). Se han utilizado dispositivos intravaginales que contienen diferentes tipos de progestágenos, mantenidos por periodos de 5-14 días (Viñoles *et al.*, 2001; Zeleke *et al.*, 2005; Ustuner *et al.*, 2007;;; Karacaa *et al.*, 2009) adicionados con o sin PMSG (Mutigal y Mukasa-Mugerwa, 1992) o Prostaglandina F2 α (PGF2 α) (Letelier *et al.*, 2011).

El principio básico de este tipo de tratamientos es la simulación de la fase lútea (Abecia *et al.*, 2012). El uso de progestágenos puede estar relacionado con alteraciones en el crecimiento de los folículos (González-Bulnes *et al.*, 2005).

3.5.2. Prostaglandina F2 α

Un método alternativo para el control de la reproducción en ovinos es la inducción de la luteólisis, al eliminar el cuerpo lúteo se induce la entrada de fase folicular (Abecia *et al.*, 2012). La prostaglandina F2 α y sus análogos sintéticos, han sido ampliamente estudiados como agentes luteolíticos desde su descubrimiento en 1970 (McCracken *et al.*, 1970; Rosado *et al.*, 1998). La PGF2 α es una buena alternativa, debido a que no se acumula en los tejidos, es metabolizada por los pulmones (Davis *et al.*, 1980; Contreras-Solís *et al.*, 2009); esto ayuda debido a que los consumidores de carne en el mundo comienzan a exigir productos que sean "limpios, verdes y éticos" (Martin *et al.*, 2004). Aunque el uso de la PGF2 α está limitado a la época reproductiva (Letelier *et al.*, 2011; Fierro *et al.*, 2013).

Los tratamientos de PGF2 α se aplican fácilmente por inyección intramuscular y se metabolizan rápidamente (Letelier *et al.*, 2011). El tratamiento convencional, consiste en la aplicación de dos dosis con un intervalo de 9 a 12 días (Gordon, 1983). La introducción de los productos comerciales de PGF2 α trascendió hasta su uso en los protocolos de superovulación (Elsden *et al.*, 1974), se ha utilizado para la inducción de la luteólisis en los protocolos de superestimulación ovárica (Monniaux *et al.*, 1983). Se ha asociado el uso de prostaglandinas con trastornos en la dinámica folicular e inconsistencia en la presentación del estro después del tratamiento (Barret *et al.*, 2002).

3.6. La superovulación u ovulación múltiple en ovinos

La superovulación es necesaria en programas de transferencia de embriones para acelerar la propagación de animales con alto valor genético para algún rasgo deseable (Abd-Allah *et al.*, 2013). El tratamiento con gonadotropinas, ya sea hormona folículo estimulante (FSH) o gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) provoca el desarrollo de varios folículos, posteriormente la ovulación y consecuentemente la formación de cuerpos lúteos (Grazul-Bilska *et al.*, 2007).

El objetivo de los tratamientos de superovulación en las ovejas es la obtención de un máximo número de embriones transferibles, con una alta probabilidad de producir gestaciones (Armstrong, 1993). Los protocolos de superovulación permiten utilizar las ovejas a su máximo potencial y tomar ventaja de la gestación relativamente corta (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2004).

3.6.1. Antecedentes de superovulación

Las primeras descripciones de superovulación fueron registradas por Smith y Engle en 1927, quienes utilizaron preparados crudos de pituitaria anterior para inducir un incremento en la tasa de ovulación de ratones y ratas (Gordon, 2005). En 1930, Cole y Hart (1930) descubrieron que si inyectaban suero de yeguas gestantes en animales de laboratorio, se estimulaba el crecimiento ovárico. El componente activo de este suero

fue nombrado gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG). Consecuentemente se estudiaron las hormonas de la pituitaria y el efecto superovulatorio que tenían (León *et al.*, 2008); no obstante, la superovulación se extendió hace casi 55 años y se ha aplicado en la investigación ovina y su producción (Gordon, 2005).

Los protocolos de superovulación han evolucionado mucho en los últimos 40 a 50 años (Bó y Mapletoft, 2014) En los últimos 35 años, los investigadores han utilizado distintas hormonas tales como la gonadotropina coriónica equina (eCG), la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la inmunización contra inhibina y hormona folículo estimulante equina (eFSH) para inducir la superovulación (Roser y Meyers-Brown, 2012). Purses y Graham (1962) realizaron investigación en ovejas en anestro en un intento de obtener información referente al efecto de aplicar diferentes niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) en la incidencia del estro y la ovulación.

En la década de los 70's se estableció en E.E.U.U. una industria de transferencia de embriones en ganado; casi 80 años después de la primera transferencia de embriones con éxito en un mamífero (Wilmot y Rowson, 1973). En la última década se han adoptado una serie de tecnologías nuevas en la industria de la transferencia de embriones (TE) aunque el procedimiento básico de superovulación ha tenido pocas mejoras en los últimos 20 años (Hasler, 2003).

3.6.2. Selección y manejo de la hembra donante

El éxito de los programas de transferencia de embriones depende de la selección que se realice de la que será la hembra donante, se tiene que tener en cuenta las características físicas y fisiológicas de la oveja (Duica *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008). El principal elemento en el que se debe basar la selección de una hembra donante es el valor genético, de acuerdo con las aptitudes zootécnicas que se requieren de la raza en cuestión (Baril *et al.*, 1995), además de su facultad para dar embriones de buena calidad (Leyva *et al.*, 1999). En general, se debe disponer de un buen historial

reproductivo de una donante antes de incluirla en un programa de superovulación (Alberio, 2001).

León *et al.* (2008) sugieren elegir las hembras donadoras en función de su calidad genética, condición corporal, edad e historial clínico. Mientras que Seidel y Seidel (1991) mencionan dos criterios generales para la selección de una donante; el primero, debe ser la superioridad genética que favorezca los objetivos planteados y el segundo, una alta probabilidad de producir embriones transferibles. Las ovejas con función ovárica anormal son difíciles de superovular, porque regularmente no tienen un cuerpo lúteo (CL) funcional (Bó *et al.*, 2014). Es de sentido común elegir donantes cuyas crías se puedan vender con un beneficio mayor a los gastos de la transferencia de embriones (Seidel y Seidel, 1991). Hasler *et al.* (1987) sugiere que las hembras jóvenes parecen producir embriones de mejor calidad con respecto a las multíparas.

No se recomienda elegir hembras gordas como donantes, porque no responden bien a los tratamientos de superovulación y debido a que sus tractos reproductivos son más difíciles de manipular (Seidel y Seidel, 1991).

3.6.3. Hormonas usadas en la superovulación: FSH y eCG.

Se han utilizado tres tipos diferentes de gonadotropinas para inducir la superovulación; a partir de extractos de pituitarias porcinas u otros animales domésticos se utiliza la hormona folículo estimulante (FSH), otras hormonas utilizadas son la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Murphy *et al.*, 1984).

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

La hormona folículo estimulante (FSH) es una glicoproteína heterodimérica que consiste en una subunidad "A" y una "B"; es producida en los gonadotropos en la

glándula pituitaria anterior (Hesser *et al.*, 2011). La subunidad “A” está constituida por 92 aminoácidos y es similar a otras hormonas glicoproteicas en la misma especie, mientras que la subunidad “B” confiere la especificidad para la unión con el receptor y por lo tanto, es distinta entre las hormonas glucoproteicas (Pierce y Parsons, 1981). Adicionalmente se acoplan cuatro cadenas de carbohidratos con un contenido variable de ácido siálico (Haisenleder *et al.*, 1994). Su función biológica es estimular el desarrollo folicular en los estadios preovulatorios, incrementando la síntesis de proteínas en las células de la teca interna principalmente (Leyva *et al.*, 1999). Además, estimula la actividad mitótica en folículos pre antrales y reduce la atresia de los folículos antrales (Moor *et al.*, 1984).

La hormona folículo estimulante (FSH) es la hormona más utilizada en los protocolos de superovulación, puede ser de origen porcino, bovino u ovino. Esta hormona tiene una vida media corta, y por consiguiente requiere de varias aplicaciones para lograr su efecto (Guibault *et al.*, 1991). Debido a su contenido estructural de ácido siálico la vida media biológica de la FSH ha sido valuada en 4 a 5 horas o menos por lo que debe inyectarse dos veces al día para inducir la superovulación con éxito (Monniaux *et al.*, 1983; Demoustier *et al.*, 1988). Se ha relacionado la vida media de los extractos hipofisarios ovinos a aspectos como la edad, estado fisiológico y sexo del animal (Moore *et al.*, 2000). La hormona folículo estimulante (FSH) se manifiesta en isoformas, evidentemente no es una hormona de estructura molecular simple y por esta razón los productos comerciales suelen ser de potencial variable (Phillips *et al.*, 1993) debido a esto la hormona folículo estimulante (FSH) ha sido mucho más difícil de medir que la hormona luteinizante (LH) en ovinos, aunque actualmente hay un acuerdo considerable en relación a las características generales de su liberación a lo largo del ciclo estral (Goodman & Inskeep, 2006).

Las investigaciones sugieren que la calidad de los embriones puede ser mejor si se usa (FSH) pura, aunque la necesidad de (FSH) y (LH) en diferentes momentos durante los

protocolos de superovulación ha sido objeto de debate en los últimos años (Bó and Mapletoft, 2014).

Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)

La gonadotropina coriónica equina (eCG) fue descubierta hace más de 80 años, como un factor que se encuentra en la sangre de la yegua preñada, durante el primer tercio de la gestación (Murphy, 2012). Es una gonadotropina del grupo de las glicoproteínas con actividad tanto de FSH como de LH (Murphy y Martinuk, 1991; Saint-Dizier *et al.*, 2004). Es secretada naturalmente por las copas endometriales de la yegua entre los días 40 y 120 de la gestación (Allen y Morr, 1972).

Existen numerosas aplicaciones para la gonadotropina coriónica equina (eCG) en las especies domésticas, entre ellas están la inducción de la pubertad, superovulación y más recientemente la mejora de la fertilidad (Murphy, 2012). La eCG posee una vida media aproximada de 21 h, debido al contenido de ácido siálico en su estructura (McIntosh *et al.*, 1975); esto provoca una estimulación ovárica continua, folículos anovulatorios, perfiles endocrinos anormales y baja calidad embrionaria (Moor *et al.*, 1984; Bó y Mapletoft, 2014). Además, la actividad biológica prolongada de eCG puede afectar negativamente el desarrollo embrionario temprano, lo que requiere el uso de una inyección de anticuerpos anti-eCG para reducir su actividad (Boland *et al.*, 1991).

Los estudios endocrinológicos han mostrado que los animales tratados con eCG a mayor frecuencia presentan perfiles anormales de LH y progesterona (Greve *et al.*, 1983); esto se asocia con una disminución en las tasas de ovulación y fertilización a diferencia de los animales tratados con FSH (Callesen *et al.*, 1986; Blanco *et al.*, 2003). La eCG podría representar una alternativa de superovulación, sobre todo en lugares donde el manejo de los animales no es fácil y se dificulta realizar un protocolo que requiera varias inyecciones como el necesario para la FSH (Jiménez, 2009).

3.7. Factores que intervienen en la superovulación

La respuesta a los protocolos de estimulación ovárica es afectada por factores intrínsecos y extrínsecos (Torrès *et al.*, 1987), entre los que se encuentran: la raza, la edad e historial reproductivo de las hembras donantes; el producto hormonal a utilizar, el protocolo, el clima, la nutrición, el uso de otras hormonas en los protocolos de superovulación y otros factores de manejo pueden influir en el resultado (Mapletoft *et al.*, 2002; Hasler, 2014). Los factores asociados con la administración gonadotropinas exógenas que afectan de respuesta superovulatoria incluyen la fuente de donde provienen, el lote de fabricación y la actividad biológica de la gonadotropina (Murphy *et al.*, 1984). En cuanto a la raza, hay información acerca de que algunas razas no producen embriones tan resistentes como otras razas (Steel y Hasler, 2004).

Factores tales como la temporada del año, el manejo, el estado del ovario al momento del tratamiento y el número de superovulaciones realizadas en el animal pueden afectar la respuesta superovulatoria de una manera directa o indirecta (Mapletoft *et al.*, 2002). Se sabe que el semen tiene un efecto muy importante sobre el número de embriones obtenidos, por lo tanto, también se debe considerar el momento de la inseminación (Jiménez, 2009). La administración de FSH exógena no sólo podría inducir el crecimiento de folículos sanos, sino también aquellos que ya han sido objeto de atresia, lo que resulta en la fertilización de ovocitos viejos y posteriormente, embriones de baja calidad (Bó *et al.*, 1991). Los investigadores han tratado de disminuir esta variabilidad, pero no se han logrado muchos avances en los últimos años (Jiménez, 2009).

Una opción factible para mejorar la respuesta en los protocolos de superovulación, es conocer la dinámica folicular y empezar los tratamientos en el momento de inicio de una oleada folicular (Garzón *et al.*, 2007).

3.8. Métodos de recolecta de embriones

La colecta de embriones en ovejas, generalmente se realiza al séptimo día posterior al estro (Lima-Verde *et al.*, 2003); es necesario disponer de un método de recuperación de embriones que maximice y garantice la tasa de recuperación en los programas de transferencia de embriones para pequeños rumiantes (Ramon-Ugalde *et al.*, 2008), existen métodos de colecta quirúrgicos y no quirúrgicos (Azawi, 2011) para este fin.

3.8.1. Método quirúrgico, laparotomía media ventral

Consiste en anestesiarse la borrega, después se realiza una incisión sobre la línea media delante de la ubre para exteriorizar los cuernos uterinos. Se realiza una punción en la base del cuerno, por donde se introduce una sonda Foley en el lumen. Posteriormente, se realiza una segunda punción cerca de la unión útero-túbarica por donde se introduce un catéter que servirá para inyectar el medio de lavado; el líquido que contiene los embriones se recupera por el otro extremo mediante la sonda. Se realiza el mismo procedimiento para el otro cuerno uterino. Al final, se procede a suturar y se recomienda aplicar tratamiento antibiótico por tres días. Es el procedimiento más usado en pequeños rumiantes, debido a su eficiencia (Baril *et al.*, 1995).

3.8.2. Métodos no quirúrgicos

Laparoscopía

Esta técnica fue desarrollada en ovejas por McKelvey *et al.* (1986) requiere un especialista y más cara, ya que se requiere un laparoscopio. Consiste en realizar tres punciones con trocares en la pared abdominal, en una se introduce el laparoscopio, en otra se introduce una sonda de tres vías (entrada, salida e insuflación). En la tercera punción se introduce una pinza no traumática para manipular el tracto reproductivo durante la colecta (Nellenschulte y Niemann, 1992).

La tasa de recuperación de embriones de este método es menos al 60%, pero con este método se reduce la aparición de adherencias, lo que facilita la recuperación de embriones en tratamientos posteriores (Gibbons y Cueto, 2011).

Transcervical

Esta recuperación de embriones se realiza entre el día 6 y 7 después del estro. La técnica consiste en anestesiar previamente a las borregas por vía epidural. Posteriormente, se introduce un especulo en la vagina, con unas pinzas Allis No. 20 se sujeta y exterioriza el labio externo del cuello del útero. Luego, con la ayuda de una guía se introduce un catéter de lavado por el cuello del útero hasta llegar al útero, se saca la guía y se infunden en el útero 20 mL de medio de lavado a 37 °C. Este proceso se repite 25 veces, cada infusión de 20 mL efluente del útero, se pasa por un filtro de (0.22 µm) (Lima-Verde *et al.*, 2003).

La morfología del cuello uterino de las ovejas hace que este método sea realmente difícil de usar e implica el uso de un tratamiento hormonal adicional (Kershaw *et al.*, 2005).

3.9. Métodos de evaluación embrionaria

Los métodos de evaluación, pueden ser invasivos o no invasivos y se pueden aplicar en diferentes etapas de desarrollo (Montag *et al.*, 2013). La evaluación de la calidad del embrión es uno de los factores más importantes, que determinan el éxito de una transferencia de embriones (TE) (Rondeau *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2007).

3.9.1. Métodos invasivos

Los procedimientos invasivos requieren la extirpación de una o varias células del ovocito o el embrión para su posterior análisis (Montag *et al.*, 2013).

Análisis genéticos preimplantación (AGP)

Los primeros procedimientos fueron realizados en 1989 en un grupo de individuos con riesgo de transmitir a su descendencia una afección ligada al sexo (Handyside *et al.*, 1990). Los análisis genéticos más usados son del código genético de los cuerpos polares, blastómeros y células del trofoblasto (Montag *et al.*, 2013). Actualmente se aplican para detectar embriones con alteraciones genéticas (Ajduk y Zernicka-Goetz, 2013).

Hibridación fluorescente *in situ*

La biopsia del embrión seguida por un análisis de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) puede identificar embriones cromosómicamente anormales y por lo tanto, menos viables (Taylor y Tachataki, 2002). El FISH es un método que permite el análisis cromosómico de la mayoría de las células de un embrión; los cromosomas marcados se hibridan con sondas que emiten fluorescencia y permiten la visualización, distinción y estudio de los cromosomas, así como de las anomalías que puedan presentar (Viuff *et al.*, 2002).

Transcriptómica

El uso de perfiles de transcriptómicos en la evaluación de la calidad embrionaria se encuentra en su fase inicial. Consiste en analizar el contenido de ARNm celular que refleja el fenotipo de una célula de una mejor manera que el análisis de su genoma. El ARN es más propenso a la degradación que el ADN, y por lo tanto, se tiene que extraer rápidamente y en condiciones estériles. El análisis transcriptómico es un procedimiento costoso, por lo que su uso se vuelve difícil (Ajduk y Zernicka-Goetz, 2013; Kakourou *et al.*, 2013).

El aspecto más crítico de estudios invasivos es el impacto potencial de la biopsia y la manipulación en el desarrollo embrionario posterior, recientemente (Montag *et al.*, 2013).

3.9.2. Métodos no invasivos

Las pruebas de laboratorio no invasivas para evaluar la calidad embrionaria son los nuevos métodos más importantes. Consisten en gran medida, en la detección de enzimas, metabolitos, proteínas, productos de genes y otros rasgos (Bukowska *et al.*, 2012).

Respirometría

La nanorespirometría es una tecnología no invasiva y altamente sensible desarrollada para la medición de tasas de respiración embrionarias (Lopes *et al.*, 2005). Esta tecnología es capaz de realizar mediciones en las diferentes etapas de desarrollo embrionario. Existen 4 perfiles de respiración: a) caídas abruptas o graduales para los embriones que no se desarrollan más allá de dos células, b) tasa de respiración estable (0.3-0.4 nL/h) para los embriones que no se desarrollan más allá de las etapas tempranas de escisión, c) pequeño aumento en la tasa, para embriones de mala calidad y d) un marcado aumento en la tasa de respiración, para los blastocistos de buena calidad (Overstrom, 1996; Lopes *et al.*, 2007).

La evaluación visual de la morfología embrionaria es el método no invasivo más popular de la selección de embriones (Ajduk y Zernicka-Goetz, 2013).

Metabolómica

Otro factor que se debe tener en cuenta para evaluar la calidad embrionaria es el metabolismo embrionario (Montag *et al.*, 2013). Se puede realizar de diferentes

maneras, hay técnicas basadas en la evaluación de cambios en la composición de un medio de cultivo, específicamente la absorción o liberación de compuestos, tales como sustratos de energía, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Donnay, 2002) y otras técnicas basadas en el uso de sustratos o colorantes fluorescentes (Butler y Biggers, 1989). Un ejemplo de estas técnicas es el uso de pirúvato, que se considera un sustrato importante de energía para las células embrionarias (Gardner *et al.*, 2001). Se sabe que al reaccionar con peróxido de hidrogeno, protege al embrión del estrés oxidativo (Leese, 2012).

Las principales desventajas son la falta de automatización y la incapacidad para medir vías metabólicas específicas, su aplicabilidad clínica es complicada actualmente, debido a la complejidad técnica y la necesidad de equipos adecuados (Sturmey *et al.*, 2010).

Evaluación embrionaria por su morfología

La manera más sencilla para evaluar un embrión antes de su transferencia es apreciar su morfología, pero también es la forma más subjetiva (Merton, 2002). Las ventajas de este método son que es rápido, no es caro y no requiere la manipulación excesiva de los embriones (Angela *et al.*, 2006).

Los embriones obtenidos durante la colecta, son morfológicamente diversos (Alikani *et al.*, 2002). La necesidad de evaluar la calidad de los embriones de animales domésticos está relacionada con la capacidad que puedan tener para originar gestaciones después de la transferencia de embriones (Bukowska *et al.*, 2012).

Los parámetros aplicados para evaluar la calidad del embrión comprenden: la forma, el color, el número y compactación de las células, el tamaño del espacio perivitelino, número de células extruidas, degeneradas (Lindner y Wright, 1983). Otros factores importantes a tener en cuenta son: el daño y la fisura de la zona pelúcida (ZP), tamaño,

así como el contenido de gránulos y otros restos celulares en el espacio perivitelino (Bukowska *et al.*, 2012). La ZP es una capa extracelular que consiste en un par de glicoproteínas que rodean el embrión de los mamíferos entre las etapas de cigoto y el estadio de blastocisto (Van Soom *et al.*, 2003) y la ZP protege al embrión de la entrada de patógenos (Vanroose *et al.*, 2000).

Lindner y Wright, (1983) propusieron un sistema útil y práctico para evaluar embriones bovinos el día 7 después del estro, a continuación se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de embriones en base a sus características morfológicas.

Clase	Características
Excelentes (I)	Son redondos, los blastómeros tienen el mismo tamaño, color y consistencia.
Buenos (II)	Los embriones son un poco irregulares, y alguno de los blastómeros puede presentar o no forma irregular.
Regular (III)	Blastómeros extruidos y algunas células degeneradas.
Malo (IV)	Blastómeros sueltos, células dañadas y de distintos tamaños, también se observan cambios de color
Embriones degenerados (V)	Solo se aprecian restos celulares indefinidos y blastómeros degenerados.

Propuesta por Lindner y Wright (1983).

Esta división difiere ligeramente de los criterios aceptados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) que divide a los embriones en cuatro códigos (1 – 4) que se exponen a continuación (Cuadro 2; Stringfellow y Givens, 2010).

Cuadro 2. Categorías para la clasificación de embriones propuestas por la IETS.

Código	Características
1. Excelente o bueno	Masa del embrión simétrica y esférica con blastómeros individuales, las células están uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades debe ser relativamente menores y al menos el 85 % del material celular debe estar intacto. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener superficies cóncavas o planas que puedan causar que el embrión se adhiera a una placa de Petri o una pajilla.
2. Regular	Estos embriones tienen irregularidades moderadas en cuanto a su forma general o en tamaño, color, y la densidad de las células individuales. Al menos el 50 % de las células embrionarias deben estar intactas. Estos embriones son transferibles, pero no congelables.
3. Malo	Estos embriones tienen importantes irregularidades en la forma del embrión o en tamaño, color, y la densidad de las células. Al menos el 25 % de las células deben estar intactas. Estos embriones no sobreviven el procedimiento de congelación y descongelación.
4. Muerto o degenerado	Estos podrían ser embriones, ovocitos o embriones de 1 célula. No son viables y deben desecharse.

Los criterios descritos en el manual de la IETS ayudan a mantener un sistema uniforme de clasificación, que se utiliza a nivel internacional.

3.10. Clasificación de los embriones por su estado de desarrollo

Después de la fertilización, el cigoto se somete a varias divisiones durante los primeros días de desarrollo, dependiendo de la especie, entre los días 4-5 después de la fecundación, el embrión empieza a compactar (Merton, 2002).

El proceso de compactación en los embriones de oveja comienza en el día 3 después de la fertilización (Watson *et al.*, 1992). La contracción de los blastómeros deriva en un embrión más denso, con un espacio perivitelino más grande (Van Soom *et al.*, 1997). Este proceso origina el nombre de mórula y genera la aparición de células internas y externas, requisito para la formación del blastocele (Smith y McLaren, 1977), que ocurre entre el día 4-5 en ovejas (Watson *et al.*, 1992).

La etapa de desarrollo originada por la formación del blastocele se denomina blastocisto temprano. En la etapa de Blastocisto temprano, se pueden distinguir dos tipos de blastómeros (Merton, 2002), cuando el blastocele ocupa más del 50 % del embrión, se clasifica como blastocisto (Bó y Mapletoft, 2013); cuando la presión osmótica del blastocele incrementa, el diámetro del embrión aumenta; esto provoca que la zona pelúcida se estire y se vuelva más delgada (Rohen y Lütjen-Drecoll, 2007). Esta etapa embrionaria es conocida como blastocisto expandido. Posteriormente la zona pelúcida se rompe y el embrión eclosiona (Sadler, 2009) (Figura 3).

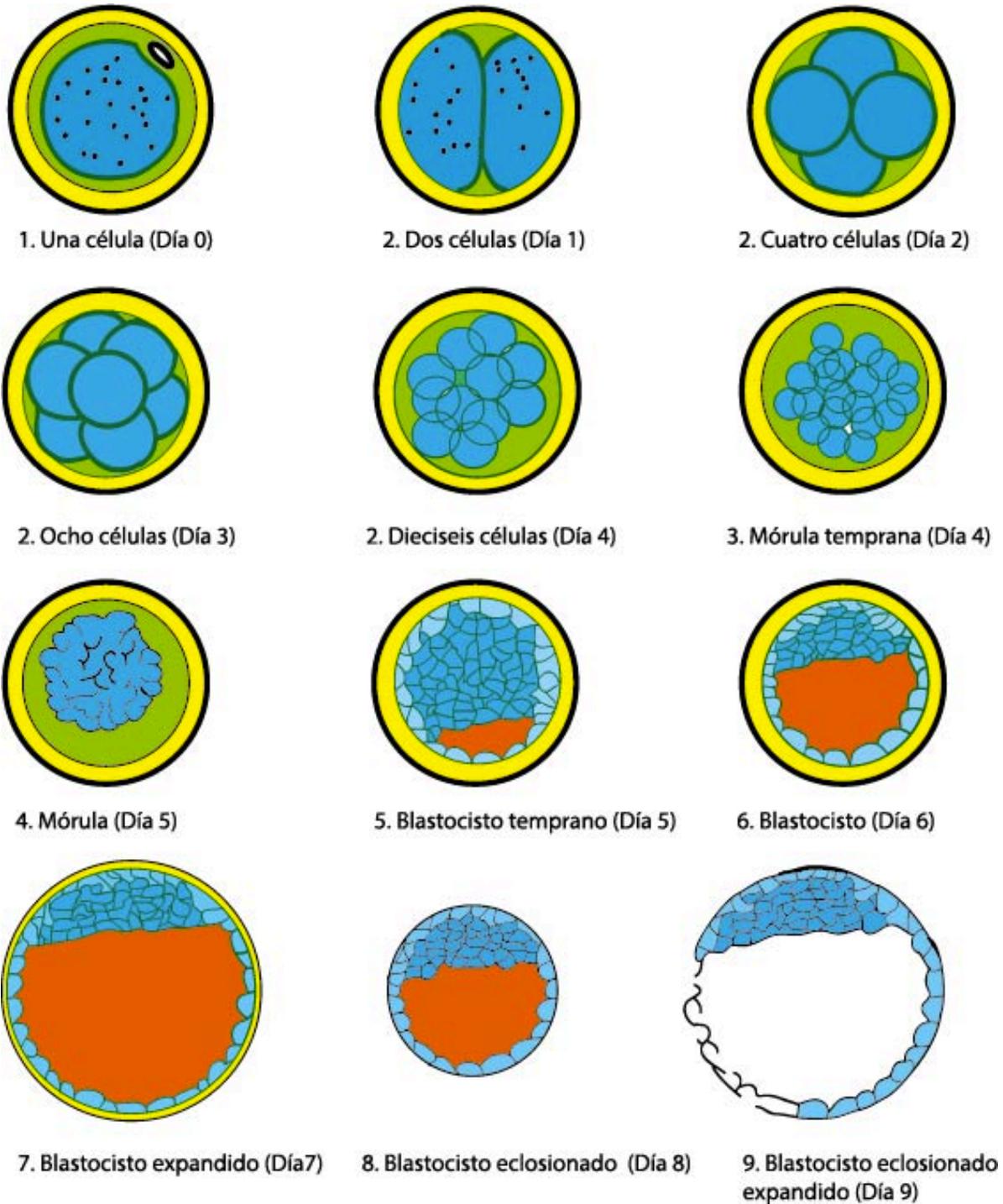


Figura 3. Representación de la cronología del desarrollo embrionario en la oveja (días post celo). Modificado de Stringfellow y Givens (2010).

La IETS emplea códigos desde 1 hasta 9 para las etapas de desarrollo que pueden presentarse en el momento de la colecta de embriones (Stringfellow y Givens, 2010). Es importante conocer las características de cada etapa de desarrollo, como se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Características de los diferentes estadios de desarrollo embrionario encontrados al momento de recolectar embriones en ovejas entre los días 6 y 7.

Etapa	Características normales
1. Ovocito no fertilizado	Forma esférica, núcleo redondeado y una zona pelúcida bien definida. Se puede observar un cuerpo polar
2. 2 - 16 células	Al inicio solo son visibles dos pronúcleos. Hay espacio perivitelino entre la zona pelúcida (ZP) y la membrana plasmática. Generalmente se observan 2 cuerpos polares en el espacio perivitelino. Posteriormente el tamaño de los blastómeros disminuye; el espacio perivitelino aún es grande.
3. Mórula temprana	Es difícil distinguir blastómeros individuales. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
4. Mórula	Los blastómeros se unen y forman una aglomeración compacta, esta aglomeración ocupa entre el 60 al 70 % del espacio perivitelino.
5. Blastocisto temprano	El embrión ocupa entre el 70 al 80% del espacio perivitelino, es posible que se pueda diferenciar el trofoblasto y la masa celular interna. Se forma una cavidad llena de fluido (blastocelo).
6. Blastocisto	Se observa una diferenciación entre la capa exterior y el trofoblasto, además de una masa celular interna más compacta y oscura. El blastocelo es más predominante
7. Blastocisto expandido	El diámetro total del embrión aumenta (1.2 a 1.5X) se observa un adelgazamiento de la zona pelúcida de aproximadamente 1/3 de su volumen original.
8. Blastocisto eclosionado	Los blastocistos comienzan a salir de su zona pelúcida. Son redondos y pueden tener un blastocelo bien definido o colapsado.
9. Blastocisto eclosionado expandido	La mayoría de los blastocistos han perdido su zona pelúcida y se aprecia un aumento de tamaño.

Fuente: Linder y Wrigth (1983), Winterberger-Torres y Sevellec (1987).

3.11. Ecografía

3.11.1. Principio de la ecografía

La ecografía es una técnica de imagen no invasiva, fiable y sin efectos secundarios (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2010). El funcionamiento en el que se basan los ultrasonidos (sonidos de alta frecuencia) son los principios físicos del sonido (Duran, 2011). El sonido es una onda viajera de presión; las ondas sonoras consisten en compresiones y dispersiones alternativas de las moléculas del medio por el que viajan (Walker, 2012). Igual que cualquier onda, el sonido posee unas longitudes, períodos y frecuencias de onda específicas (Aldrich, 2007). Este tipo de ondas no se transmiten en el vacío, por lo tanto precisan de un medio para difundirse (Quintela *et al.*, 2006). El medio de transmisión proporciona la velocidad de difusión del sonido (Lutz, 2006), esta velocidad depende de la dureza del tejido (Walker, 2012).

La transformación de electricidad en sonido frecuentemente se concreta mediante bocinas y el proceso inverso se crea mediante el uso de micrófonos; en la ecografía para esto se utiliza la piezoelectricidad (Walker, 2012). La piezoelectricidad es la propiedad que presentan algunos cristales, para polarizarse eléctricamente cuando se les aplica una tensión compresiva o extensiva (Chacón *et al.*, 2012). Los elementos piezoeléctricos transforman la electricidad en un pulso de onda sonora y el eco producido por ésta onda vuelve a convertirse en energía eléctrica, este es el principio base de los transductores ecográficos (Lutz, 2006).

El sonido viaja lentamente en los gases, aumenta su velocidad en los tejidos corporales y los líquidos y su velocidad es alta en los huesos (Mannion, 2006), por lo que se verá una señal muy intensa en la pantalla del ultrasonido. En ecografía se utiliza el término ecoico para denominar las estructuras que se ven de color blanco en la pantalla (Quintela *et al.*, 2006) y se denomina anecoico a las estructuras que se ven de color negro (Vargas *et al.*, 2008).

3.11.2. Uso del ultrasonido en la producción animal

Antes de la introducción de imágenes ecográficas en tiempo real, la investigación de reproducción animal y morfología de los órganos reproductivos se realizaba por palpación transrectal o en cirugía (Griffin y Ginther, 1992). Las primeras aplicaciones de ultrasonografía en los animales se relacionaron con estudios médicos (Temple *et al.*, 1956). Para asegurarse de que el ultrasonido no tenía efectos perjudiciales en los tejidos, se realizaron trabajos en testículos de conejo (Hahn y Foote, 1968). El uso de ultrasonidos resultó eficiente para determinar la condición corporal (grasa subcutánea y musculatura) en animales (Stouffer, 2004).

La ecografía se introdujo en la reproducción animal para evaluar la gestación en yeguas (Palmer y Driancourt, 1980) y en ovejas los primeros usos de la ecografía consistieron en determinar una gestación; esto es importante por razones económicas (Buckrell, 1988; Ganaiea *et al.*, 2009). La ultrasonografía se adoptó rápidamente como una técnica clínica usual para observar las estructuras fisiológicas y patológicas del tracto genital en las especies domésticas (Kähn *et al.*, 1992) aunque el uso de las imágenes ecográficas *in situ*, con computadoras portátiles y un software preciso, se introdujo hasta a principios de 1990 (Stouffer, 2004).

El ultrasonido ha impactado en la investigación de la reproducción animal y ha contribuido a los avances en nuestro conocimiento de la función uterina, así como el desarrollo embrionario y fetal (Kähn *et al.*, 1992; Bidinost *et al.*, 1999). Además, ha aportado un significativo avance en los conocimientos sobre la fisiología ovárica y uno de sus aspectos más importantes, la dinámica folicular (Uribe-Velasquez *et al.*, 2010). Para comprender y evaluar la dinámica folicular, se ha empleado la ecografía (Pierson y Ginther, 1987), alternada diariamente durante 18 días para evaluar la dinámica folicular (Noel *et al.*, 1993; Schrick *et al.*, 1993; Ravindra *et al.*, 1994). El uso de técnicas de imagen facilita la recolección de esta información (González- Bulnes *et al.*, 2010).

La forma menos estresante para la exploración ovárica en ovinos es vía rectal, colocando el animal de pie y usando un transductor lineal, al que se le coloca un adaptador rígido que permita manipular la sonda en el recto (Cortez-Romero *et al.*, 2011).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización

El estudio se realizó durante los meses de noviembre y diciembre de 2012 en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, ubicado en la Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, congregación Manuel León, municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz. La localización geográfica es: 18° 51' 20" N y 96° 51' 37" O, a una altura de 720 msnm. El clima es templado con una temperatura promedio de 18 °C, y precipitación promedio anual de 1807.3 mm (INAFED, 2013)

4.2. Animales

Se utilizaron 24 ovejas de la raza Pelibuey de 1.7 ± 0.24 años de edad, con peso vivo promedio 39.1 ± 1.77 kg y con condición corporal (CC) promedio de 2.8 ± 0.16 en escala 1-5, (1 = flaco; 5 = obeso) de acuerdo con Russel *et al.* (1969), en temporada reproductiva. Durante el experimento, las ovejas se mantuvieron en corrales con sombra, piso de cemento, comederos y bebederos. Quince días antes de iniciar el experimento, se les aplicó antiparasitario vitaminado (PARMISOLE ADE+B®) vía intramuscular, de acuerdo a la recomendación del laboratorio para la especie. Los machos se mantuvieron en corrales separados, con las mismas condiciones de alojamiento que las ovejas y se les dio el mismo manejo general que a las hembras antes de iniciar el experimento.

4.3. Alimentación

Durante el experimento, las ovejas se pastorearon diariamente en praderas de *Cynodon dactylon* durante 7-8 h d⁻¹, y en su corral se les proporcionó 300 g oveja⁻¹ de suplemento, a base de maíz, pasta de soya, salvado y minerales con 16.9 % de PC y 2.95 Mcal de EM kg⁻¹. Se les proporcionó agua limpia todo el tiempo. Los machos

estuvieron alojados en los corrales todo el tiempo, su alimentación fue a base de caña picada, además de una ración de 300 g animal⁻¹ d⁻¹ del mismo suplemento que se dio a las hembras.

4.4. Tratamientos

Se tuvieron cuatro grupos (n=6) con tratamiento diferente para la sincronización de estros, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en las 24 ovejas. En el caso de los tratamientos 1 y 2, se continuó hasta la superovulación (Figura 4).

Tratamiento 1 (T1; n= 6). El día cero se aplicó un dispositivo vía vaginal (CIDR®) con 0.3 g de progesterona. El sexto día se comenzó a aplicar el Folltropin®-V (FSH) dos veces por día (7:00 y 19:00), con dosis decrecientes (40µg /40µg, 30µg /30µg, 20µg /20µg y 10µg /10µg), sumando un total de 200µg; la primera dosis se aplicó 72 h antes del retiro del CIDR y la última dosis 12 h después de remover el CIDR. Al séptimo día se les aplicó una dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF2α; 5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®) y al noveno día se retiró el CIDR.

Tratamiento 2 (T2; n= 6) El día cero se aplicó un dispositivo vía vaginal (CIDR®) con 0.3 g de progesterona. El sexto día se comenzó a aplicar Pluset® (pFSH:pLH) dos veces por día (7:00 y 19:00), con dosis decrecientes (60UI / 60UI, 35UI / 35UI, 20UI / 20UI y 10UI /10UI), aplicando un total de 250 UI; la primera dosis se aplicó 72 h antes del retiro del CIDR y la última dosis se aplicó 12 h después de remover el CIDR. Al séptimo día se les aplicó una dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF2α; 5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®) y al noveno día se retiró el CIDR.

Tratamiento 3 (T3; n=6): El día cero se aplicó un dispositivo vía vaginal (CIDR®) con 0.3 g de progesterona. Al séptimo día se aplicó una dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF2α; 5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®) y al noveno día se retiró el CIDR.

Tratamiento 4 (T4; n=6): Para obtener datos de un ciclo natural; el día cero se aplicó el (CIDR®) con 0.3 g de progesterona. Al séptimo día se aplicó una dosis de un análogo de prostaglandina F2 alfa (PGF2α; 5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®). Al noveno día se retiró el CIDR. Este esquema se realizó 18 días antes a los tratamientos anteriores, con el propósito de coincidir el retorno a estro de las ovejas en este tratamiento con el estro de T1, T2 y T3 (Figura 4).

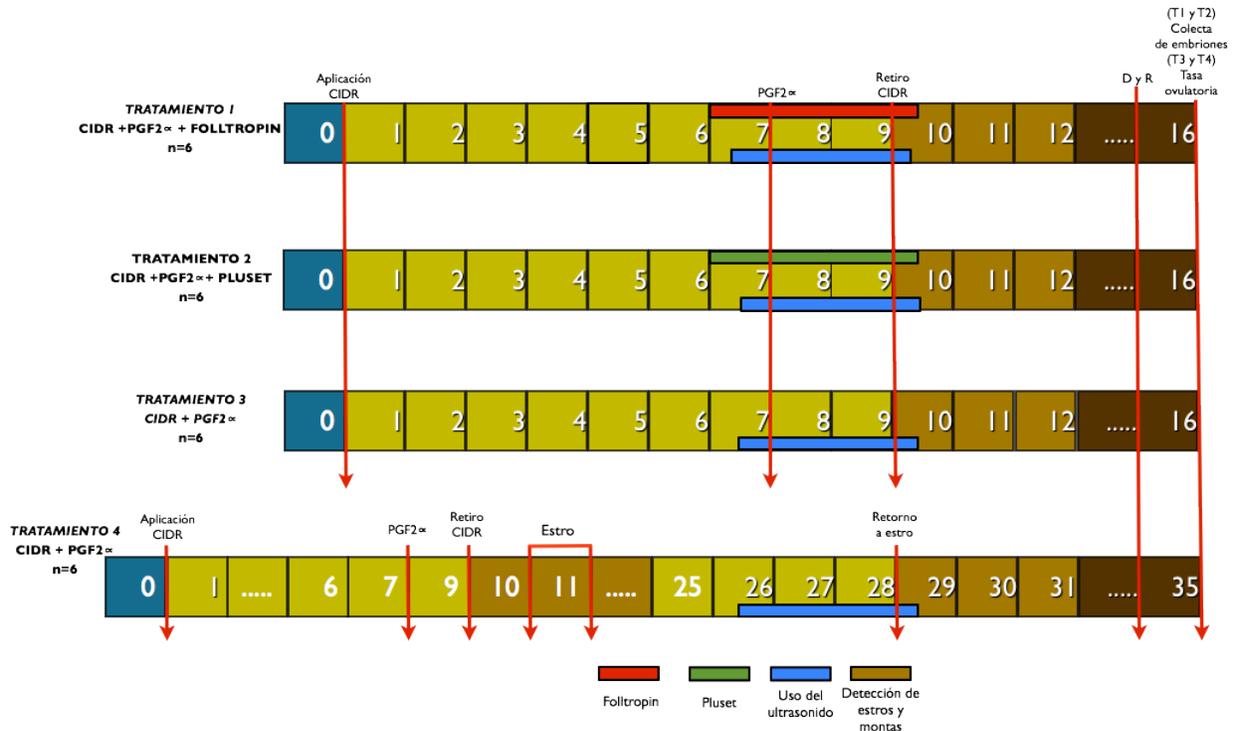


Figura 4. Esquema de tratamientos utilizados para sincronizar el estro o superovular las ovejas Pelibuey en época reproductiva.

4.5. Manejo de las hembras

4.5.1. Desarrollo folicular

Mediante ultrasonografía transrectal se determinó el tamaño de los folículos, con una sonda 7.0 MHz a la cual se colocó una guía para mejor manipulación (Universal medical systems, Inc. UMS 900). Para este procedimiento, se colocó a las ovejas de pie, se evacuó el recto y se aplicó gel lubricante en la zona. Los folículos se clasificaron

de acuerdo a su diámetro en pequeños (2-3 mm), medianos (4-5 mm) y grandes (≥ 6 mm; Evans *et al.*, 2000; González-Bulnes *et al.*, 2000). Los folículos se midieron después de congelar la imagen en el ultrasonido y se registraron (Evans *et al.*, 2000). Las observaciones se realizaron dos veces al día, con intervalos de 12 h entre cada una de ellas; la primera fue 60 h antes del retiro de los CIDR's en T1, T2 y T3, y para T4 60 h antes del retorno a estro.

4.5.2. Detección de estro y monta natural

Las ovejas se consideraron en estro cuando permitían la monta del macho. En T1, T2 y T3 se monitoreó el estro a partir de las cuatro horas después del retiro de los CIDR, durante 30 min cada 4 h durante un periodo de 72 h. Las ovejas que mostraron estro fueron inseminadas por monta natural inmediatamente que el semental las detectó en estro, y una segunda monta se realizó a las 12 horas después. Se registró el tiempo al inicio del estro. Para el T4 se detectó el inicio del estro de la misma manera que en T1, T2 y T3, solo que utilizando sementales equipados con un mandil para evitar la cópula, cuando las hembras manifestaron estro, se registró el tiempo y se esperó 17 días para el retorno a estro; una vez detectado el inicio del estro, se les dio monta. Se registró el número de ovejas con manifestaciones externas de estro, después del retiro de los CIDR para T1, T2 y T3. En el caso de T4 se registró el número de ovejas con manifestaciones externas de estro a los 17 días del estro inducido.

4.5.3 Tasa ovulatoria

Se midió la tasa ovulatoria (TO) al sexto día post monta, mediante el conteo de cuerpos lúteos (CL) presentes en la superficie de los ovarios. En T1 y T2, la respuesta ovulatoria se determinó antes de iniciar la recuperación de los embriones mediante el conteo de los cuerpos lúteos, por laparotomía. Mientras que para T3 y T4 se determinó por observación vía laparoscópica con un laparoscopio (KARLSTORZ). Para todos los tratamientos, se registró el número de CL y folículos grandes (FG).

4.5.4. Procedimiento laparoscópico

Antes del procedimiento laparoscópico en los tratamientos T3 y T4, se restringió el alimento y agua a las hembras durante 24 h con el fin de reducir el contenido del rumen y evitar bronco aspiración. Los instrumentos utilizados para la laparoscopia se sumergieron en una solución antiséptica (cloruro de benzalconio al 1%, ANTIBENZIL®).

Se colocó a la oveja en una camilla en posición decúbito dorsal en un ángulo de 45° con la cabeza hacia abajo, la parte ventral del abdomen se rasuró. Posteriormente, se lavó con jabón quirúrgico (SURGITANE®) y se desinfectó con una solución de yodo (DERMODINE®). Una vez desinfectada el área quirúrgica, se procedió a inyectar 3 mL de anestésico local (Pisacaina® 2% Vet, Laboratorios PiSA®) vía subcutánea, aproximadamente de 3 a 5 cm de la parte anterior de la ubre, y de 6 a 7 cm a cada lado de la línea media.

Se introdujo un trocar del lado izquierdo de la línea media, la cavidad abdominal se insufló e introdujo el laparoscopio; posteriormente se realizó una segunda punción en el lado derecho para introducir el manipulador y registrar la respuesta ovárica. Una vez realizado el procedimiento, se retiró el laparoscopio y se aplicó Furazolidona en aerosol (Topazone®, Laboratorios PiSA) en las perforaciones para promover la cicatrización. Al final, se aplicó 1 mL de tetraciclina (Emicina LA®, Laboratorios Pfizer) por cada 10 kg de peso vivo vía intramuscular.

4.6. Recolección de embriones

La colecta se realizó el día 6.5 posterior a la monta mediante laparotomía media ventral de 5-7 cm en las ovejas que tuvieron respuesta superovulatoria (> 2 CL) de acuerdo con Naqvi *et al.* (2000), iniciando con la primera oveja que presentó estro y así sucesivamente, hasta concluir con la última oveja. Antes de la colecta, a las ovejas de los tratamientos T1 y T2 se les restringió el alimento y agua durante 24 h con el fin de reducir el contenido del rumen y evitar la bronco aspiración durante la cirugía.

Se aplicó una combinación de ketamina (Anesket®, Laboratorios PiSA) y xilacina (Procin®, Laboratorios PiSA) en relación 1:1, vía intravenosa (I.V.). Consecutivamente se colocó las ovejas en posición decúbito esternal, con la cabeza y cuello extendidos hacia arriba; se procedió a intubar las ovejas usando una sonda endotraqueal conectada a un tubo con suministro de óxido nítrico. Posteriormente, se colocó la oveja en una camilla en posición decúbito dorsal en un ángulo de 45° con la cabeza hacia abajo, la parte ventral del abdomen se rasuró, se lavó con jabón quirúrgico (SURGITANE®) y se desinfectó con una solución de Yodo (DERMODINE®). Se colocaron los campos quirúrgicos y se procedió a incidir en la línea media ventral para exponer el útero y los ovarios. Se procedió con el registro del número de ovulaciones recientes, determinadas con los cuerpos lúteos y también se registró el número de (FG).

Los embriones se colectaron mediante el lavado de los cuernos uterinos por separado en forma gravitacional y de manera intermitente, utilizando un medio de lavado (Vigro Complete Flush Solution, Laboratorios BIONICHE®) a razón de 40 mL por cuerno uterino a 37 °C. Esto consistió en realizar una punción en la unión útero-tubárica para insertar un catéter intravenoso (Punzocat® de 32 mm) en el lumen del cuerno uterino (1 cm), luego se realizó una segunda punción a nivel del ligamento intercornual para introducir una sonda Foley con calibre de 10 fr. Consecutivamente, se conectó la parte distal de la sonda a un tubo recolector; se comenzó a inyectar lentamente el medio de lavado por el catéter intravenoso, dando masajes suaves al cuerno uterino. Esto produce una corriente que desemboca en el tubo colector, el mismo procedimiento se realizó en el otro cuerno uterino. Al concluir el lavado, el tubo colector con el líquido recuperado se colocó a baño María para mantener las estructuras colectadas hasta su evaluación a 37 °C. Enseguida, el tracto genital se introdujo en la cavidad abdominal para realizar la sutura de los planos quirúrgicos utilizando Catgut® crómico de 1 cero para peritoneo y músculo, y una sutura de Nylon de 1 ceros en piel. Al término de las suturas, se aplicó un tratamiento antimicrobiano de penicilinas (Shotapen® L.A.) para prevenir infecciones postoperatorias, un analgésico (Bio-dipirona) (1-Fenil-2,3-dimetil-5-

pirazolona-4-metilaminometanosulfonato de sodio) y una dosis de un análogo de prostaglandina F2 alfa (PFG2α) (5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®) para causar la lisis de los CL existentes y evitar una posible gestación.

4.7. Búsqueda de embriones y clasificación de estructuras recolectadas.

El contenido del tubo colector se vertió en cajas de Petri cuadrículadas y estériles, se examinó bajo un microscopio estereoscópico (Barnstead, USA) a 10X de aumento. Se efectuaron dos búsquedas por cada caja de Petri para asegurar que no quedaran embriones. La forma de búsqueda se ilustra a continuación (Figura 5).

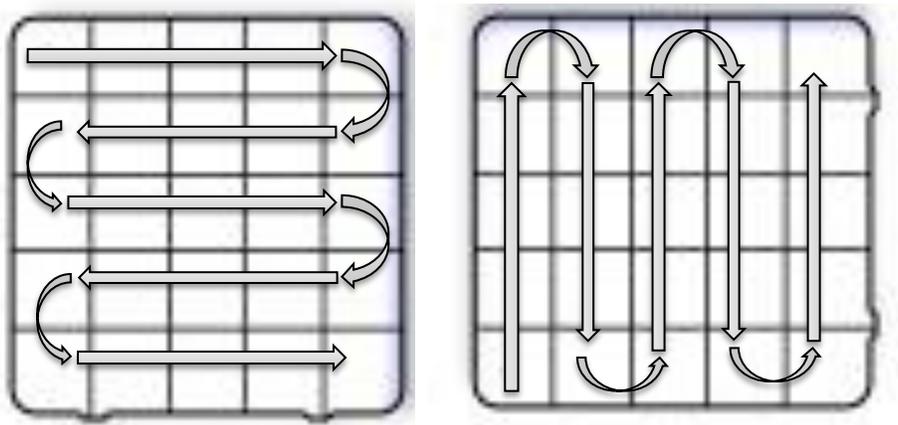


Figura 5. Esquema representativo de la búsqueda embrionaria en las cajas Petri cuadrículadas.

Una vez identificada cada estructura embrionaria, se procedió a su aislamiento en una caja de 4 pozos previamente preparada con 200 μ L de medio de mantenimiento (Holding, Laboratorios BIONICHE) por pozo a temperatura de 37 °C, mantenida en una platina térmica a resguardo de la luz. Se registró el número de ovocitos y embriones presentes y al finalizar la búsqueda se procedió a clasificar los embriones.

Los embriones recuperados de hembras superovuladas a menudo muestran una amplia gama de etapas de desarrollo celular Linder y Wright (1983). Los embriones

fueron evaluados y clasificados de acuerdo a su aspecto morfológico en categorías: I (excelente) II (regular) III (malo) IV (muerto / degenerado) u ovocito sin fertilizar, de acuerdo con los criterios de la Sociedad de Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). La evaluación de los embriones se realizó con un aumento de 40X.

4.8. Variables respuesta

Desarrollo folicular: Número de folículos pequeños, medianos y grandes presentes en la superficie del ovario de las ovejas, detectados mediante ultrasonografía.

Manifestación de estros (%): Número de ovejas que manifestaron signos de estro, detectadas por el semental, con respecto al número total de ovejas de cada tratamiento.

Inicio del estro (h): Horas al inicio del estro de las ovejas, después de retirado el dispositivo de progesterona. La distribución se determinó con el número de ovejas que entraron en estro en determinado intervalo de tiempo.

Tasa ovulatoria: Número de cuerpos lúteos totales presentes en la superficie de los ovarios de las ovejas experimentales, 6 días después de la monta natural.

Folículos grandes no ovulados (FGNO): Número de folículos ≥ 6 mm presentes en la superficie del ovario, 6 días después de la monta natural.

Respuesta ovárica total: Número de cuerpos lúteos sumado al número de folículos grandes presentes en la superficie del ovario al momento de la laparoscopia o laparotomía.

Ovocitos no fertilizados (ONF): Número de ovocitos (Ovo) recuperados en las ovejas durante la colecta de embriones.

Embriones calidad 1 (EC1): Número de embriones colectados en estadios de mórula (M) y Blastocisto (B) de calidad 1.

Embriones transferibles (ET): Número de embriones colectados en estadios de mórula (M) y Blastocisto (B) de calidad 1 y 2.

Embriones degenerados (ED): Número de embriones colectados, con defectos estructuras degeneradas.

Estructuras recolectadas: Número total de estructuras recolectadas en las ovejas experimentales superovuladas, independientemente de su clasificación morfológica y de desarrollo.

Tasa de recuperación: se calculó dividiendo el número de embriones recolectados entre el número de CL presentes.

4.9. Modelo y análisis estadístico

El modelo estadístico usado para un diseño experimental completamente al azar (DCA)

fue: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \xi_{ij}$

Donde:

Y_{ij} = El valor de la variable respuesta

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i

ξ_{ij} = error experimental

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS (Versión 9.3, Institute Inc., Cary, NC, USA).

La variable manifestación de estros, se analizó mediante el modelo de regresión

logística utilizando el procedimiento Logistic. La variable inicio al estro se analizó con el método de curvas de sobrevivencia Log-Rank mediante el procedimiento Life Test, la prueba de comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$).

La variable correspondiente al número de folículos pequeños, medianos y grandes se analizó utilizando un modelo completamente al azar con el procedimiento de modelos lineales general (PROC GLM) del paquete estadístico. Se realizó la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$) para medias de los tratamientos.

Las variables de conteo, como tasa ovulatoria, respuesta ovárica y estructuras colectadas. Se analizaron con una regresión binomial negativa, mediante el procedimiento (GENMOD) del paquete estadístico SAS.

5. RESULTADOS

5.1 Desarrollo folicular

Al analizar el número de folículos pequeños (2-3 mm) se encontró que fue igual ($p>0.05$) en los cuatro tratamientos durante las siete observaciones realizadas con el ultrasonido.

Se encontraron diferencias ($p<0.05$) en los folículos medianos (4-5 mm). En la observación realizada 60 h antes de retirar el CIDR, las ovejas en estro natural manifestaron un mayor número de folículos medianos (2 ± 0.52^a) que el resto de los tratamientos. Mientras que en las observaciones que se realizaron 36, 24 y 12 h antes de retirar el CIDR, en las ovejas tratadas del T3 (P4+PGF2 α) mostraron tener menos folículos medianos (1.83 ± 0.60^b) (2 ± 0.77^b) y (2 ± 0.52^b), respectivamente, que los otros tratamientos (T1, T2 y T4; $p<0.05$). En las observaciones subsecuentes, no se encontraron diferencias significativas, aunque se observa una tendencia a tener más folículos medianos entre las ovejas tratadas con T1 (P4 + FSH + PGF2 α) y T2 (P4 FSH:LH + PGF2 α).

En los folículos grandes (≥ 6 mm) no se encontraron diferencias ($p>0.05$) durante las primeras cuatro observaciones (60, 48, 36 y 24 h) antes del retiro del CIDR; pero a partir de las 12 h antes de retirar el CIDR, se encontraron diferencias en las ovejas tratadas con T1 (P4 + FSH + PGF2 α), las cuales manifestaron un mayor número de folículos grandes (2.33 ± 0.56^a) que los otros tres tratamientos (T2, T3 y T4). Las ovejas tratadas con T3 (P4 + PGF2 α) presentaron el menor número de folículos grandes (0.67 ± 0.21^b) durante esta observación. En la observación realizada al momento de retirar el CIDR, las ovejas tratadas con T1 (P4 + FSH + PGF2 α) y T2 (P4 FSH:LH + PGF2 α) tuvieron un mayor número de folículos grandes (2.66 ± 0.21^a ; 2.83 ± 0.31^a , respectivamente) que las ovejas tratadas con T3 (P4 + PGF2 α ; 0.83 ± 0.17^b) y T4 (estro natural; 1 ± 0^b). En la observación realizada 12 h después de retirar el CIDR se mantuvo la misma tendencia, los tratamientos T1 (P4 + FSH + PGF2 α) y T2 (P4

FSH:LH + PGF2 α) presentaron más folículos grandes (3.17 ± 0.33^a ; 2.5 ± 0.22^a , respectivamente) que los tratamientos T3 (P4 + PGF2 α ; 0.83 ± 0.17^b) y T4 (estrogeno natural; 1 ± 0^b). En el anexo 1 se encuentra la tabla con los promedios \pm E.E. de todas las observaciones. A continuación, en la Figura 6 se muestran las gráficas de comportamiento del desarrollo folicular.

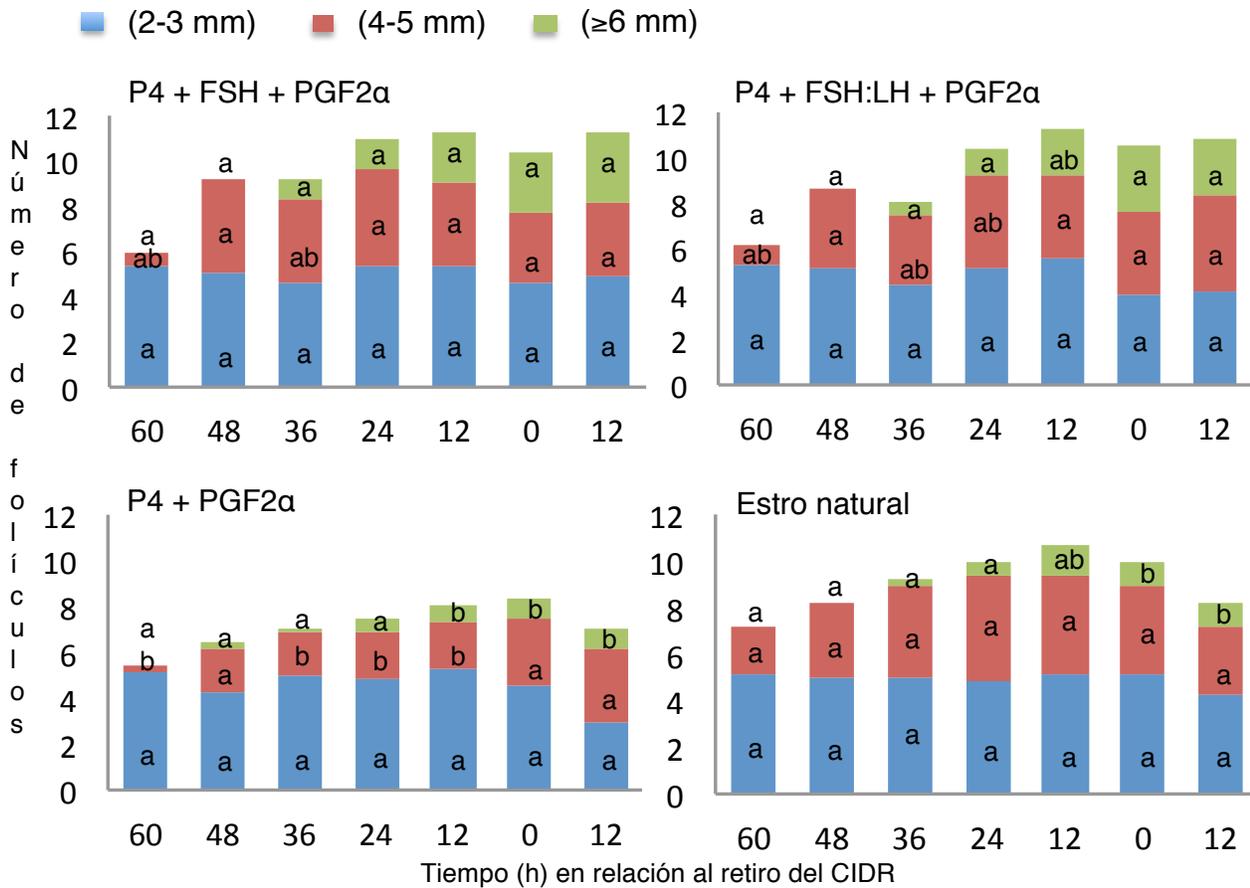


Figura 6. Promedio de folículos pequeños (2-3 mm) medianos (4-5 mm) y grandes (≥ 6 mm) en ovejas Pelibuey tratadas con T1: P4 + FSH + PGF2 α , T2: P4 FSH:LH + PGF2 α , T3: P4+PGF2 α y T4: estrogeno natural. Promedios con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$) con respecto al mismo tamaño de folículos en la observación correspondiente.

5.2 Manifestación de estro

En esta variable, no se observaron diferencias ($p>0.05$) en la manifestación de estro en ovejas Pelibuey, en el Cuadro 4 se muestran los resultados. En las ovejas de los tratamientos T1 (P4 + NIH-FSH-p1 + PGF2 α) y T2 (P4 + FSHp-LHp + PGF2 α), una oveja no manifestó estro, respectivamente; mientras tanto, dos ovejas y todas de los tratamientos T3 (P4 + PGF2 α) y T4 (estro natural) manifestaron estro, respectivamente.

Cuadro 4. Manifestación de estro (%) por tratamiento en ovejas Pelibuey.

Tratamiento	Número de ovejas que manifestaron estro	Porcentaje de estro
T1	5	83.3 ^a
T2	5	83.3 ^a
T3	4	67 ^a
T4	6	100 ^a

Literal diferente dentro de cada columna indica diferencia significativa ($p<0.05$). T1: P4+FSH+PGF2 α ; T2: P4+FSH:LH+PGF2 α ; T3: P4+PGF2 α ; T4: estro natural.

5.3 Inicio del estro

Se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) en el inicio del estro, las ovejas de T1 manifestaron estro más rápido que las ovejas de T2. Las últimas ovejas en iniciar el estro fueron las de T3. En T4 (estro natural) no se registraron datos, debido a que no hay punto de referencia (retiro del CIDR[®]) como en los otros tratamientos. Los datos obtenidos se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tiempo de inicio al estro (Media \pm error estándar) de ovejas Pelibuey con diferentes tratamientos para la sincronización o superovulación.

Tratamiento	Tiempo (horas)
T1	16.8 \pm 3.41 ^a
T2	22.3 \pm 3.05 ^b
T3	33.5 \pm 3.90 ^c
T4	N.O.

Literal diferente dentro de cada columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$). T1: P4+FSH+PGF2 α ; T2: P4+FSH:LH+PGF2 α ; T3: P4+PGF2 α ; T4: estro natural. N.O.= No observada.

En la figura 7 se muestran las curvas de supervivencia para inicio de estro de ovejas tratadas con T1 (P4 + FSH + PGF2 α), T2 (P4 +FSH:LH + PGF2 α) y T3 (P4 + PGF2 α).

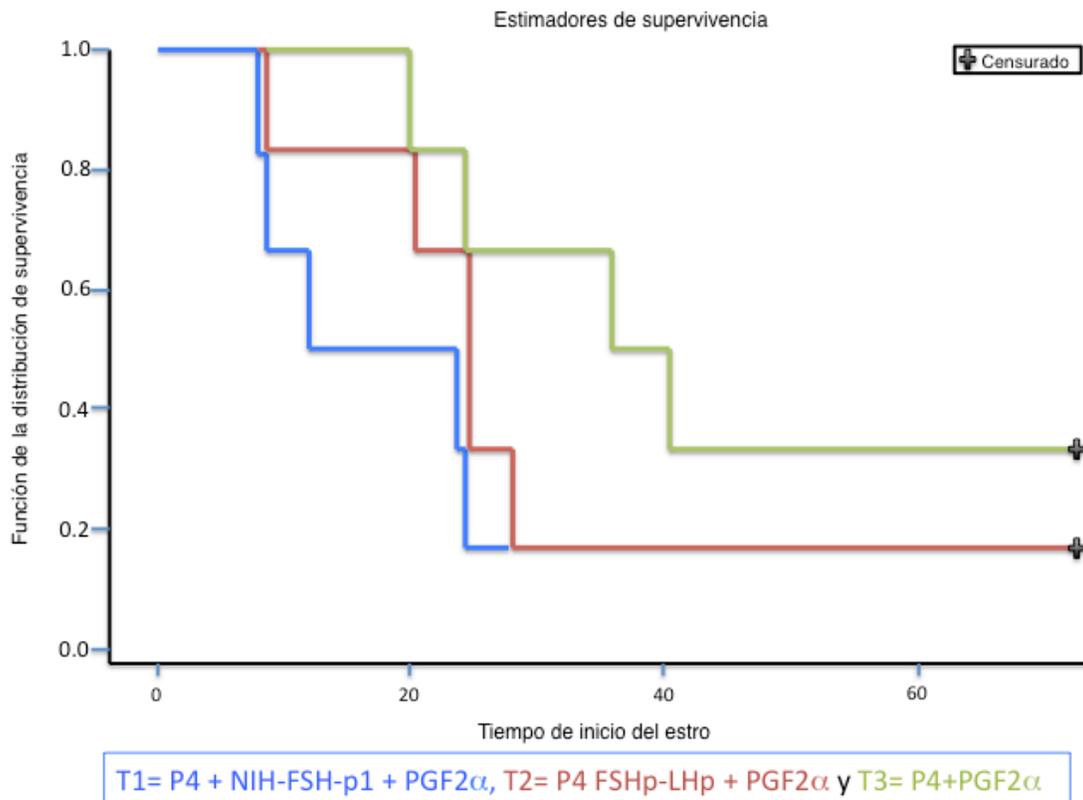


Figura 7. Curvas de supervivencia de inicio del estro, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento ($p < 0.05$).

5.4 Tasa ovulatoria, folículos grandes no ovulados y respuesta ovárica total.

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de tasa ovulatoria, folículos grandes no ovulados y la respuesta ovárica total; se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos en la variable tasa ovulatoria. Las ovejas de T1 tuvieron un mayor número de CL que el resto de los tratamientos; mientras tanto, las ovejas de T2 manifestaron un mayor número de CL que las ovejas de T3 y T4 (estro natural); los tratamientos T3 y T4 fueron similares entre sí ($p > 0.05$).

Cuadro 6. Tasa ovulatoria, folículos grandes no ovulados y respuesta ovárica total (Media \pm error estándar) en ovejas Pelibuey tratadas con diferentes tratamientos para sincronización del estro o superovulación.

	T1	T2	T3	T4
Número de ovejas	6	6	6	6
Tasa ovulatoria	14.83 \pm 5.77 ^a	7.33 \pm 2.21 ^b	0.83 \pm 0.40 ^c	0.67 \pm 0.21 ^c
Folículos grandes no ovulados	0.17 \pm 0.16	0 \pm 0	0.67 \pm 0.21	0 \pm 0
Respuesta ovárica total	15 \pm 5.78 ^a	7.33 \pm 2.21 ^b	1.50 \pm 0.34 ^c	0.67 \pm 0.21 ^c

Letra diferente dentro de cada fila indica diferencia significativa ($p < 0.05$). T1: P4+FSH+PGF2 α ; T2: P4+FSH:LH+PGF2 α ; T3: P4+PGF2 α ; T4: estro natural.

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el número de FGNO entre tratamientos. En la respuesta ovárica total se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos, las ovejas del T1 P4 + FSH + PGF2 α tuvieron la mejor respuesta ovárica total (15 \pm 5.78^a).

5.5 Estructuras colectadas y tasa de recuperación

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en relación al número de ovocitos no fertilizados colectados entre las ovejas del T1 (P4 + FSH + PGF2 α) y T2 (P4 + FSH:LH + PGF2 α). No se presentaron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos en los embriones

degenerados que se colectaron. Los embriones calidad 1 (EC1) colectados no presentaron diferencias ($p>0.05$) entre los tratamientos usados. Las ovejas de T1 presentaron un mayor número de embriones transferibles en comparación con las ovejas de T2. Se encontraron diferencias ($p<0.05$) en las estructuras totales recolectadas, se recolectó un mayor número de estructuras en las ovejas del T1 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Ovocitos, embriones y estructuras recolectadas de ovejas Pelibuey con dos tratamientos diferentes para superovulación (Media \pm error estándar).

	T1	T2
Ovocitos no fertilizados (ONF)	1.17 \pm 0.17 ^a	0.17 \pm .17 ^a
Embriones calidad 1	1.33 \pm 0.21 ^a	1.66 \pm 0.21 ^a
Embriones transferibles	5.67 \pm 2.31 ^a	3.17 \pm 1.42 ^b
Embriones degenerados	1.5 \pm 0.95 ^a	0.67 \pm 0.67 ^a
Estructuras recolectadas	10.17 \pm 4.31 ^a	4.17 \pm 1.90 ^b
Tasa de recuperación	68% ^a	56% ^a

Medias con literal diferente dentro de cada fila indica diferencia significativa ($p<0.05$). T1: P4+FSH+PGF2 α ; T2: P4+FSH:LH+PGF2 α .

En cuanto a las tasas de recuperación de obtenidas en los tratamientos T1 (P4+FSH+PGF2 α ; 68 %) y T2 (P4+FSH:LH+PGF2 α ; 56 %), no se encontraron diferencias estadísticas ($p>0.05$).

6. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en el presente estudio en cuanto a folículos pequeños, difieren a los reportados por Gonzalez-Bulnes *et al.* (2000) en ovejas Merino, quienes señalan que el número de folículos pequeños incrementó 12 h después de la primera inyección de FSH al inicio de la época reproductiva. Duggavathi *et al.* (2004) reportaron que las concentraciones de FSH en sangre alcanzan su máximo nivel 12 h después de la aplicación de oFSH y surge una oleada folicular durante este periodo. Aunque Ammoun *et al.* (2006) mencionan que la población folicular existente antes de iniciar el tratamiento con FSH puede influir en la respuesta a la superovulación. Respecto a los folículos medianos, los resultados encontrados en el presente estudio, coinciden con lo que reportan Ammoun *et al.* (2006), donde mencionan que la aplicación de FSH induce un incremento en el promedio de folículos de todos los tamaños en ovejas, durante la época reproductiva. Por otro lado, el promedio de folículos medianos (3.26 ± 0.50 y 3.28 ± 0.46) en los tratamientos T1 (P4 + FSH + PGF2 α ; y T2 (P4 + FSH:LH + PGF2 α), respectivamente; fue menor a lo que reportaron Gonzalez-Bulnes *et al.* (2000), mencionan que ovejas de la raza Merino a las se les aplicó 12 mg de pFSH al inicio de época reproductiva, obtuvieron un promedio de 8.9 ± 1.2 folículos medianos. Los resultados encontrados con respecto a los folículos grandes en T1 y T2, coinciden con lo encontrado por Ali *et al.* (2012), quienes mencionan que una inyección de FSH 12 ó 24 h después de retirar el CIDR durante la época reproductiva, puede aumentar el porcentaje de folículos preovulatorios. En otro estudio realizado por Driancourt (2001), sugiere que la estimulación ovárica con FSH produce un aumento del número de folículos grandes en crecimiento; de los cuales, pueden llegar a ovular hasta el 70 %. La aplicación de FSH incrementó la cantidad de folículos presentes en el ovario en T1 y T2.

De los tratamientos en los que se aplicó FSH, una oveja no manifestó estro (16.7%) por tratamiento; esto coincide con lo que menciona Cognie (1999), quién reporta que aproximadamente el 20% de las ovejas donantes no responden a los protocolos de

superovulación. González-Bulnes *et al.* (2003) mencionan que la proporción de ovejas que no responden a los tratamientos de superovulación puede alcanzar hasta 30%.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo que encontraron Boscós *et al.* (2002) en ovejas Chios, a las que aplicaron 10 UI de FSH, donde el 88.9 % presentaron estro. Simonetti *et al.* (2008) reportan un 100 % de manifestación de estro en una investigación donde superovularon ovejas de la raza Corriedale con eCG más FSH en época de cría. Los datos obtenidos en esta investigación, también coinciden con los datos que reportan D'Alessandro *et al.* (1996) en ovejas Altamurana, a las cuales se administró (250 UI; 86.7 %) y 500 UI; 92.8 %) de pFSH, respectivamente durante época reproductiva. Los tratamientos de sincronización del estro y superovulación son eficientes en ovejas Pelibuey.

El tiempo al inicio del estro (h) está influenciado por la raza y el tipo de FSH usada en los protocolos de superovulación (Crosby, 1993). Los resultados de inicio al estro obtenidos en el presente estudio en los tratamientos T1 (16.8 ± 3.41) y T2 (22.3 ± 3.05), respectivamente; son menores a los que reportan Torrés *et al.* (1987) en ovejas de la raza Ile de France superovuladas con pFSH en anestro estacional (32.0 ± 5.4); mientras que el inicio al estro en el T3 fue similar (33.5 ± 3.90). El resultado encontrado en las ovejas del tratamiento T2 (P4 + FSH:LH + PGF2 α ; 22.3 ± 3.05) es similar al que encontraron Wierzchos *et al.* (1992) en ovejas tratadas con FSH:LH, el mismo producto usado en el presente estudio para dicho tratamiento; reportaron que después de remover el CIDR, el 85 % de las ovejas manifestaron estro en las primeras 20 h.

El inicio al estro de las ovejas en el tratamiento T1 (P4 + FSH + PGF2 α) se presentó antes (16.8 ± 3.41) de lo reportado por Scudamore *et al.* (1991), donde la superovulación en ovejas con Acetato de fluorogestona (FGA) y gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), reportan que el inicio del estro fue entre las 20 y 30 h. Las ovejas del T3 (P4+PGF2 α) iniciaron el estro después del rango mencionado (33.5 ± 3.90). Esto puede deberse al menor número de folículos preovulatorios existentes y probablemente, por la menor concentración de E₂ en sangre. El inicio al

estro en las ovejas del T2 (P4 FSH:LH + PGF2 α ; 22.3 \pm 3.05) es similar con el tiempo de inicio al estro reportado por Simonetti *et al.* (2008b) en ovejas de la raza Corriedale, a las que se aplicó 176 unidades de FSH y 500 UI de eCG (25.4 \pm 2.0). La aplicación de FSH y FSH:LH indujo el inicio del estro más rápido que el tratamiento de sincronización del estro con P4 + PGF2 α .

En cuanto a la tasa ovulatoria, las ovejas del T1 (P4 + FSH + PGF2 α ; 14.83 \pm 5.77) tuvieron un mayor número de CL que el resto de los tratamientos (T2, T3 y T4). Este resultado es mayor al que encontraron Mayorga *et al.* (2011) en ovejas de la raza Sarda superovuladas con pFSH (7.0 \pm 3.2). Se ha reportado en experimentos realizados con ovejas que una mayor tasa de ovulación puede ser atribuida a una mayor cantidad de folículos dominantes al momento de la ovulación (Cahill *et al.*, 1979). La tasa ovulatoria de las ovejas del T2 (P4 + FSH:LH + PGF2 α ; 7.33 \pm 2.21) fue similar a la tasa ovulatoria obtenida por Salehi *et al.* (2010) en ovejas Chall (7.42 \pm 0.2) que fueron superovuladas con eCG más FSH. Existe un umbral de estimulación con FSH, por encima del cual se completan las últimas fases del desarrollo folicular, pero si la concentración mínima de FSH requerida no está presente, éstas no se producen. El umbral de sensibilidad es distinto para cada individuo, lo que explica la enorme variabilidad en la tasa de ovulación en respuesta a los tratamientos de superovulación (Picton y McNeilly, 1991). La aplicación de FSH en dosis decrecientes incrementa la tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey durante la época reproductiva.

Gonzalez-Bulnes *et al.* (2000) reportan haber observado que algunos folículos logran crecer hasta llegar al tamaño preovulatorio en respuesta a las gonadotropinas exógenas, pero no llegan a ovular. Los resultados encontrados en el presente estudio son similares a lo que encontraron Simonetti *et al.* (2008), quienes reportan 0.9 \pm 0.3 folículos grandes no ovulados en ovejas superovuladas con eCG más oFSH; en la presente investigación se obtuvo un rango de 0 a 0.67 \pm 0.21, entre los tratamientos aplicados. Mientras que los datos obtenidos son menores a lo que reportan Salehi *et al.* (2010) en ovejas Chall superovuladas con eCG más FSH), quienes encontraron 8.1 \pm

0.1 folículos grandes; esta respuesta puede deberse a la larga vida media de la eCG (Moor *et al.* 1985). Los tratamientos de superovulación del presente estudio son eficientes, ya que el número de folículos grandes encontrados en la superficie ovárica es bajo, esto manifiesta que la mayoría de los folículos ovularon. Mientras tanto, el resultado obtenido en relación a la respuesta ovárica total en las ovejas del presente estudio T1 (P4 + FSH + PGF2 α ; 15 ± 5.78) fue similar a los datos reportados por D'Alessandro *et al.* (1996) en ovejas a las que les aplicaron 750 y 1000 UI de pFSH (16.1 ± 1.7 y 14.5 ± 1.8 , respectivamente), mientras que la respuesta ovárica total de las ovejas del T2 (P4 + FSH:LH + PGF2 α ; 7.33 ± 2.21) fue menor. La respuesta ovárica total fue mejor en las ovejas a las que se les aplicó FSH.

Respecto a los ovocitos no fertilizados (ONF), los datos obtenidos en el presente estudio para T1 (1.17 ± 0.17) y T2 ($0.17 \pm .17$), son similares a los que obtuvieron González-Bulnes *et al.* (2002) en ovejas de la raza Manchega, superovuladas con 8 dosis decrecientes de oFSH (0.3 ± 0.2 ovocitos no fertilizados). Forcada *et al.* (2011) reportan haber encontrado una mayor cantidad de ONF (10.7 ± 1.7 ; 9.0 ± 1.5 y 5.0 ± 0.9) en ovejas Ojalada tratadas con 280 UI de pFSH en dosis decrecientes, los resultados obtenidos en el presente son menores (T1; 1.17 ± 0.17 y T2; 0.17 ± 0.17). Los protocolos de superovulación y el método empleado en la monta natural de las ovejas mostraron ser eficientes debido a que el número de ovocitos recolectados es bajo. Bó y Mapletoft (2014) mencionan que la aparición de embriones degenerados puede ser producto de la ovulación de ovocitos de mala calidad, debido al reclutamiento de folículos que estaban destinados a atresia en tratamientos de superovulación. Ginther *et al.* (2003) sugiere que una inyección de FSH durante la fase de reclutamiento folicular provoca el desarrollo de folículos subordinados. El resultado obtenido en embriones transferibles en el T1; 5.67 ± 2.31) del presente estudio fue mayor a lo que obtuvieron Menchaca *et al.* (2009; 3.2 ± 0.5) en ovejas Merino tratadas con FSH más 300 UI de eCG, en época reproductiva. Los datos obtenidos coinciden con la tendencia encontrada por Jiménez (2009) en su estudio, donde comparó dos productos comerciales con diferente proporción de LH, el tratamiento con la aplicación de FSH

presentó una mayor cantidad de embriones transferibles ($p < 0.05$) que el tratamiento con aplicación de FSH:LH. Por su parte, Mayorga *et al.* (2011) reportan haber encontrado 6.2 ± 3.5 embriones transferibles en ovejas Sarda superovuladas con pFSH durante la época reproductiva; resultado similar al encontrado en el T1, pero mayor al encontrado en las ovejas del T2 (P4 + FSH:LH + PGF2 α ; 3.17 ± 1.42). En otro estudio similar, Forcada *et al.* (2000) reportaron 5.0 ± 0.6 embriones transferibles en ovejas superovuladas en época reproductiva con 176 U de oFSH; este valor es similar al encontrado en las ovejas del T1 (P4 + FSH + PGF2 α). La cantidad de embriones transferibles fue mejor en las ovejas a las que se les aplicó FSH.

Las tasas de recuperación del 68 % y 56 % obtenidas en los tratamientos T1 (P4+FSH+PGF2 α) y T2 (P4+FSH:LH+PGF2 α); respectivamente, son inferiores a las tasas de recuperación de embriones encontradas por Wierzchos *et al.* (1992) en ovejas Polish Mountain superovuladas en época reproductiva, con diferentes dosis de (FSH:LH), quienes reportaron tasas de recuperación entre 82 y 91 %. Sin embargo, Forcada *et al.* (2011) reportan tasas de recuperación del 58 %, 67 % y 68 % en ovejas tratadas con 280 UI de pFSH administradas en dosis decrecientes, durante los meses de septiembre a marzo de 2009; dichos resultados concuerdan con las tasas de recuperación del presente estudio. Las tasas de recuperación del presente estudio se encuentran dentro de los rangos aceptables, en esta variable influyen factores tanto intrínsecos, como extrínsecos de las ovejas.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, la administración de FSH en ovejas Pelibuey mejora la respuesta ovárica y embrionaria en temporada reproductiva. La aplicación de FSH en ovejas Pelibuey disminuyó el tiempo al inicio del estro e incrementó el número de folículos preovulatorios.

La mejor tasa ovulatoria y número de embriones transferibles por oveja se obtuvo con la administración de FSH. El número de embriones en estadio de blastocisto fue similar entre los productos comerciales FSH y FSH:LH; sin embargo, la aplicación de FSH presentó un mayor número de embriones en estadio de mórula y un mayor número de embriones transferibles.

8. LITERATURA CITADA

- Abd-Allah, S. M., R. K. Sharma, S. K. Phulia. and S. Inderjeet. 2013. Superovulatory Response Following Transvaginal Follicle Ablation in Murrah Buffalo: Effect of FSH or PMSG+FSH. *Theriogenology Insight*: 3(2):77-84.
- Abecia, J. A., F. Forcada and A. González-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 130: 173– 179.
- Abecia, J. A., F. Forcada and A. Gonzalez-Bulnes. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clin. Food Anim.* 27, 67–79.
- Adams, G. P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54, 17–32.
- Adams, G. P., R. L. Matteri, J. P. Kastelic, J. C. H Ko and O. J. Ginther. 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94:177–88.
- Aisen, E. G. Reproducción ovina y caprina. Capítulo 7. En: Figuerêdo, V., Rubianes, E. (Eds) Preparación de las hembras. Detección y control del estro y la ovulación, 1^a Ed. Inter-Médica S.A.I.C.I., Buenos Aires, Pp 87-98. 2004.
- Ajduk, A. and M. Zernicka-Goetz. 2013. Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 903-918.
- Alberio R. H. 2001. Manejo de donantes y receptoras. (Cap. 2, pp. 9-12). En Palma G. A. (ed.). *Biotecnología de la reproducción*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 705p.
- Aldrich, E. J. 2007. Basic physics of ultrasound imaging. *Crit Care Med.* Vol. 35, No. 5 (Suppl.).
- Ali, S. M., K. Hamid and S. M Hossein. 2012. Effects of eCG injection combined with FSH and GnRH treatment on the lambing rate in synchronized Afshari ewes. *Small Ruminant Research* 106:59– 63.
- Alikani, M., S. Sadowy and J. Cohen. 2002. Human embryo morphology and developmental capacity. (Cap. 1, pp.1-24). In: Soom, V. A and M. Boerjan (Eds.). *Assessment of mammalian embryo quality*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher 406p.
- Allen, W. R. and R. M Moor. 1972. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J. Reprod. Fertil.* 29, 313- 316.

- Ammoun, I., T. Encinas, A. Veiga-Lopez, J. M. Ros, I. Contreras, P. Gonzalez-Añover, M. J. Cocero, A. S. McNeilly and A. Gonzalez-Bulnes. 2006. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. *Theriogenology* 66: 896–905.
- Angela, S., G. Prefac, T. Paul, Ş. Alexandru and T. Dana. 2006. Evaluation of Sheep Embryo Quality by Morphologic Methods – Advantages and Disadvantages. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty* 3 (1) 68-70.
- Armstrong, D. T. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39: 7–24.
- Arredondo, R. V., B. R. Macedo, C. J. Molina, A. J. Magaña, R. O. Prado, M. L. J. García, C. A. Herrera y R. H. Lee. 2013. Morphological characterization of Pelibuey sheep in Colima, México. *Tropical Animal Health and Production* 45: 895-900.
- Arroyo, J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 829-845.
- Azawi, O. I. 2011. A new technique for nonsurgical embryo recovery in superovulated ewes treated with estradiol and oxytocin. *AL-Qadisiya Journal of Vet.Med.Sci.* Vol./10 No./2. 36-44.
- Baird, D. T. 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J. Reprod. Fert.* 69, 343-352.
- Baird, T. D. and B. K. Campbell. 1998. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145, 89–95.
- Ball, P. J. H. and A. R. Peters. 2004. *Reproduction in Cattle*. Third edition Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- Baril, G., B. Leboeuf and J. Saumande. 1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40: 621-628.
- Baril, G., P. Casamitjana, J. Perrin and J. C. Vallet. 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene*, 24:101-115.
- Baril, G., P. Brebion, and P. Chesné. 1995. *Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

- Barret, D. W., P. M. Bartlewski, S. J. Cook and N. C. Rawlings. 2002. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2a given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58, 1409–1424.
- Bartlewski, P. M., J. Vanderpol, A. P. Beard, S. J. Cook and N. C. Rawlings. 2000. Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotrophins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 273–291.
- Bherer, J., P. Matton and J. J. Dufour. 1977. Fate of the two largest follicles in the ewe after injection of gonadotropins at two stages of the estrous cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 154, 412–414.
- Bidot, A. 2004. La situación de la producción ovino caprina en Cuba. Curso “Taller Iberoamericano” Sistemas de alimentación sostenible para ovinos y caprinos”. Red XIX.D “Red Iberoamericana para el Mejoramiento Productivo de Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos”. 6 - 11 de Diciembre. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
- Bister, J. L. and R. Paduay. 1983. Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation in the ewe: evidence for an endogenous rhythm of fsh release. *Theriogenology*. April Vol. 19 No. 4. 565-582.
- Blanco, M. R., L. Simonetti and O. E Rivera. 2003. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. *Small Rumin. Res.* 47, 183-191.
- Bó, G. A. and J. R Mapletoft. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81: 38–48
- Bó, G. A. 2000. “Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de Transferencia de embriones”. II Simposio internacional de reproducción animal. Argentina.
- Bó, G. A. and R. J. Mapletoft. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p.344-348, Jul./Sept.
- Bó, G. A., R. A. Pierson and R. J. Mapletoft. 1991. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro Mate B implants *Theriogenology*, 36, pp. 169-183.

- Bodinost, F., A. E. Gibbons y M. Cueto. 1999. Ecografía para el diagnóstico de preñez en ovinos y caprinos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Bariloche, Argentina.
- Boland, M. P., D. Goulding and J. F. Roche. 1991. Alternative gonadotropins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35, 5–17.
- Boscós, C. M., F. C. Samartzi, S. Dellis, A. Rogge, A. Stefanakis and E. Krambovitis. 2002. Use of progestagen±gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology* 58, 1261-1272.
- Buckrell, B. C. 1988. Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology*. January, Vol. 29 No. 1; 71-84.
- Bukowska, D., B. Kempisty, H. Piotrowska, R. Walczak, P. Sniadek, J. Dziuban, K. P. Brussow, J. M. Jaskowski and M. Nowicki. 2012. The invasive and new non-invasive methods of mammalian oocyte and embryo quality assessment: a review. *Veterinarni Medicina*, 57, (4): 169–176.
- Butler, J. E. and J. D. Biggers. 1989. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, January, Vol.31 No.1; 115-126.
- Cahill, L. P., J. C. Mariana and P. Mauleon. 1979. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil.* 55:27-36.
- Cahill, L. P. 1981. Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 30, 135-142.
- Callesen H., T. Greve and P. Hyttel. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25: 71-86.
- Campbell, K. B., C. Souza, J. Gong, R. Webb, N. Kendall, P. Marsters, G. Robinson, A. Mitchell, E. E. Telfer and D. T. Baird. 2003. Domestic ruminants as models for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction*. 61, pp. 429-443.
- Campbell, K. B., R. J. Scaramuzzi and R. Webb. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 49, pp. 335-350.
- Carrillo, A. L. and Segura, J. C. 1993., Environmental and genetic effects on preweaning growth performance of hair sheep in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 25: 173–178.

- Casida, L. E., E. J. Warwick and R. K. Meyer. 1942. Survival of multiple pregnancies induced in the ewe following treatment with pituitary gonadotrophins. *J. Anim. Sci.* 1: 22-28.
- Chacón, C. A., J. D. Cortés., D. A. Giral. y R. R. Romero. Piezoelectricidad en un BUZZER. *Tecnura*, vol. 16, octubre, 2012, pp. 111-119.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep–goat embryo transfer. *Theriogenology* 51, 105–116.
- Cognie, Y., G. Baril, N. Poulin, and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59:171-188.
- Cole, H. H. and G. H. Hart. 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effectin the sexual maturity of the immature rat. *Am J Physiol*, 93:57-68.
- Contreras-Solis, I, B. Vasquez, T. Diaz, C. Letelier, A. Lopez-Sebastian and A. Gonzalez-Bulnes. 2009. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology*, 71:1018 – 25.
- Cortez-Romero, C., C. A. Herrera-Corredor, J. Gallegos-Sánchez y J. Salazar-Ortiz. 2011. Manual sobre fisiología de la reproducción, inseminación artificial y ultrasonografía en ovinos. México. Colegio de postgraduados.
- Couzinet, B., N. Lestrat, S. Brailly, M. Forest and G. Schaison. 1988. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle stimulating hormone in women with gonadotropin deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* -6 6: 552-556.
- Crosby, T. F. 1993. Superovulation in sheep : the effects of pfsh type and ewe breed. *Theriogenology* 39:205.
- 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.
- Davis D. L., and J. S. Stevenson. 2005. Estrus Synchronization: Horses, Pigs, Sheep, and Goats. In *Encyclopedia of Animal Science*. Ed. By Wilson Pond and Alan Bell, Marcel Dekker, (pp 353-355) Inc. New York.
- Davis, A. J., I. R. Fleet, F. A. Harrison and F. M. M. Walker. 1980. Pulmonary metabolism of prostaglandin F2a in the conscious non-pregnant ewe and sow. *J Physiol.* 301:86.

- Delgado, J. V., R. Perez-Grovas, M. E. Camacho, M. Fresno and C. Barba. 2000. The Wool-Less Canary Sheep and their relationship with the present breeds in America. *Agri*. 28:27-34.
- Demeestere, I., J. Centner, C. Gervy, Y. englert and A. Delbaere. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* 130, 147–156.
- Demoustier, M. M., J. F. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J. L. Gillard and F. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30, 379-386.
- Díaz, T., S. M. Pancarsi, M. Drost, E. J. Schmitt, J. D. Ambrose, W. E. Fredriksson and W. W. Thatcher. 2001. Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses. *J Dairy Sci*. 84:88-89.
- Dogan I. and Z. Nur. 2006. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. *Veterinarni Medicina*, 51, (4): 133–138.
- Donnay, I. 2002. Metabolic markers of embryo viability (Cap. 3 pp.57-94). In: Soom, V. A and M. Boerjan (Eds.). *Assessment of mammalian embryo quality*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher 406p.
- Driancourt, M. A., W. R. Gibson and L. P. Cahill. 1985. Follicular dynamics through the oestrus cycle in sheep. A review. *Reprod Nutr Develop*. 25:1-15.
- Driancourt, M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*. 35:55-68.
- Driancourt, M. A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55 pp. 1211-1239.
- Driancourt, M. A., R. C. Fry, I. J. Clarke and L. P. Cahil. 1987. Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 79: 635-641.
- Driancourt, M. A., A. Gougeon, D. Royere and C. Thibault. 1993. Ovarian function. En: *Reproduction in Mammals and Men*. C. Thibault, M. C. Levasseur, R. H. F. Hunter (Eds.). Paris: Ellipses. pp. 281-305.

- Driancourt, M. A., and R. C. Fry. 1992. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 27:279-292.
- Driancourt, M.A., P. Philipon, A. Locatelli, E. Jacques and R. Webb. 1988. Are differences in FSH concentrations involved in the control of ovulation rate in Romanov and Ile-de-France ewes? *J. Reprod. Fertil.* 83: 509-516.
- Duggavathi, R., P. M. Bartlewski, D. M. W. Barrett, C. Gratton, E. T. Bagu and N. C. Rawlings. 2004. Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine follicle-stimulating hormone during the inter-wave interval. *Biol. Reprod.* 70, 821–827.
- Duica, A. A., L. N. Tovió y L. H. Grajales. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria N° 14: Julio – diciembre.* 107-124.
- Duran, R. F. J. 2011. Principios físicos de la ecografía. (cap. 1, pp 1-26). En: Muñiz D. y Camino S. (Eds.) *ABC de la ecografía abdominal.* Madrid, España: Editorial medica panamericana, S. A. 115p.
- Elsden P. R., S. Lewis, A. I. Cumming and A. R. Lawson. 1974. Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin F2. *J Reprod Fertil*, 36: 455-456.
- Elvin, J. A. and M. M. Matzuk. 2001. Control of ovarian function. In *Transgenics in Endocrinology* (M. M. Matzuk, C. W. Brown, and T. R. Kumar, Eds.), pp. 61–89. Humana Press, Totowa, NJ.
- Evans, A. C. O., P. Duffy, N. Hynes and M. P. Boland. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53:699-715.
- Evans, A. C. O. and J. E. Fortune. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotrophin receptors. *Endocrinology* 138, 2963–2971.
- Evans, A. C. O., J. D. Flynn, P. Duffy, P. G. Knight and M. P. Boland. 2002. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123, 59–66.
- Evans, A. C. O., P. Duffy, N. Hynes, and M. P. Boland. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology.* 53 (3): 699- 715.

- Evans, G. y W. M. C. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Acribia. Zaragoza, España, pp 43-51.
- Fierro, S., J. Gil, C. Viñoles and J. Olivera-Muzante. 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79: 399–408.
- Forcada, F., M. A. Amer-Meziane, J. A. Abecia, M. C. Maurel, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, B. Asenjo, M. I. Vázquez and A. Casao. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology* 75; 769–776.
- Forcada, F., J. A. Abecia, J. M. Lozano and O. Zuñiga. 2000. Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. *Livestock Production Science* 66; 263–269.
- Fortune, J. E. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Anim Reprod Sci.* 33:111-125.
- Fortune, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50, pp. 225-232.
- Fortune, J. E., G. M Rivera and M. Y Yang. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* Volumes 82-83, July, Pages 109-126.
- Frandsen, D. R., W. W. Lee and F. A. Dee. 2009. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Seventh edition.
- Ganaiea, B. A., M. Z. Khana, R. Islama, D. M. Makhdoomib, S. Qureshic and G. M. Wania. 2009. Evaluation of different techniques for pregnancy diagnosis in sheep. *Small Ruminant Research* 85: 135–141.
- Gardner, D. K., M. Lane, J. Stevens and W. B. Schoolcraft. 2001. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil. Steril.* 76, 1175–1180.
- Gardner, D. K., P. L. Wale, R. Collins and M. Lane. 2012. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum. Reprod.* 26, 1981–1986.
- Garzón, N., R. Urrego y C. A. Giraldo. 2007. Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 2, núm. 2, julio-diciembre, pp. 68-77

- Gibbons, A. and M. Cueto. 2011. Embryo Transfer in Sheep and Goats. A training manual. National Institute for Agricultural Technology (INTA). Bariloche, Argentina, 27p.
- Ginther, O. J., M. A. Beg, F. X. Donadeu and D. R. Bergfelt. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 239–257.
- Gómez-Brunet, A., J. Santiago-Moreno, A. Toledano-Diaz y A. López-Sebastián. 2012. Reproductive seasonality and its control in spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 15, núm. 1, pp. S47-S70.
- Gonzalez-Bulnes A., J. Santiago-Moreno, M. J. Cocero and A. Lopez-Sebastian. 2000. Effects of fsh commercial preparation and follicljar status on follicular growth and superovulatory responsein spanish merino ewes. *Theriogenology* 54:1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes, A., A. Veiga-Lopez, P. Garcia, R. M. Garcia-Garcia, C. Ariznavarreta, M. A. Sanchez, J. A. Tresguerres, M. J. Cocero, and J. M. Flores. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63, 2523–2534.
- Gonzalez-Bulnes, A., D. T. Baird, K. Campbell, M. J. Cocero, R. M. Garcia-Garcia, E. K. Inskoop, A. Lopez- Sebastian, A. S. McNeilly and J. Santiago-Moreno. Souza C. J. H. and Veiga-Lopez A. 2004. Multiple factors affecting multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Develop.* 16: 421–435.
- Gonzalez-Bulnes, A., R. M. Garcia-Garcia, V. Castellanos, J. Santiago-Moreno, C. Ariznavarreta and V. Domínguez. 2003. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 17-28.
- Gonzalez-Bulnes, A., P. Pallares, M. I. Vazquez. 2010. Ultrasonographic imaging in small ruminant reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 45 (2), 9–20.
- Gonzalez-Bulnes, A., R. M. Garcia-Garcia, J. Santiago-Moreno, A. Lopez-Sebastian and M. J. Cocero. 2002. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, 58; 1607-1614.
- González-Garduño, R., G. Torres-Hernández y J. Arece-García. 2010. Comportamiento productivo y reproductivo de ovinos Pelibuey en un sistema de pariciones aceleradas con tres épocas de empadre al año. *Zootecnia Trop.*, 28(1): 51-56.
- González-Reyna A., J. Valencia, W. C. Foote and B. D. Murphy. 1991. Hair sheep in Mexico: Reproduction in the Pelibuey sheep. *Anim. Breed Abstr.*, 59, pp. 509-524.

- González, A., B. D. Murphy W. C. Foote and E. Ortegac. 1992. Circannual estrous variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Research*, 8; 225-232.
- Goodman A, Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent. Prog. Horm. Res* 39:1-73.
- Goodman, L. R. and K. E. Inskeep. 2006. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. (Cap. 44, pp.2389-2428). En: Neill D. J. (ed.). *Physiology of Reproduction*. 3rd Edition. St. Louis, USA: Academic Press. 3191p.
- Goodman, R. L. 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *The physiology of reproduction*. Knobil E., Neill J.D. (eds), Raven Press Ltd., pp.659-709.
- Gordon I. 1999. Artificial control of oestrus and ovulation. In: Gordon I., ed. *Controlled breeding in farm animals*. Oxford: Pergamon Press. p. 86–109.
- Gordon I. 1983. Fixed-time sheep artificial insemination. In: *Controlled Breeding in Farms Animals*. Gordon I (Ed.), Oxford. Pergamon Press, pp. 197–208.
- Gordon, I. 2005. *Reproductive technologies in farm animals*. CABI Publishing, University Press, Cambridge.
- Grazul-Bilska, A. T., J. D. Kirsch, J. J. Bilski, K. C. Kraft, E. J. Windorski, J. S. Luther, K. A. Vonnahme, L. P. Reynolds and D. A. Redmer. 2007. Superovulation in Sheep: Number and Weight of the Corpora Lutea and Serum Progesterone. *Sheep & Goat Research Journal*, Volume 22; 26-31.
- Greve, T., H. Callesen and P. Hyttel. 1983. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord Vet Med*, 35: 408-421.
- Griffin, P. J. and O J Ginther. 1992. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J ANIM SCI*. 70:953-972.
- Guibault, L. A., J. G. Lussier, F. Grasso, P. Matton and P. Rouillier. 1991. Follicular dynamics and superovulation in cattle. *Canadian veterinary Journal*. 32, 91-93.
- Guigon, C. J. and S. Magre. 2006. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol. Reprod.*, 75, p. 660.

- Guthrie, H. D. and D. J. Bolt. 1990. Changes in plasma follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, estrogen and progesterone during growth of ovulatory follicles in the pig. *Domest. Anim. Reprod.* 7, 83–91.
- Hafez, B. y E. S. E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals 7th Ed.* Lippincott Williams & Wilkins, . Philadelphia.
- Hahn, J. and R. H. Foote. Ultrasonic treatment of rabbit testes. *J Anim Sci* 1968; 28:230–232.
- Haisenleder, D. J., A. C. Dalkin and J. C. Marshall. 1994. Regulation of gonadotropin gene expression. In: *The Physiology of Reproduction* (Editors: E. Knobil and J.D. Neill), 2nd Edition. Raven Press, New York. pp 1793-1814.
- Hammond, J. and P. Battacharya. 1944. Control of ovulation in the cow. *J. Agric. Sci.*, 34: 1-15.
- Handyside, A. H., E. H. Kontogianni, K. Hardy and R. M. Winston. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344, 768–770.
- Haresign, W. 1985. The physiological basis for variation in ovulation rate and litter size in sheep: a review. *Livestock Production Science*, 13, 3-20.
- Hasler, F. J. 2003. The current status and future of comercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science* 79: 245–264.
- Hasler, J. F. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. *Theriogenology* 81: 152–169.
- Hasler J. F., A. D. McCauley, W. F. Lathrop and R. H. Foote. 1987. Effect of donor embryo recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27:139– 168.
- Henderson, D. C. and J. J. Robinson. 2008. *The Reproductive Cycle and its Manipulation*, in *Diseases of Sheep*, Fourth Edition (ed I.D. Aitken), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Henríquez, O., J. Galdámez, J. M. León, H. Zambrana, E. Izaguirre, A. Vallecillo y Miró-Arias. 2010. Recursos genéticos ovinos de el salvador. (pp. 217-233). En: Delgado B. J. V. (ed). *Biodiversidad Ovina Iberoamericana Caracterizacióny uso sustentable*. Córdoba, España: UCO. 487p.

- Hesser, M. W., J. C. Morris and J. R. Gibbons. 2011. Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reprod Dom Anim* 46, 933–942.
- Hsu, C. J., S. D. Holmes and J. M. Hammond. 1987. Ovarian epidermal growth factor like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 147: 242-247.
- 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. *Anim. Reprod. Sci. Volumes 82-83, July, Pages 461-477.*
- Hunter, R. H. F. 2003. *Physiology of the Graafian follicle and ovulation.* Cambridge University Press, New York, 397 pp.
- Hyttel, P., H. Callesen, T. Greve and M. Schmidt. 1991. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology.* 35:91-108.
- INAFED. 2013. *Enciclopedia de los municipios de México.* Instituto nacional para el federalismo y desarrollo municipal del estado de Veracruz. Secretaria de Gobierno. México. www.e-local.gob.mx
- INEGI. 2013. Instituto nacional de estadística y geografía. *El ganado ovino en México. Censo Agropecuario 2007.* <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biblioteca/detalle.aspx?c=16964&upc=702825004098&s=est&tg=0&f=2&cl=0&pf=Agro&ef=0>
- Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Consultado 20-11-2013 en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.
- Inskeep, E. K. 2005. Estrous cycle: cattle, sheep, goat. In *Encyclopedia of Animal Science.* Ed. By Wilson Pond and Alan Bell, Marcel Dekker, (pp. 342-344) Inc. New York.
- Jackson, C. G., T. L. Neville, V. R. G. Mercadante, K. M. Waters, G. C. Lamb, C. R. Dahlen and R. R. Redden. 2014. Efficacy of various five-day estrous synchronization protocols in sheep. *Small Ruminant Research* 120:100–107.
- Jiménez, C. 2009. Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. vet. Zoot.* 56:195-214.
- Kähn, W. 1992. Ultrasoundography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Anrm. Reprod. Ser.* 28: 1-10.

- Kakourou, G., S. Jaroudi, P. Tulay, C. Heath, P. Serhal, J. C. Harper, S. B. Sengupta. 2013. Investigation of gene expression profiles before and after embryonic genome activation and assessment of functional pathways at the human metaphase II oocyte and blastocyst stage. *Fertil. Steril.* 99, e23.
- Karacaa, F., M. B. Ataman and K. Çoyan. 2009. Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes. *Small Ruminant Research* 81, 185–188.
- 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. *Biology of Reproduction* 23, 404-413.
- Kershaw, C. M., M. Khalid, M. R. McGowan, K. Ingram, S. Leethongdee, G. Wax and R. J. Scaramuzzi. (2005): The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64, 1225–1235.
- Knights M., Q. S. Baptiste, A. B. Dixon, J. L. Pate, D. J. Marsh, E. K. Inskeep and P. E. Lewis. 2003. Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrous season. *Small Ruminant Research* Volume 50, Issues 1–2, Pages 1–9.
- Lara P.J. 2007. Producción de ovinos de pelo en México. Material genético para exportación. Memoria del 8° Congreso Mundial de la Lana y el Cordero; julio 23–24; Santiago de Querétaro (Querétaro). México D F: Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos, Pp. 1-4.
- Leese, H. J., 2012. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 143, 417–427.
- León, V. H., H. H. Ruiz, M. A. J. Ruiz y E. A. Villalobos. 2008. Manual de transferencia de embriones en ovinos. Chiapas: Universidad Autónoma de Chiapas.
- Letelier, C. A., S. I. Contreras, F. R. A. García, M. A. Sanchez, P. P. García, B. Sanchez, C. Ariznavarretad, J. A. F. Tresguerresd, J. M. Flores, and A. B. Gonzalez. 2011. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science* 126:61–69.
- Leyva O. C., S. A. Barreras y D. M. Varizanga. 1999. Transferencia no quirúrgica de embriones en el ganado bovino. Mexicali, Baja California. UABC.

- Lima-Verde, J. B., E. S. Lopes-Júnior, D. I. A. Teixeira, N. R. O. Paula, A. A. Medeiros, D. Rondina and V. J. F. Freitas. 2003. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *South African Journal of Animal Science*, 33 (2); 127-131.
- Lindner G. M. and Wright R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* Vol. 20 No. 4. 407-416.
- Lopes, A. S., L. H. Larsen, N. Ramsing, P. Lovendahl, M. Raty, J. Peippo, T. Greve and H. Callesen. 2005. Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 130, 669–679.
- Lopes, A. S., T. Greve and H. Callesen. 2007. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 67, 21–31.
- Lopez-Alonso, C., T. Encinas, A. Veiga-Lopez, R. M. Garcia-Garcia, M. J. Cocero, J. M. Ros, A. S. McNeilly and A. Gonzalez-Bulnes. 2005. Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single short-acting dose of GnRH antagonist. *Theriogenology* 64; 1833–1843.
- Lopez-Sebastian, A., B. A. Gonzalez, J. S. Moreno, A. Gomez-Brunet, C. E. Townsend, and E. K. Inskeep. 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Animal Reproduction Science* 48, 279-291.
- Lucy, M. C., J. D. Savio, L. badinga, R. L. De La Sota and W. W. Thatcher. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70:3615-3626.
- Lundy, T., P. Smith, A. O'Connell, N. L. Hudson and K. P. McNatty. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115, 251–262.
- Lutz, H. T. 2006. Basics of ultrasound. (Cap.1, pp 1.19). En: Lutz, H. T. and Gharbi H. A. (Eds.). *Manual of diagnostic ultrasound in infectious tropical diseases*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Macedo, R. y A. Alvarado. 2005. Efecto de la época de monta sobre la productividad de ovejas Pelibuey bajo dos sistemas de alimentación en Colima, México. *Arch. Zoot.* 54: 51-62.
- Mahdia, D. and K. Khallili. 2008. Relationship between follicle growth and circulating gonadotrophin levels during postnatal development of sheep. *Animal Reproduction Science* 106, 100–112.

- Mannion, P. 2006. Principles of Diagnostic Ultrasound (cap. 1, pp. 1-19). En: Mannion, P. (Ed.). Diagnostic Ultrasound in Small Animal practice. United Kingdom: Blackwell Science Ltd.
- Mapletoft, J. R., S. K. Bennett and P. G. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42; 601–611.
- Martemucci, G. and A. G. D'Alessandro. 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF₂ α , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal Reproduction Science* 123; 32–39.
- Martin, G. B., C. A. Price, J. C. Thiery and Webb. 1988. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 82: 319-328.
- Martin, G. B., J. T. B. Milton, R. H. Davidson, G. E. Banchemo-Hunzicker, D. R. Lindsay and D. Blache. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2004;82– 83:231– 46.
- Mayorga, I., L. Mara, D. Sanna, C. Stelletta, M. Morgante, S. Casu and M. Dattena. 2011. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology* 75; 1661–1668.
- McKelvey, W. A. C., J. J. Robinson, R. P. Aitken and I. S. Robertson. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25: 855-865.
- McCracken, J. A., M. E. Glew and R. J. Scaramuzzi. 1970. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂-alpha. *J Clin Endocrinol Metab.* 30:544–6.
- McIntosh, J. E., R. M. Moor and W. R. Allen. 1975. Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Reprod. Fert.* 44, 95-100.
- McKenzie, F. F. and C. E. Terrill. 1937. Estrus, ovulation, and related phenomena in the ewe. *Missouri Agr. Exper. Sta. Res. Bull.* 264, 5–88.
- McNeilly, A. S., J. A. Jonassen and M. M. Fraser. 1986. Suppression of follicular development after chronic LH-RH immunoneutralization in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 76: 481-490.
- McNeilly, A. S., H. M. Picton, B. K. Campbell and D. T. Baird. 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fert.* (Suppl.) 43, 177-86.

- Meikle, A., L. Sahlin, A. Ferraris, B. Masironi, J. E. Blanc, M. Rodríguez-Irazoqui, M. R. Piñon, H. Kindahl and M. Forsberg. 2001. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor alpha, progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 68:45–56.
- Menchaca, A., M. Vilariño, A. Pinczak, S. Kmaid and J. M. Saldaña. 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72; 477–483.
- Menchaca, A., V. Miller, J. Gil, A. Pinczak, M. Laca and E. Rubianes. 2004. Prostaglandin F2a Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. *Reprod Dom Anim* 39, 352–355.
- Merton, S. 2002. Morphological evaluation of embryos in domestic species. (Cap. 2, pp.31-49). In: Soom, V. A and M. Boerjan (Eds.). *Assessment of mammalian embryo quality*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher 406p.
- Mihm, M. and A. C. Evans. 2008. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Dom Anim.* 43(Suppl. 2):48–56.
- Monniaux D., D. Chupin and J. Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle, *Theriogenology* 19; 55–82.
- Montag, M., B. Toth and T. Strowitzki. 2013. New approaches to embryo selection. *Reproductive BioMedicine Online.* 27, 539-546.
- Moor, R. M., A. M. Kruip and D. Green. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation?. *Theriogenology.* 21:103–116.
- Moor, R. M., J. C. Osborn and I. M. Crosby. 1985. Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 74, 167–172.
- Moore L. G., W. N. Chie, N. L. Hudson and K. P. McNatty. 2000. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J. Endocrinology* 165, 185-192.
- Morteo G. R., G. R. González, H. G. Torres, O. G. Nuncio, P. C. Becerril, G. S. Jaime e I. E. Aranda. 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia;* 38(4):395-404.

- Muñoz, E. C. 2002. El ovino en América. Participación del merino en la formación de la cabaña americana. La Habana, Cuba. Noviembre de 2002. V Congreso Iberoamericano de razas autóctonas.
- Murphy, B. D. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod*, v.9, n.3, p.223-230.
- Murphy B. D., R. J. Mapletoft, J. Manns and W. D. Humphrey. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21; 117–125.
- Murphy, B. D. and S. D. Martinuk. 1991. Equine chorionic gonadotropin, *Endocr. Rev.* 12: 27–44.
- Mutigal E. R. and E. Mukasa-Mugerwa. 1992. Effect of the method of estrus synchronization and pmsg dosage on estrus and twinning in ethiopian menze sheep. *Theriogenology* 38:727-734.
- Naqvi, S. M. K., R. Gulyani, J. G. K. Anil and J. P. Das. 2002. Effect of dietary regimens on ovarian response and embryo production of sheep in tropics. *Small Ruminant Research* 46:167–171.
- Nellenschulte, E. and H. Niemann. 1992. Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Animal Reproduction Science*, 27; 293-304.
- Noel, B., J. L. Bister and R. Paquay. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fertil.* 99, 695–700.
- Olivera-Muzante, J., S. Fierro, V. López and J. Gil. 2011. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75 , 1232–1238.
- Overstrom, W. E. 1996. In Vitro Assessment of Embryo Viability. *Theriogenology* 453-16.
- Palmer, E. and M. A. Driancourt. 1980. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology*, 13:203-216.
- Partida, P. J. A. 2007. Antecedentes, Desarrollo y Perspectivas del Borrego Pelibuey en México. *Acontecer Ovino-Caprino*, Vol. VIII. No. 37. Pp.4-12.
- Partida, P. J. A. and R. L. Martínez. 2010. Body composition in Pelibuey lambs in terms of feed energy concentration and slaughter weight. *Vet. Méx.*, 41 (3). ¿páginas?

- Pedersen, T., and H. Peters. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.* 17, 555–557.
- Phillips, D. J., N. L. Hudson, S. Lun, L. A. Condell and K. P. McNatty. 1993. Biopotency in vitro and metabolic clearance rates of five pituitary preparations of follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 181-190.
- Picton, H. M. and A. S. McNeilly. 1991. Evidence to support a follicle-stimulating hormone threshold theory for follicle selection in ewes chronically treated with gonadotrophin releasing hormone agonist. *J. Reprod. Fert.* 93: 43-51.
- Picton, H. M., C. G. Tsonis and A. S. Mc Neilly. 1990. FSH causes a time dependent stimulation of preovulatory follicular growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.*, 126, pp. 297-307.
- Pierce, J. G. and T. F. Parsons. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50, 465–495.
- Pierson, R. A. and O. J. Ginther. 1987. Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 15:53.
- Purses, V. G. and E. F. Graham. 1962. Induced estrus in anestrus ewes by use of progestogens and follicle stimulating hormone. *J ANIM SCI*, 21:132-136.
- Quintela, A. L. A., de P. C. Diaz, H. P. J. García, M. A. I. Peña y G. J. J. Becerra. 2006. *Ecografía y reproducción en la vaca*. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Quirk, S. M. and J. E. Fortune. 1986. Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. *J Reprod Fert.* 76:609-621.
- Quirke, J. F., J. P. Hanrahan and J. P. Gosling. 1979. Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 55, 37–44.
- Rajkovic, A., S. A. Pangas, and M. M. Matzuk. 2006. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. (Cap. 10, pp.383-410) En: Neill D. J. (ed.). *Physiology of Reproduction*. 3rd Edition. St. Louis, USA: Academic Press. 3191p.
- Ramon-Ugalde, J. P., J. Folch, M. J. Cocero, R. E. Piña-Aguilar and J. L. Alabart. 2008. Embryo recovery from the oviduct in superovulated ewes: a method to improve MOET systems. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, (4): 145–151.

- Ravindra, J. P., N. C. Rawlings, A. C. O. Evans and G. P. Adams. 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*;101:501-9.
- Richards, J. S., 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev.* 15, 725–751.
- Robinson, J. J., J. A. Rooke and T. G. McEvoy. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. In: *Sheep nutrition* Freer M., Dove H. (eds), CABI Publishing CSIRO Publishing, Canberra, pp 189-211.
- Rohen, W. J. y E. Lütjen-Drecoll. 2007. *Embriología funcional: una perspectiva desde la fisiología del desarrollo*. 3ª ed. Madrid: España. Medica Panamericana. 176p.
- Romanov, J. L., J. Hernández, y R. A. Castellanos, 1983. Repercusión del valor nutritivo de la dieta sobre el crecimiento del borrego Pelibuey. *Tec. Pec. Mex.* 45:67. ¿última página?
- Romualdo, J. G., A. C. Sierra, J. R. Ortiz, and J. S. Hernández. 2004. Caracterización morfométrica del ovino Pelibuey local en Yucatán, México., *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 12 (Supl. 1), 26–31.
- Rondeau, M., P. Guay, A. K. Goff and G. M. Cooke. 1995. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Theriogenology* 44:351-366.
- Rosado, J., E. Silva and M. A. Galina. 1998. Reproductive management of hair sheep with progesterone and gonadotropins in the tropics. *Small Ruminant Research*, 27, 237–242.
- Roser, F. J. and G. Meyers-Brown. 2012. Superovulation in the Mare: A Work in Progress *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 376-386.
- Rubianes, E., A. Menchaca and B. Carbajal. 2003: Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F2a. *Anim Reprod Sci* 78, 47–55.
- Russel, A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjetive assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72:451-454.
- Sadler, W. T. 2009. *Langman embriología médica*. 11va ed. Barcelona: España. Lippincott Williams & Wilkins. 414p.
- SAGARPA. 2013. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Producción de carne ovina.

<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/Manual%20Producción%20de%20Carne%20Ovina.pdf>

- Saint-Dizier, M., F. Foulon-Gauze, F. Lecompte, Y. Combarous and M. Chopineau. 2004. Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *J Endocrinol* 183:551-559.
- Salehi, R., H. Kohram, A. Towhidi, H. K. Moakhara and M. Honarvar. 2010. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. *Small ruminant research* 93; 213-217.
- SAS, 2013. JMP. Statistic visual. Version 9.3 institute inc. campus Drive. Cary. NC 27517.
- Sawyer, H. R., P. Smith, D. A. Heath, J. L. Juengel, S. J. Wakefield and K. P. McNatty. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66, 1134–1150.
- Scaramuzzi, R. J., J. A. Downing, B. K. Campbell and Y. Cognie. 1988. Control of Fertility and Fecundity of Sheep by Means of Hormonal Manipulation. *Aust. J. Biol. Sci.* 41: 37-45.
- Scaramuzzi, R. J., N. R. Adams, D. T. Baird, B. K. Campbell, J. A. Downing, J. K. Findlay, K. M. Henderson, G. B. Martin, K. P. McNatty, A. S. McNeilly and C. G. Tsonis. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction Fertility and Development.* 5 (5): 459- 478.
- Scaramuzzi, R. J. 1988. Reproduction research in perspective. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 17, 57-73.
- Schrick, F. N., R. A. Surface, J. Y. Pritchard, R. A. Dailey, E. C. Townsend and E. K. Inskeep. 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 49, 1133–1140.
- Scudamore, C. L., J. J. Robinson and R. P. Aitken. The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with or without sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenology* May 1991 Vol. 35 No. 5. ¿páginas?
- Seidel E. G. and S. M. Seidel. 1991. Training manual for embryo transfer. FAO. Roma.
- Simonetti, L., F. Forcada, O. E. Rivera, N. Carou, R. H. Alberio, J. A. Abecia and I. Palacin. 2008b. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science* 104 ; 227–237.

- Simonetti, L. 2008. Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Smeaton, T. C. and H. A. Robertson. 1971. Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 25, 243–252.
- Smith, R. and A. McLaren. 1977. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoel. *J Embryol Exp Morphol* 41:79-92.
- Sosa, C., J. A. Abecia, F. Forcada and A. Meikle. 2008. Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *Vet J.* 175:413–5.
- Souza, C. J., B. K. Campbell and 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.
- Souza, C. J., B. K. Campbell, and D. T. Baird. 1998. Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin a in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *Journal of Endocrinology* 156, 563-572.
- Staigmiller, R. B., R. A. Bellows, G. B. Anderson, G. E. Seidel, W. D. Foote, A. R. Menino and R. W. Wright. 1992. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine fsh. *Theriogenology* 37:1091-1099.
- Steel, R. and J. F. Hasler. 2004. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. *reprod Fertil develop.* 16: 182-183.
- Stellflug, J. N., F. Rodríguez, V. A. LaVoie and H. A. Glimp. 1994. Influence of stimulated photoperiod alteration and induced estrous on reproductive. *J Anim Sci* 1994, 72:29-33.
- Stenbak, T. K., A. T. Grazul-Bilska, H. R. Berginski, J. J. Bilski, A. S. Erickson, J. D. Kirsch, K. C. Kraft, C. Navanukraw, M. J. Toutges, L. P. Reynolds and L. A. Redmer. 2003. Ovulation rate in ewes synchronized with Syncro-Mate-B (SMB) and follicle stimulating hormone. *Small Ruminant Research* 48, 1–8.
- Stouffer, R. J. 2004. History of Ultrasound in Animal Science. *J Ultrasound Med* 23:577–584.
- Stringfellow, D. A. and M D. Givens. 2010. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS.

- Sturmeý, R. G., P. Bermejo-Alvarez, A. Gutierrez-Adan, D. Rizos, H.J. Leese and P. Lonergan. 2010. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 285–296.
- Taya, K., H. Kaneko, T. Takedomi, H. Kishi and G. Watanabe. 1996. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. *Animal Reproduction Science* 42; 563-570.
- Taylor, D. and M. Tachataki. 2002. Biopsy and preimplantation diagnosis of human embryos (Cap.7, pp.157-172). In: Soom, V. A and M. Boerjan (Eds.). *Assessment of mammalian embryo quality*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher 406p.
- Temple, R. S., H. H. Stonaker, D. Howry, G. Posakony and M. H. Hazaleus. 1956. Ultrasonic and conductivity methods for estimating fat thickness in live cattle. *Am Soc Anim Prod West Sec Proc.* 7:477–481.
- Tisdall, D. J., K. Watanabe and W. L. Hudson. 1995. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Mol. Endocrinol.* 15, 275–281.
- Torrès, S., Y. Cognie and G. Colas. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 27, 407-419.
- Trujillo-Quiroga, M. J., J. Gallegos-Sánchez. A. Porrás-Almeraya y J. Valencia-Méndez. 2007. Los días artificiales largos inducen el anestro en ovejas pelibuey con patrón reproductivo continuo. *Agrociencia* 41: 513-519.
- Ulloa-Arvizu, R., A. Gayosso-Vázquez and R. A. Alonso. 2009. Determining the genetic origin of Mexican creole sheep (*Ovis aries*) by cytochrome C oxidase subunit I gene analysis. *Téc Pecu Méx*; 47(3):323-328.
- Uribe-Velásquez, L. F., A. Correa-Orozco y J. H. Osorio. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, Volumen 8, enero - diciembre, págs. 117 – 131.
- Uribe-Velásquez, L. F., E. Oba, M. I. L. Souza. 2008. Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.58-65.
- Uribe-Velásquez, L. F., E. Oba, S. M. I. Lenz, M. Vélez-Marín y A. Correa-Orozco. 2010. Desarrollo folicular en ovejas durante el ciclo estral natural e inducido con prostaglandinas. *Rev. Cient. (Maracaibo)* v.20 n.4 Maracaibo jul.

- Ustuner B., U. Gunay, Z. Nur and H. Ustuner. 2007. Effects of Long and Short-Term Progestagen Treatments Combined with PMSG on Oestrus Synchronization and Fertility in Awassi Ewes during the Breeding Season. *ACTA VET. BRNO.* 76: 391-397.
- Valasi, I., L. Leontides, I. Menegatos and G. S. Amiridis. 2007. Oestradiol concentration as a predictor of ovarian response in FSH stimulated ewe-lambs. *Animal Reproduction Science* 102, 145–151.
- Valencia, M. and E. Gonzalez. 1983. Pelibuey sheep in Mexico. In: H.A. Fitzhugh and G.E. Bradford. *Hair Sheep of West Africa and the Americas. A Genetic Resource for the Tropics.* West View Press, Boulder, CO, pp. 235.
- Van Soom, A., M. L. Boerjan, P. E. J. Bols, G. Vanroose, A. Lein, M. Coryn and A. de Kruif. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 57:1041-1049.
- Van Soom, A., B. Mateusen, J. Leroy and A. de Kruif. 2003. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reproductive BioMedicine Online.* Vol 7. No 6. 664-670.
- Vanroose, G., H. Nauwynck, A. Van Soom, M. T. Ysebaert, G. Charlier, P. Van Oostveldt and A. de Kruif. 2000. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol Reprod* 62:463-469.
- Vargas, A., L. M. Amescua-Guerra, M. A. Bernal y C. Pineda. 2008. Principios físicos básicos del ultrasonido, sonoanatomía del sistema musculoesquelético y artefactos ecográficos. *Acta Ortopédica Mexicana.* 22(6): Nov.-Dic: 361-373.
- Vilaboa, A. J., R. Bozzi, R. P. Diaz y L. Bazzi. 2010. Conformación corporal de las razas ovinas Pelibuey, Dorper y Kathadin en el estado de Veracruz, México. *Zootecnia Trop.* Vol.28, n.3, pp. 321-328.
- Viñoles, C., M. Forsberg, G. Banchemo and E. Rubianes. 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55:993-1004.
- Viñoles, G. C. 2003. 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: Suecia.
- Viuff, D., T. Greve and P. D. Thomsen. 2002. Is the frequency of chromosome abnormalities influenced by in vitro techniques? (Cap.10, pp.219-233). In: Soom, V.

- A and M. Boerjan (Eds.). Assessment of mammalian embryo quality. Netherlands: Kluwer Academic Publisher 406p.
- Walker, O. F. 2012. Principios basicos de ecografía. (cap.1, pp 1-23). En: Walker O. F. and Cartwright S. M. (Eds.). Ecografía neuromuscular. España: Elsevier 208p.
- Watson, A. J. 1992. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 33:492-504.
- Webb, R., B. Nicholas, J. G. Gong, B. K. Campbell, C. G. Gutierrez, H. A. Garverick and D. G. Armstrong. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*, 61, pp. 71-90.
- Webb, R., P. C. Garnsworthy, J. G. Gong and D. G. Armstrong. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J ANIM SCI*, 82:E63-E74.
- Weems, C. W., Y. S. Weems and R. D. Randel. 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal* 171, 206–228.
- Wierzchos, E., M. Tischner and M. Maffii. 1992. Superovulation of a low fecundity sheep breed using a porcine gonadotrophin extract with a defined lh content (PLUSET). *Theriogenology* 38:147-152.
- Wilmot I. and L. E. A. Rowson. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686–690.
- Winterberger-Torres, S. and C. Sevellec. 1987. Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. Paris: INRA.
- Wolfsdorf, K. E., T. Díaz, E. J. Schmitt, M. J. Thatcher, M. Drost and W. E. Thatcher. 1997. The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology* 48:435-447.
- Zelege M., J. P. C. Greyling, L. M. J. Schwalbach, T. Muller and J. A. Erasmus. 2005. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research* 56: 47-53.

11. Anexos

Anexo 1

Número de folículos pequeños, medianos y grandes (Media \pm E. E.) en 4 grupos de ovejas Pelibuey en el día de la primera aplicación de FSH (- 60h) con respecto al retiro del CIDR y hasta (12h) después del retiro.

Observación (h)	Tratamiento			
	T1	T2	T3	T4
Folículos chicos				
-60	5.33 \pm 0.45 ^a	5.33 \pm 0.21 ^a	5.17 \pm 0.17 ^a	5.17 \pm 0.17 ^a
-48	5 \pm 0.82 ^a	5.17 \pm 0.31 ^a	4.33 \pm 1 ^a	5 \pm 0.26 ^a
-36	4.67 \pm 0.52 ^a	4.33 \pm 0.33 ^a	5 \pm 1.13 ^a	5 \pm 0.37 ^a
-24	5.33 \pm 0.45 ^a	5.16 \pm 0.31 ^a	4.83 \pm 1 ^a	4.83 \pm 0.31 ^a
-12	5.33 \pm 0.21 ^a	5.5 \pm 0.22 ^a	5.33 \pm 1.09 ^a	5.16 \pm 0.31 ^a
0	4.66 \pm 0.33 ^a	4 \pm 0.45 ^a	4.5 \pm 0.92 ^a	5.16 \pm 0.40 ^a
12	4.83 \pm 0.2 ^a	4.16 \pm 0.60 ^a	3 \pm 1 ^a	4.33 \pm 0.42 ^a
Folículos medianos				
-60	0.67 \pm 0.17 ^{ab}	.83 \pm 0.40 ^{ab}	0.2 \pm 0.17 ^b	2 \pm 0.52 ^a
-48	4.17 \pm 0.80 ^a	3.5 \pm 0.56 ^a	1.83 \pm 0.70 ^a	3.17 \pm 0.48 ^a
-36	3.67 \pm 0.54 ^{ab}	3.16 \pm 0.48 ^{ab}	1.83 \pm 0.60 ^b	4 \pm 0.26 ^a
-24	4.33 \pm 0.67 ^a	4 \pm 0.26 ^{ab}	2 \pm 0.77 ^b	4.5 \pm 0.34 ^a
-12	3.67 \pm 0.17 ^a	3.67 \pm 0.42 ^a	2 \pm 0.52 ^b	4.16 \pm 0.40 ^a
0	3 \pm 0.33 ^a	3.66 \pm 0.42 ^a	3 \pm 0.63 ^a	3.83 \pm 0.48 ^a
12	3.33 \pm 0.33 ^a	4.16 \pm 0.40 ^a	3.16 \pm 0.65 ^a	2.83 \pm 0.40 ^a
Folículos grandes				
-60	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a
-48	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	0.33 \pm 0.33 ^a	0 \pm 0 ^a
-36	0.83 \pm 0.17 ^a	0.5 \pm 0.22 ^a	0.17 \pm 0.17 ^a	0.17 \pm 0.17 ^a
-24	1.33 \pm 0.34 ^a	1.16 \pm 0.31 ^a	0.5 \pm 0.22 ^a	0.66 \pm 0.21 ^a
-12	2.33 \pm 0.56 ^a	2.16 \pm 0.40 ^{ab}	0.67 \pm 0.21 ^b	1.33 \pm 0.21 ^{ab}
0	2.66 \pm 0.21 ^a	2.83 \pm 0.31 ^a	0.83 \pm 0.17 ^b	1 \pm 0 ^b
12	3.17 \pm 0.33 ^a	2.5 \pm 0.22 ^a	0.83 \pm 0.17 ^b	1 \pm 0 ^b

Diferentes superíndices en la misma fila indican una diferencia significativa (P < 0.05).

T1: P4+FSH+PGF2 α ; T2: P4+FSH:LH+PGF2 α ; T3: P4+PGF2 α ; T4: estro natural