



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN
CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

**INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN EN LOS PROGRAMAS DE
SINCRONIZACIÓN DE ESTROS, SUPEROVULACIÓN
Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN OVEJAS**

PEDRO MOLINA MENDOZA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

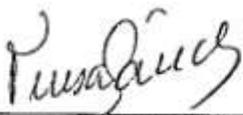
DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

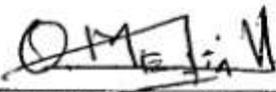
La presente tesis, titulada: **Influencia de la nutrición en los programas de sincronización de estros, superovulación y transferencia embrionaria en ovejas**, realizada por el alumno: **Pedro Molina Mendoza**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERIA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DRA. MA. TERESA SÁNCHEZ-TORRES ESQUEDA

ASESOR: 
DRA. MA. ESTHER ORTEGA CERRILLA

ASESOR: 
DR. JOSÉ G. HERRERA HARO.

ASESOR: 
DR. V. OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA

ASESOR: 
DR. ENRIQUE O. GARCÍA FLORES.

Montecillo, Texcoco, México, febrero de 2010

RESUMEN GENERAL

El aspecto nutricional y endocrino tiene influencia en la sincronización de estros y programas de superovulación, evaluándose su efecto en dos experimentos. En el experimento 1 se evaluaron dos regímenes alimenticios y dos programas de sincronización de estros, teniendo los siguientes tratamientos: ovejas sin pre-sincronización alimentadas con heno de avena (HS) o concentrado comercial (TS) y pre-sincronizadas con heno de avena (HP), o concentrado comercial (TP). En el experimento 1 la concentración de P_4 fue mayor en grupos HP y TP ($P < 0.05$). El inicio del estro y la elevación de LH fueron más rápido en los grupos HS y HP ($P < 0.05$). En el experimento 2 se evaluaron dos regímenes de alimentación, un grupo alimentado con concentrado comercial (T) y otro con un periodo previo de desnutrición con heno de avena (34 días), y posteriormente con concentrado comercial (PD), ambos grupos recibieron 100 gramos de grasa de sobrepeso siete días antes del inicio del programa de superovulación. En el experimento 2 la secreción de progesterona fue mayor ($P < 0.05$) en el grupo T, las concentraciones de insulina fueron superiores ($P < 0.05$) en el grupo PD. El número promedio de cuerpos lúteos fue de 9.5 vs 14.7 ($P < 0.05$) para T y PD, respectivamente y el porcentaje de embriones recuperados fue de 93 vs 71% ($P < 0.05$). Se concluye que la nutrición tiene un fuerte impacto en la respuesta a la sincronización de estros y la respuesta superovulatoria.

Palabras Clave: *Ovis aries*, grasa dorsal, superovulación, progesterona, insulina.

ABSTRACT

Nutritional and endocrine aspect have an influence on the synchronization of estrus and superovulation programs, so two experiments were evaluated. On experiment 1, two feed regimens and two programs of synchronization of estrus were evaluated, having the followings treatments: ewes without pre-synchronization and feed with oat heno (HS) or commercial concentrated (TS) and pre-synchronized with oat hay (HP), or commercial concentrated (TP). On the experiment 1 concentration of P_4 was higher on groups HP and TP ($P<0.05$). The onset of estrus and raise of LH was faster on the groups HS and HP ($P<0.05$). The duration of estrus was higher ($P<0.05$) on the groups P. On experiment 2 feed regimens were evaluated, a group feed with commercial concentrated (T) and other with a previous period of undernutrition with oat hay (34 days), and later with commercial concentrated (PD), both groups received 100 grams of bypass fat seven days previous the start of superovulation program. In experiment 2 the secretion of progesterone was higher ($P<0.05$) on the group T. Concentration of insulin was higher ($P<0.05$) on group PD. The average number of corpus luteum was 9.5 vs 14.7 ($P<0.05$) for T y PD, respectively, percentage of embryos recuperated was 93% vs 71% ($P<0.05$). We concluded under the present conditions, that nutrition has a strong impact on the response to synchronization and superovulatory response.

Keys Words: *Ovis Aries*, backfat, superovulation, progesterone, insulin.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

A Dios por haberme permitido llegar a este momento el cual comparto con mucho gusto con ustedes.

A mis Padres, Ma. Isabel Mendoza Castillo y Epifanio Molina Pardo, quienes han tenido fe en mis proyectos de vida por muy absurdos que en ocasiones estos parezcan.

A Mirthala y Evelyn Molina Mendoza, por estar en momentos buenos y malos, pero siempre juntos.

A todos mis tios, primos, sobrinos, que siempre se encuentran al pendiente y cerca de mí.

A Karina Hernández Guzmán y su apreciable familia por compartir este momento de alegría, además de todos los detalles que han tenido a mi persona.

De manera especial a M.V.Z. Jose Luis Cordero Mora, M.C. Rafael Nieto Aquino, Dr. Vicente Zamora, y Dr. Jesús Peralta Ortiz, por la amistad y paciencia, pero sobretodo por la confianza depositada en mi persona.

A todos mis amigos que en mi andar he encontrado y que no menciono nombres para evitar la equivocación de no tenerlos en cuenta es este momento, pero que ellos saben que en mi tienen a un amigo que siempre los recuerda con gran aprecio.

A todos ellos gracias.

AGRADECIMIENTOS

Los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación

Dra. Ma. Teresa Sánchez-Torres Esqueda, por su paciencia, amistad, confianza y consejos otorgados durante mi programa doctoral.

Dra. Ma. Esther Ortega Cerrilla, por su dedicación y acertadas correcciones en la elaboración del presente trabajo.

Dr. José G. Herrera Haro, por las correcciones estadísticas realizadas en el presente trabajo.

Dr. V. Octavio Mejía Villanueva, por su amistad, apoyo, y correcciones realizadas en el tema de recolección y transferencia embrionaria.

Dr. Enrique O. García Flores, por su amistad, apoyo, confianza y consejos otorgados durante mi formación académica.

Dr. Lorenzo Olivares Reyna, por la confianza, amistad y apoyo recibido durante mi programa doctoral.

Al Biologo Mario Cárdenas y Biologa Patricia Sánchez Canales, por el apoyo otorgado en la determinación de Hormona Luteinizante, progesterona e Insulina.

Al. M.V.Z. José Luis Cordero Mora, por su apoyo y sugerencias para el enriquecimiento del presente trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	X
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
1. Planteamiento del problema	13
2. Objetivos	17
2.1 General	17
2.2. Específicos	17
3. Hipótesis	17
4. Revisión de literatura.....	18
4.1. Ciclo estral de la oveja	18
4.2. Control endocrino del ciclo estral	19
4.2.1. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)	19
4.2.2. Hormona folículo estimulante (FSH)	20
4.2.3. Hormona luteinizante (LH).....	21
4.2.4. Estrógenos	22
4.2.5. Progesterona (P ₄)	23
4.2.6. Prostaglandina F _{2α}	24
4.2.7. Inhibina	25
4.3. Sincronización del ciclo estral	25
4.3.1 Sincronización con prostaglandinas	26
4.4. Transferencia de embriones.....	27
4.4.2 Estimulación de la superovulación	28
4.4.2. Influencia del estado ovárico en la respuesta a los tratamientos de superovulación	30
4.4.3. Variabilidad asociada con el uso de progestágenos.....	31
4.4.4. Efectos derivados de la presencia de un cuerpo lúteo.....	33
4.4.5. Efecto de la nutrición en la superovulación, calidad del oocito y embrión .	34
4.6. Foliculogénesis.....	34
4.6.1. Fase de crecimiento folicular basal (de folículo primordial a folículo preantral, con capacidad de respuesta a las gonadotropinas).....	35
4.6.1.1. C-kit/SCF (Factor de células troncales)	37
4.6.1.2. GDF- 9 (Factor de crecimiento y diferenciación 9).....	37

4.6.1.3. BMP-15 (Proteína morfogenética ósea 15)	37
4.6.1.4. Andrógenos	38
4.6.1.5. AMH (Hormona anti-Mülleriana)	38
4.6.2. Fase de crecimiento folicular tónico o de reclutamiento folicular (de folículo preantral a folículo antral, dependiente de gonadotropinas)	39
4.6.3. Crecimiento de folículo pre-antral a etapa final (fase sensible a gonadotropinas)	40
4.6.3.1. Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-I)	40
4.6.4. Fase de selección y dominancia folicular (de folículo dependiente de gonadotropinas a folículo dominante).....	41
4.6.5. Selección y dominancia	43
4.6.6. Ovulación	43
4.6.7. Atresia.....	44
4.7. Función y características del cuerpo lúteo.....	44
4.7.1. Luteogénesis.....	44
4.7.2. Tipos de células del cuerpo lúteo.....	45
4.7.3. Vida media del cuerpo lúteo.....	46
4.7.4. Luteólisis	47
4.8. Relación de la nutrición con la reproducción	49
4.8.1 Efecto de la condición corporal en la reproducción.....	50
4.8.2. Efecto de la energía y proteína sobre la reproducción.....	51
4.8.3. Dinámica folicular durante la restricción nutricional.....	51
4.8.4. Señales metabólicas	52
4.8.4.1. Ácidos grasos	52
4.8.4.2. Glucosa.....	53
4.9. Hormonas metabólicas	54
4.9.1. Insulina.....	55
4.9.2. Hormona de crecimiento (GH).....	57
4.9.3. IGF-I	58
4.9.4. Leptina	60
4.9.5. Grelina	65
4.10. Grasas.....	67
4.10.1. Digestión y absorción de grasas	67
4.10.2. Grasa protegida contra la acción de la microbiota del rumen (sales de calcio).....	68

4.10.3. Efecto de la grasas en la reproducción de rumiantes	69
4.10.4. Efecto en la dinámica folicular	70
4.10.6. Efecto en la función del CL y secreción de P ₄	71
4.10.8. Efecto en la secreción de LH.....	72
4.10.9. Efecto en la secreción de prostaglandinas.....	73
4.10.10. Calidad de folículos y embriones.....	75
5. Literatura citada.....	79
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PROGESTERONA, PICO PRE-OVULATORIO DE LH Y ESTRO EN OVEJAS CON DISTINTO REGIMEN ALIMENTICIO Y PROGRAMA DE SINCRONIZACIÓN DE ESTROS	103
1.1. Introducción.....	103
1.2. Materiales y métodos.....	104
1.3. Resultados	108
1.4. Discusión	112
1.5. Conclusiones.....	115
1.6. Literatura citada	116
CAPITULO II. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN MAS LA ADICIÓN DE GRASA DE SOBREPASO EN EL CORTO PLAZO SOBRE LA TASA OVULATORIA Y CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA E INSULINA.	119
2.1. Introducción.....	119
2.2. Materiales y métodos.....	120
2.3. Resultados	125
2.4. Discusión	129
2.5. Conclusiones.....	135
2.6. Literatura Citada	136
CONCLUSIONES GENERALES	140

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Inicio de la elevación, presentación, amplitud y duración del pico pre-ovulatorio de LH, en ovejas con diferente régimen alimenticio.	110
Cuadro 2. Inicio, presentación, amplitud y duración del pico pre-ovulatorio de LH, en ovejas con o sin pre-sincronización de estro.....	111
Cuadro 3. Inicio, presentación, amplitud y duración del pico pre-ovulatorio de LH, debido a la interacción del régimen alimenticio y programa de sincronización de estro.....	112
Cuadro 4. Tasa de ovulación (Cuerpo lúteo), número de embriones recuperados y clasificación de estos en el día 7 después de la monta en ovejas superovuladas alimentadas de forma normal o con previa desnutrición..	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental para la sincronización de estros	106
Figura 2. Concentración promedio de progesterona para los diferentes tratamientos durante el periodo experimental.	110
Figura 3. Protocolo experimental para el programa de superovulación y transferencia de embriones.....	121
Figura 4. Peso vivo para los diferentes tratamientos al inicio de la dieta, día de la inserción y retiro de la esponja	125
Figura 5. Medición de grasa dorsal para los diferentes tratamientos al inicio de la dieta, día de la inserción y retiro de la esponja	126
Figura 6. Concentración promedio de progesterona para los diferentes grupos de ovejas donadoras durante el programa de superovulación.....	127
Figura 7. Concentración promedio de insulina para los diferentes grupos de ovejas donadoras durante el programa de superovulación	128

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ARNm =	Acido Ribonucleico mensajero.
CSF=	Fluido cerebro espinal.
d =	Días
E ₂ =	Estradiol.
eCG=	Gonadotropina coriónica equina.
FSH=	Hormona Foliculo Estimulante.
GH=	Hormona de Crecimiento.
GnRH=	Hormona Liberadora de las gonadotropinas.
IGF-I =	Factor de crecimiento parecido a la Insulina.
kg=	Kilogramo.
LH=	Hormona luteinizante.
mm=	Milimetro.
MUFA's =	Ácidos grasos monoinsaturados.
NEFA's=	Acidos grasos no esterificados.
ng ml ⁻¹ =	nanogramos por cada mililitro.
P ₄ =	Progesterona.
PGF _{2α} =	Prostaglandina F _{2α} .
PUFA's=	Acidos grasos polinsaturados.
U.I.=	Unidades Internacionales.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La reproducción es costosa desde un punto de vista energético, pero preservarla es esencial para la sobrevivencia de las especies, por lo que para que se lleve a cabo de forma exitosa es necesario que el individuo tenga un balance homeostático entre consumo y gasto de energía, motivando con ello que muchas especies animales desarrollaran a través de la evolución mecanismos fisiológicos complejos, condicionando la reproducción en función a su estado metabólico. Factores ambientales como fotoperiodo, temperatura y nutrición tienen influencia en la reproducción de los mamíferos, sin embargo la nutrición tiene la mayor atención porque esta puede ser alterada fácilmente desde un punto de vista práctico (Dunn y Moss, 1992).

Las condiciones ambientales son variables a través del tiempo, por lo que los organismos continuamente tienen que adoptar diferentes estrategias reproductivas. Una estrategia común en los mamíferos es restringir la función reproductiva cuando las condiciones ambientales son desfavorables e iniciarlas cuando éstas son más propicias para engendrar y alimentar a la progenie, permitiendo con ello aumentar la probabilidad de un resultado exitoso en cada intento reproductivo. La estrategia anteriormente descrita permite deducir que la reproducción no es prioritaria cuando se encuentra en riesgo la supervivencia del organismo, por lo tanto la reproducción cesa antes de que un animal muera por deficiencia de algún nutriente en particular, llevándonos a la pregunta de cuáles son los mecanismos por los que el cambio en el consumo de alimento conlleva al cese de la actividad reproductiva, observándose que la relación entre nutrición y reproducción es compleja y frecuentemente la respuesta es variable e

inconsistente (O'Callaghan *et al.*, 2000). No obstante se ha observado que la inanición en bovinos jóvenes generada por el insuficiente consumo de energía se expresa en un retraso en el inicio de la pubertad, en hembras adultas causa la presentación de anestro mientras en machos adultos disminuye la producción de espermatozoides (Short *et al.*, 1990; Shillo, 1992). En rumiantes adultos que aumentan su consumo de nutrientes en el corto plazo (flushing) asociado a una condición corporal baja, tienen un aumento en la actividad reproductiva, no observándose este efecto en animales que presentan una condición corporal aceptable, no obstante en el caso específico de las hembras rumiantes no se observa algún efecto significativo en la tasa ovulatoria con diferente condición corporal (Foster y Nagatani, 1999).

1. Planteamiento del problema

La capacidad reproductiva de un individuo es dependiente del estado nutricional, lo cual refleja el balance homeostático entre el consumo y gasto de energía, lo que representa preservar su función reproductiva que es esencial para la sobrevivencia de sus genes. Lo anterior nos conduce a que la nutrición y reproducción se encuentran estrechamente vinculadas y los animales se han visto obligados a desarrollar complejos mecanismos fisiológicos, los cuales están en función de su estado metabólico (Krasnow y Steiner, 2006).

El potencial reproductivo de un organismo es gobernado por interacciones entre sus genes y su medio ambiente, aunque la fisiología reproductiva y comportamiento son por último de carácter genético, una multitud de factores ambientales puede modular la función reproductiva por actuar en el substrato genético del animal. El ambiente en los mamíferos no está solamente limitado a su hábitat físico (localización geográfica, clima, etc), sino también abarca su dieta e influencia social, por lo que el ambiente puede tener efectos bi-direccionales en la función reproductiva (promoviendo o inhibiendo la reproducción) (Martin y Banchero, 1999).

De todos los factores ambientales que inciden en el potencial reproductivo, la disponibilidad de alimento es quizá el que tiene mayor influencia, porque el alimento representa la mayor necesidad para la vida y por lo tanto para la reproducción, si el alimento es escaso el individuo debe ordenar sus prioridades entre todas las demandas que tiene y frecuentemente debe hacer sacrificos (Robinson, 1996). Crecimiento y reproducción son aspectos de menor prioridad y por lo tanto son los primeros en ser sacrificados, lo cual puede ser una adaptación evolutiva, porque sería desventajoso

para individuos desperdiciar energía en el crecimiento o para incrementar el tamaño de la población en tiempos en que el alimento es escaso, siendo igualmente detrimental al propio éxito del individuo (Krasnow y Steiner, 2006).

Existe evidencia de las consecuencias sobre la reproducción debido a una restricción de alimento en ovejas adultas (Thomas *et al.*, 1990), que incluye una reducción en la secreción de gonadotropinas y esteroides, afectando la maduración folicular, ciclicidad del estro, inhibición de la elevación pre-ovulatoria de LH y disminución de la receptividad sexual.

En hembras adultas existen tiempos donde la tasa de ovulación es particularmente sensible al suplemento de nutrientes, siendo en ovejas este tiempo de 6 meses antes de la monta ya que los folículos ováricos emergen del almacenamiento de folículos en etapa primordial y empiezan a crecer. La desnutrición en este tiempo reduce el número de folículos que emergen y por lo tanto el número que está disponible para ovular (Robinson, 1996). La reducción de la tasa de ovulación puede ser prevenida mejorando la nutrición en un periodo de 10 días antes de la monta (Robinson *et al.*, 2006). Viñoles (2003), sugiere que un efecto estimulador podría ser a través del mejoramiento en la nutrición en un periodo mas corto como es del día 8 al 4 antes de la ovulación (días 10-14 del ciclo estral) coincidiendo este periodo con la emergencia de la onda preovulatoria.

Mediante sus efectos en el control de la retroacción de la secreción de las gonadotropinas en las hormonas ováricas, la nutrición puede alterar el nivel y duración de la exposición de los folículos dependientes de gonadotropinas a FSH. Por otra parte se ha sugerido que nutrientes como glucosa, aminoácidos y metabolitos como insulina,

hormona de crecimiento, factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF's) y su acoplamiento a proteínas, han sido relacionadas a la respuesta ovulatoria debido a la nutrición y pueden operar a nivel de ovario disminuyendo la cantidad de FSH (Robinson, 1996; Downing y Scaramuzzi, 1991).

La progesterona es la hormona principal en el mantenimiento de la gestación, y se ha mostrado que la concentración de ésta tienen una relación inversa con el nivel de nutrición (Lozano *et al.*, 1998), lo cual puede ser debido al incremento en el catabolismo de esteroides, este hecho es importante debido a que puede explicar el incremento en la mortalidad embrionaria en ovejas alimentadas con dietas altas en energía, la mortalidad de embriones puede incrementarse tanto en ovejas sub-alimentadas como sobre-alimentadas. En la actualidad, la relación entre el efecto de la nutrición en las concentraciones de progesterona como el suero obtenido de la yugular y la mortalidad embrionaria no es del todo clara (Lozano *et al.*, 2003), sin embargo la P₄ no solo es importante durante la gestación sino que es una señal que regula el comportamiento reproductivo mediante una retroacción negativa en la secreción de GnRH y por consiguiente, de las gonadotropinas secretadas por la pituitaria (Skinner *et al.*, 2000), por medio de lo cual la nutrición también podría ejercer su efecto en la presentación del estro.

De acuerdo al contexto anteriormente descrito se planteó evaluar en un primer experimento el efecto de la nutrición en la secreción del cuerpo lúteo e interacción de estos dos efectos en la presentación, inicio y duración de estro, además del efecto en la secreción del pico pre-ovulatorio de la hormona luteinizante. En un segundo experimento se evaluó el efecto de una desnutrición previa, y un posterior cambio de

dieta más la adición de grasa de sobrepeso en la tasa ovulatoria, concentraciones de progesterona, insulina y tasa de gestación de embriones transferidos de ovejas donadoras a receptoras, lo cuales se obtuvieron por medio de un programa de sincronización de estro y superovulación.

2. Objetivos

2.1 General

Determinar el efecto de la condición corporal en un programa de sincronización de estros.

Determinar si la suplementación de energía en un corto plazo aumenta la tasa ovulatoria en un programa de superovulación.

2.2. Específicos

Determinar las concentraciones de progesterona en un ciclo sincronizado.

Determinar el pico de hormona luteinizante al retiro del progestágeno.

Determinar las concentraciones de insulina.

Determinar el número de cuerpos lúteos y la cantidad de embriones recuperados en las ovejas.

3. Hipótesis

Las ovejas con una menor condición corporal tendrán una menor respuesta reproductiva comparada con las hembras que presentan una mejor condición corporal.

El aumento en energía en un corto plazo de 6 días antes de que se presente la ovulación permitirá una mayor tasa ovulatoria en ovejas que han tenido restringido el alimento.

4. Revisión de literatura

4.1. Ciclo estral de la oveja

Las ovejas se clasifican como poliéstricas estacionales, en referencia a que su actividad reproductiva ocurre en la época del año en la que los días son más cortos en comparación a las noches, lo cual sucede en la estación de otoño e invierno (Bearden y Fuquay, 1984), este periodo se presenta como un proceso adaptativo, debido a que los nacimientos de las crías se producen en la primavera, cuando las condiciones ambientales y nutricionales son favorables para su supervivencia (Goodman, 1994). En este periodo de actividad reproductiva la hembra presenta lapsos de actividad cíclica ovulatoria con una duración media de 17 días, lo cual es denominado ciclo estral. La mayor parte del ciclo estral es comprendido por metaestro y diestro (12 a 14 días) que es caracterizada por la secreción continua de progesterona. Los días restantes del ciclo estral constituyen al pro-estro y estro (Hafez y Hafez, 2002), y es durante la cual se produce un periodo de receptividad sexual denominado estro o calor, con una duración media aproximada de 36 h, ocurriendo la ovulación de 24 a 30 h, después de iniciado el estro (Driancourt *et al.*, 1991).

En el caso particular de la oveja existe un periodo denominado anestro, caracterizado por una falta de expresión de signos de receptividad sexual y cambios en la dinámica del crecimiento folicular, donde los folículos no llegan a ovular, iniciando a finales de invierno o inicios de la primavera (Noel *et al.*, 1993).

4.2. Control endocrino del ciclo estral

El control del ciclo estral de la oveja es la resultante de la interacción de cuatro órganos distintos, como lo son hipotálamo, hipófisis, ovario y útero, ellos se encuentran comunicados principalmente a través de seis hormonas: hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), producidas en hipófisis; estradiol (E_2) y progesterona (P_4), liberadas desde el ovario y por último la prostaglandina $F_{2\alpha}$ liberada por el útero (Goodman, 1994). La secreción de gonadotropinas es controlada por mecanismos de retroacción que involucran al sistema nervioso central (SNC), la hipófisis anterior y las gónadas. El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es influenciado por factores externos vía sistema nervioso central y éste asegura la secreción de gonadotropinas, si es que existe una relación apropiada entre factores como: duración del día (fotoperiodo), temperatura ambiental, disponibilidad de alimento y condiciones físicas para la receptividad sexual (Fink, 1988).

4.2.1. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido (10 aminoácidos) con peso molecular de 1183 Da (Hafez y Hafez, 2002) y es secretada por el hipotálamo y transportada por el sistema portal hipofisario (Skinner *et al.*, 1995) encargándose de inducir la descarga preovulatoria de la LH y en consecuencia la ovulación. Durante el ciclo estral la GnRH es secretada en forma pulsátil, su frecuencia y amplitud de los pulsos varía con la etapa del ciclo (Moenter *et al.*, 1991). Estos cambios en el patrón de secreción de GnRH ocasionan un patrón apropiado de secreción de gonadotropinas, que es requerido para regular los cambios en la actividad

cíclica del ovario. Los cambios en la secreción hormonal del ovario regulan la secreción de gonadotropinas mediante un mecanismo de retroacción positivo o negativo, según sea el caso (Karsh *et al.*, 1997).

4.2.2. Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH estimula el crecimiento y maduración del folículo ovárico, de forma conjunta con la hormona luteinizante (LH), estimulando la producción de estrógenos en el ovario (Hafez y Hafez, 2002). Se han establecido algunas características del patrón de secreción de la FSH, observándose que una elevación coincide con el pico preovulatorio de LH y una segunda elevación 24 a 28 h después, cuando las concentraciones de LH han disminuido; por último, la cantidad de FSH disminuye hacia un nadir a la mitad de la fase lútea, permaneciendo en ese nivel hasta la onda preovulatoria del siguiente ciclo (Souza *et al.*, 1997).

Los valores máximos de los picos de secreción de FSH están entre 133 y 177 ng ml⁻¹, en tanto que sus valores medios durante el resto del ciclo estral se encuentran alrededor de 61.9 ± 2.8 ng ml⁻¹ (Pant *et al.*, 1977). Karsh *et al.* (1984) mencionan que la FSH puede tener una función permisiva en el desarrollo folicular debido a que las concentraciones circulantes son suficientes para permitir el crecimiento y maduración de folículos en cualquier momento del ciclo estral. La FSH también estimula en las células de la granulosa la secreción de factores reguladores como inhibina, activina y folistatina, entre otros factores, los cuales modulan la producción de estradiol y androgenos que, a su vez regulan los efectos de la FSH (Picazo y López Sebastián, 1995).

4.2.3. Hormona luteinizante (LH)

La LH es una glucoproteína secretada por la hipófisis anterior cuyos niveles basales actúan con la FSH para inducir la secreción de estrógenos en los folículos de Graff que han alcanzado su máximo desarrollo. La LH, presenta dos tipos de liberación durante el ciclo estral, la secreción tónica durante la fase progestacional o lútea y la cíclica o preovulatoria durante el estro (Padilla *et al.*, 1988), en ambos casos dicha liberación es regulada a través de la acción combinada de la progesterona (P_4) y estrógenos que se secretan en el cuerpo lúteo (CL) y en folículos, respectivamente. Por otro lado, a la elevación preovulatoria de LH se le atribuye la ruptura de la pared folicular y la ovulación (Murdoch, 1985).

En todas las especies la LH juega un papel crítico en el mantenimiento de la función lútea: interactúa con sus propios receptores, incrementando su concentración y número a partir de la ovulación, hasta alcanzar su liberación máxima durante la fase lútea media. La concentración de LH durante la fase lútea es de 3 a 5 ng ml⁻¹ y se libera con una frecuencia de un pulso cada 3-4 h (Karsh *et al.*, 1984; Padilla *et al.*, 1988).

Hacia el final de dicha fase del ciclo estral, poco antes del inicio del estro, la frecuencia de los pulsos de LH se incrementa a uno cada 30 minutos para estimular la maduración de los folículos. Alrededor del estro, cuando la concentración de P_4 es menor a 1 ng ml⁻¹, la frecuencia de liberación de LH es de 1 pulso h⁻¹, induciendo así la onda preovulatoria de LH. Los valores registrados durante el pico preovulatorio de LH varían de 30 ng ml⁻¹ hasta 184 o 250 ng ml⁻¹ en ovejas primíparas y adultas, teniendo una duración de 12 a 24 h (Karsh *et al.*, 1984; l'anson y Legan, 1988). Este patrón de secreción es regulado por la acción de los estrógenos del folículo mediante un

mecanismo de retroacción positiva sobre el área pre-óptica y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Karsh *et al.*, 1984).

Se ha demostrado que la secreción de LH en hembras castradas es mayor que en hembras enteras, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de control por retroacción negativa proveniente del ovario, el cual ejerce su efecto sobre el eje hipotálamo-pituitaria (Karsh *et al.*, 1984; Niswender y Nett, 1988). Así, la liberación tónica de la LH se regula también, durante los momentos posteriores al estro, a través de un mecanismo de retroacción negativa, por el cual al aumentar la concentración de P_4 , disminuye la frecuencia de los mismos por inhibición de la descarga pulsátil de LH (Karsh *et al.*, 1984; Whisnant y Goodman, 1988).

4.2.4. Estrógenos

Entre los cambios hormonales que se observan durante el ciclo estral de la oveja, se incluyen variaciones en la concentración de los estrógenos, especialmente las del 17β -estradiol (E_2), cuya máxima concentración ocurre durante el periodo preovulatorio, no obstante, se ha observado un primer aumento dos a tres días antes del pico preovulatorio de LH y otro durante la fase lútea temprana (Downey, 1980). Otros investigadores como Hauger *et al.* (1977) han reportado un aumento en los valores de estrógenos a la mitad del ciclo estral coincidiendo con la oleadas foliculares.

El pico preovulatorio de los estrógenos inicia 12 a 14 h antes del estro a partir de una concentración basal (11 pg ml^{-1}) y alcanza valores mayores a 21.1 pg ml^{-1} entre -8 y 0 h antes del estro, observándose nuevamente valores basales de 2 a 10 h después de iniciado el estro; la elevación de los estrógenos tiene una duración de 16 a 22 h (Pant *et al.*, 1977). La síntesis de estrógenos ocurre en los folículos antrales o preovulatorios

(Gayerie *et al.*, 1983). En ovejas se ha observado que el aumento de LH eleva la producción de estrógenos en los folículos, lo cual sugiere que la secreción de estrógenos depende de la LH y en consecuencia de la presencia de andrógenos aromatizables (Downey, 1980).

Durante la fase folicular tardía, un notable aumento en la concentración de E₂, induce la presentación de un marcado incremento (pico) en la secreción de GnRH, debido al efecto de retroacción positiva que ejerce el esteroide sobre el hipotálamo medio basal (Moenter *et al.*, 1990), mediante el cambio de un patrón de secreción estrictamente pulsátil a otro que lleva a cabo una descarga ininterrumpida del decapeptido (Evans *et al.*, 1995). La previa exposición (priming) del ovario a P₄ durante la fase lútea es importante para la expresión completa de dicha acción de retroacción positiva del estradiol sobre la secreción de GnRH (Caraty y Skinner, 1999).

4.2.5. Progesterona (P₄)

En el ciclo reproductivo de las ovejas, la progesterona actúa como el esteroide ovárico dominante presente en la circulación periférica. Concentraciones basales (0.2 ng ml⁻¹) se observan desde uno o dos días antes del estro hasta cuatro días después; a partir del quinto día, la concentración aumenta a valores de 2 a 4 ng ml⁻¹ disminuyendo a partir del día 12 día del ciclo estral, hasta alcanzar concentraciones basales (Quirke *et al.*, 1979).

Durante la fase lútea, las crecientes concentraciones de progesterona secretadas por el cuerpo lúteo son capaces de bloquear la ocurrencia tanto del pico de GnRH como el de la LH, lo que indica que, en la oveja, la P₄ modula la frecuencia en los pulsos de GnRH y subsecuentemente LH, por medio de un sistema de acción central altamente sensible

y específico que involucra sus propios receptores a nivel neuronal (Goodman y Karsh, 1980; Skinner *et al.*, 1998). Después de la luteólisis, las concentraciones de P_4 descienden rápidamente hasta llegar a niveles casi indetectables, permitiendo que la secreción de GnRH deje de ser inhibida (Hadley, 1988).

El ambiente endocrino al cual ha sido expuesto el folículo antes de ovular posee una influencia fundamental en la posterior función del cuerpo lúteo. Las fases lúteas inadecuadas están caracterizadas por niveles subnormales de progesterona (menos de 1.5 ng ml^{-1}) las cuales pueden estar o no asociadas con una destrucción prematura del cuerpo lúteo. Existen varios mecanismos probables involucrados con la etiología de un cuerpo lúteo subnormal. En resumen, P_4 y E_2 ejercen secuencialmente efectos opuestos de retroacción en la secreción de GnRH durante el ciclo estral de la oveja, sin embargo existe también una evidencia clara de que los sistemas afectados por éstos esteroides se encuentran íntimamente relacionados, dando lugar a una secreción preovulatoria masiva de GnRH, la cual controla la ovulación y el comportamiento de estro (Caraty y Delaleux, 2001).

4.2.6. Prostaglandina $F_{2\alpha}$

En la década de los 30's, fue descubierta una sustancia en los extractos de semen humano y de las vesículas seminales del borrego, la cual causaba contracción de los músculos lisos y cambios en la presión sanguínea. Esta sustancia fue denominada por Von Euler "prostaglandina", puesto que se creía que se secretaba en la próstata. Las prostaglandinas fueron los primeros derivados del ácido araquidónico que se descubrieron. Todas las prostaglandinas son variantes de un ácido graso insaturado, el ácido prostanoico. La $PGF_{2\alpha}$ se ha convertido en una sustancia sumamente conocida

en el campo de la reproducción como resultado del descubrimiento de su capacidad como agente luteolítico (Hadley, 1988).

En los días 12-14 del ciclo estral (fase lútea tardía), el útero comienza a incrementar la secreción de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) la cual interfiere la unión de la LH con el sistema de la enzima adenilato ciclasa de la células lúteas, impidiendo la producción de P_4 . El cuerpo lúteo (CL) es particularmente vulnerable a la acción luteolítica de la $PGF_{2\alpha}$ durante los largos periodos entre uno y otro pulso de LH. Simultáneamente, la $PGF_{2\alpha}$ estimula la liberación de oxitocina por parte del CL, misma que estimula al útero para liberar aún más $PGF_{2\alpha}$. Eventualmente la producción de $PGF_{2\alpha}$ es suficiente para que ocurra la regresión de CL (Baird, 1992).

4.2.7. Inhibina

La inhibina es una hormona glicoproteica producida por las células de la granulosa, presente en altas concentraciones en el fluido folicular. En ovejas inmunizadas contra inhibina se incrementa la tasa ovulatoria por lo que se cree que este péptido desempeña un papel importante en el control de la secreción de FSH y por lo tanto en la regulación de la tasa ovulatoria (Wheaton *et al.*, 1996).

4.3. Sincronización del ciclo estral

La sincronización del ciclo estral normalmente se realiza cuando las ovejas están en la época reproductiva, debido a que su sistema neuroendocrino se encuentra activo y los ovarios tienen cuerpos lúteos y folículos en diferentes etapas de crecimiento (Cunningham, 2003). El control de los ciclo estales es una de las estrategias para facilitar la utilización de la inseminación artificial y puede ser usada en programas

diseñados con el fin de reducir el intervalo entre partos, producir grupos de crías más homogéneos y para el establecimiento de sistemas de manejo intensivos, tales como los tratamientos hormonales destinados a la producción de partos múltiples (Hafez y Hafez, 2002), además de que ofrece a los productores la oportunidad para acceder a un rápido y expansivo mejoramiento genético de sus rebaños (Kojima, 1991). Del mismo modo, la sincronización de los ciclos estrales permite que las ovejas y los corderos sean manejados en forma más uniforme en los aspectos sanitarios, de nutrición, comercialización y procesado (Hafez y Hafez, 2002).

Durante las últimas décadas, una gran cantidad de métodos han sido desarrollados con el fin de lograr una eficiente sincronización del ciclo estral, dentro de los cuales destacan dos: el primero consiste en tratar exógenamente a todos los animales con progesterona natural o con progestágenos (progesterona sintética). Teóricamente, todos los animales iniciarán el estro y ovularán después de la disminución de la progesterona o de los progestágenos después de la remoción de los dispositivos utilizados. El segundo método pretende inducir la regresión del cuerpo lúteo de los animales mediante la inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos, después de lo cual las hembras entraran en estro y ovularan (Kojima, 1991).

4.3.1 Sincronización con prostaglandinas

Este método consiste en utilizar los efectos luteolíticos de las $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretadas por el endometrio de la oveja a partir del día 12 del ciclo estral, cuando no hubo fecundación en condiciones naturales (Fitz *et al.*, 1993). Su acción consiste en inducir la regresión prematura del cuerpo lúteo, con lo que se interrumpe la secreción de progesterona y se inicia un nuevo ciclo. McCracken *et al.* (1995), al igual que Fitz *et al.* (1993) han

reportado que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa luteólisis por su acción vasoconstrictora, provocando una reducción en el flujo local de sangre al cuerpo lúteo. Las prostaglandinas y sus análogos sintéticos, actúan solamente sobre los cuerpos lúteos conocidos como activos que se encuentran a partir del día 5 al 12 del ciclo estral de la oveja, fuera de estos días las prostaglandinas no tienen efecto (Scaramuzzi, 1984), de tal forma que una sola aplicación sincroniza a un 60-70% de las ovejas. Una doble aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos con un intervalo de 9 a 10 días sincroniza al 100% del rebaño. En ambos métodos el estro se presenta en promedio 40 h después de aplicada la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

4.4. Transferencia de embriones

La transferencia de embriones (TE) consiste en la obtención de varios embriones generados por una hembra donante mediante la estimulación de los ovarios con tratamientos hormonales, para posteriormente transferirlos a hembras receptoras. Entre sus objetivos se encuentra el incrementar el número de crías por hembra con un alto valor genético, además de acortar el intervalo generacional y como consecuencia incrementar el avance genético. Por otra parte esta técnica tiene fundamentos de orden sanitario debido a que reduce considerablemente el riesgo de algunas infecciones ya que los embriones presentan una barrera natural contra bacterias y virus (Stringfellow *et al.*, 1991) y por último esta técnica ha sido propuesta para la preservación de especies en peligro de extinción.

Los primeros trasplantes de embriones en caprinos y ovinos se realizaron hace 50 años (Warwick *et al.*, 1934). No obstante, su uso práctico es limitado debido a una alta variabilidad en el número de embriones con calidad de ser transferibles y de crías nacidas. Esta variabilidad se ha relacionado a una falta de uniformidad en la respuesta

ovárica a los tratamientos de superovulación, entre las posibles causas destacan factores extrínsecos (origen, pureza y protocolo de administración de las gonadotropinas) e intrínsecos (raza, edad y estados nutricional y reproductivo), sin embargo, se señala que los factores más importantes serían aquellos de origen ovárico (González *et al.*, 2004).

4.4.2 Estimulación de la superovulación

La estimulación ovárica inicialmente se realizó con la gonadotropina coriónica equina (eCG, por sus siglas en inglés), la cantidad usada se encontraba en un rango de 1500 a 2000 U.I. en ovejas, en una sola aplicación generalmente 48 horas antes del retiro del tratamiento progestacional (Armstrong y Evans, 1983; Armstrong *et al.*, 1983). La eficacia de la eCG resultó variable, presentando una alta incidencia de folículos que no ovulaban, además de una pobre “calidad” de embriones. Otros tratamientos incluyeron HAP (extracto de pituitaria anterior de equino) y hMG (gonadotropina menopausica humana) con resultados variables (Moore y Eppleston, 1979; Schiewe *et al.*, 1985;). La purificación y disponibilidad comercial de FSH de pituitarias de porcino (FSH-p; Foltropin; Stimufol; Super-Ov) y ovino (Embryo-S; Ovagen) marcaron el inicio de nuevas estrategias superovulatorias (Vivanco, 1998). Las inyecciones de FSH se efectúan de manera general en dosis repetidas cada 12 horas (debido a la corta vida media de la FSH) ya sea en niveles constantes o decrecientes, iniciándose por lo general 3 días antes de la suspensión del tratamiento progestacional, dando la última inyección, al momento de la suspensión del tratamiento.

Algunos autores han encontrado una pérdida de sensibilidad con disminución en la respuesta ovulatoria en ovejas sometidas a repetidos tratamientos superovulatorios con

FSH de origen porcino debido a la formación de anticuerpos contra pFSH (Remy *et al.*, 1991). Esta disminución no ha sido observada cuando ovejas y cabras han recibido tratamientos sucesivos con FSH de origen ovino (Baril *et al.*, 1992), no obstante Vivanco (1998) menciona que han estimulado con FSH de origen porcino a ovejas de la raza Lamb XL y ATC por 7 veces al año hasta 6 años consecutivos y no ha observado disminución en la tasa ovulatoria.

En lo referente a la aplicación de FSH se recomienda la aplicación de inyecciones decrecientes (Torres *et al.*, 1987). Algunos trabajos han sugerido el uso de una determinada relación LH/FSH, observando que mientras mas bajo el nivel de LH mejor es la respuesta (D'Alexandro *et al.*, 1997). Nuevos productos en el mercado (por ejemplo Ovagen) prácticamente no contienen LH y algunos con un nivel máximo de 5% (Folltropin-V), sin embargo, con el uso de estos como único estímulo para la superovulación, la respuesta es pobre, resultando paradójico el introducir eCG como un producto de alta actividad de LH en tratamientos basados en FSH con bajo nivel de contaminación de LH (Vivanco, 1998). Los primeros ensayos recomendaron la administración de eCG durante la primera inyección de FSH sin un incremento en la tasa ovulatoria (Greaney *et al.*, 1991), posteriormente se inyectó eCG 48 horas antes de la terminación del tratamiento progestacional, combinándola con dosis repetidas de FSH o una sola dosis de FSH al momento de la aplicación de eCG (D'alexandro *et al.*, 1997), con resultados satisfactorios.

Por otra parte se ha sugerido la neutralización del efecto de la inhibina mediante el uso de anticuerpos contra esta sustancia, en hembras destinadas para ser ovuladas,

encontrándose resultados prometedores en hembras jóvenes, pero no en hembras adultas (Vivanco, 1998).

4.4.2. Influencia del estado ovárico en la respuesta a los tratamientos de superovulación

Uno de los factores que mas influyen en la respuesta individual a los tratamientos de superovulación es la población folicular de cada oveja al inicio del tratamiento, considerándose que la respuesta ovárica está directamente relacionada con el número de folículos pequeños (2-3 mm), que han alcanzado el estadio de receptivos a gonadotropinas y son capaces de crecer hasta el tamaño preovulatorio en respuesta al estímulo exógeno con FSH (González *et al.*, 2002b), mencionándose que un mayor número de estos folículos elevan la tasa ovulatoria y el número de embriones, independientemente del tipo de gonadotropina utilizada (González *et al.*, 2000).

La presencia de folículos grandes o dominantes antes de la estimulación ovárica se encuentra relacionada negativamente con la respuesta a la tasa ovulatoria, debido a que si bien la presencia de un folículo dominante al inicio de un tratamiento con FSH no parece afectar significativamente la tasa ovulatoria (González *et al.*, 2000), se ha relacionado con un menor número y calidad de embriones obtenidos (González *et al.*, 2002b), considerándose que la condición ideal del estado ovárico al inicio los tratamientos superovulatorios consiste en una población folicular formada por el mayor número posible de folículos de 2-3 mm, sin actividad estrogénica y con buena capacidad de respuesta frente a las gonadotropinas, convirtiéndose la eliminación de folículos dominantes en uno de los principales objetivos para incrementar el número de embriones viables obtenidos de una hembra.

La ablación quirúrgica de los folículos dominantes ha demostrado buenos resultados en ganado vacuno, teniendo un aumento significativo en los rendimientos superovulatorios en respuesta al tratamiento con FSH (Bungartz y Niemman, 1994). En ovejas también se ha observado la eficacia de ésta técnica (González *et al.*, 2002a), pero debido al pequeño tamaño corporal y a las características del tracto genital de pequeños rumiantes, su aplicación requiere la utilización de técnicas de laparoscopia lo que aumenta significativamente los inconvenientes derivados del manejo de los animales, motivando a utilizar como alternativa tratamientos farmacológicos.

4.4.3. Variabilidad asociada con el uso de progestágenos

Los protocolos de superovulación usualmente incluyen la administración de un tratamiento superovulatorio de FSH en los últimos días de un tratamiento progestacional. La administración de progestágenos durante 12 d tiene la función de suprimir la secreción de LH (Goodman y Karsh, 1980) en ovejas, lo que permite asegurar la ocurrencia espontánea de luteólisis antes del retiro de la esponja y la inducción de estro, la elevación de LH y ovulación controlada independientemente de la época o tiempo del ciclo cuando es aplicada (Robinson, 1965). Las concentraciones de progestágenos en plasma se incrementan durante las primeras 48 horas después de la inserción de la esponja (Robinson, 1965) y a partir de este momento empiezan a disminuir alcanzando concentraciones demasiado bajas para estimular la actividad del cuerpo lúteo al final del tratamiento (Gaston-Parry *et al.*, 1988). En esta forma, el protocolo del progestageno no suprime la LH al nivel realizado durante la fase luteal (Kojima *et al.*, 1992) e induce un inadecuado desarrollo folicular, con folículos grandes esteroideogénicos persistentes (Viñoles *et al.*, 1999; Flynn *et al.*, 2000). La persistencia

de folículos viejos en su fase estática o inicio de la fase atresica ha sido descrita principalmente durante la fase lutea con bajos niveles de progesterona; la ovulación de estos folículos resultó en una disminución en la fertilidad (Ungerfeld y Rubianes 1999) en algunos estudios, pero no en otros (Evans *et al.*, 2001). Subsecuentes estudios establecieron una relación con alteraciones en la competencia de desarrollo del oocito (Mihm *et al.*, 1999) y alteraciones del ambiente uterino (Binelli *et al.*, 1999). Estos efectos son incrementados en protocolos superovulatorios en los cuales insuficientes concentraciones de progestagenos al final del tratamiento inducen una alta variabilidad al inicio de estrógeno y pico de LH en animales del mismo tratamiento (Gaston-Parry *et al.*, 1988), causando una asincronía entre el tratamiento superovulatorio y la ovulación (Scudamore *et al.*, 1993), fallas ovulatorias (Kafi y McGowan, 1997) y anomalías en el desarrollo de competencia de los oocitos o el desfase del proceso normal de fertilización e inicio del desarrollo embrionario (Greve *et al.*, 1995).

Estudios iniciales de Thompson *et al.* (1990) mostraron las ventajas de usar un segundo dispositivo de liberación de drogas controlada (CIDR). Los efectos detrimentales de las bajas concentraciones de progesterona o progestagenos sería exacerbado en hembras cíclicas en las cuales un cuerpo luteo persiste después del retiro de la esponja. Por lo tanto, los tratamientos superovulatorios pueden incluir la inserción de una segunda esponja de progestageno en combinación con una inyección de un análogo de prostaglandina (González *et al.*, 2004) para inducir luteólisis antes del retiro del progestageno.

La mejor respuesta a un tratamiento superovulatorio, tanto en la tasa de ovulación y número de embriones fue obtenida al utilizar dos esponjas intravaginales juntas con

una sola inyección de cloprostenol. El reemplazo de la esponja el día 7 aumentó el rendimiento final por incrementar la tasa de viabilidad y número de embriones viables obtenidos sin un efecto en el número total de embriones recuperados. En contraste, la inyección de cloprostenol incrementó significativamente el porcentaje de ovejas superovuladas, la tasa de ovulación media y el número promedio de embriones totales y viables. El uso de dos esponjas mas una inyección de cloprostenol favoreció un incremento en la tasa ovulatoria y en el total de embriones viables recuperados, comparado con un tratamiento clasico con una sola esponja (González *et al.*, 2004).

4.4.4. Efectos derivados de la presencia de un cuerpo lúteo

El número y calidad de embriones obtenido de ovejas superovuladas con varias dosis de FSH es afectado por la presencia o ausencia del cuerpo lúteo al momento de finalizar el tratamiento progestacional, observándose que la ausencia de un cuerpo lúteo causa un efecto negativo en la viabilidad de los embriones a través del un aumento en la tasa de degeneración (González *et al.*, 2004).

Estas diferencias pueden ser inducidas por factores relacionados al protocolo de sincronización usado durante la superovulación, y son la causa de alteraciones en los patrones de crecimiento follicular y dominancia (Leyva *et al.*, 1998). Estos cambios son modificados por el ambiente luteal al tiempo de la inserción de progestágenos. Una practica común es la inserción de esponjas con progestágenos a un grupo de ovejas en las cuales la etapa del ciclo estral no es conocida, pueden presentarse concentraciones altas de P_4 en ovejas (progestágenos de la esponja mas progesterona endógena del cuerpo lúteo) y ovejas con niveles bajos de P_4 (solo progestágeno de la esponja) dependiendo del tratamiento. La actividad y vida media de los folículos grandes se

acorta cuando la esponja se aplica en presencia de un cuerpo lúteo y se alarga por la ausencia del mismo (Leyva *et al.*, 1998). Este hecho explica la mejor respuesta reportada si se usan dos esponjas consecutivas para sincronizar el ciclo en protocolos superovulatorios, sin embargo aún cuando se apliquen dos esponjas de progestágeno, existirán diferencias entre ovejas, dependiendo del momento de la inserción, inicio mediados o final de la fase lutea o bien durante la fase folicular.

4.4.5. Efecto de la nutrición en la superovulación, calidad del oocito y embrión

La relación entre nutrición y producción de embriones no ha sido totalmente establecida, debido a que no se han observado diferencias en la tasa ovulatoria (Doney *et al.*, 1981), no obstante una inadecuada nutrición puede comprometer la competencia del oocito (O'Callaghan *et al.*, 2000), la función lutea (Jabbour *et al.*, 1991) y desarrollo de los embriones (Abecia *et al.*, 1997). Las respuestas superovulatorias mas bajas y la disminución de la calidad de oocito y de los embriones se han encontrado en animales alimentados en dietas *ad-libitum* cuando se comparan con hembras alimentadas con la mitad de los requerimientos de mantenimiento (O'Callaghan *et al.*, 2000; Lozano *et al.*, 2003).

4.6. Foliculogénesis

La foliculogénesis es definida como todos los procesos de crecimiento y maduración que sufren los folículos ováricos desde la estapa primordial hasta la ovulación, teniendo como finalidad desde un punto de vista biológico la producción de uno (para especies monovulatorias) o más (para especies multi-ovulatorias) oocitos que sean capaces de ser fertilizados y que tengan éxito en el desarrollo embrionario (Driancourt, 1991).

La dinámica de crecimiento de los folículos es controlada por el equilibrio entre los mecanismos de estimulación e inhibición, los cuales pueden actuar a nivel sistémico así como intraovárico, siendo ejemplo de lo primero las hormonas secretadas en el torrente circulatorio por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario como son las gonadotropinas de origen hipofisiario (FSH y LH) que tienen una acción estimulante, y el estradiol e inhibina, tienen una actividad inhibitoria; los segundos tienen su origen en el ovario, entre los cuales se encuentran los factores estimuladores como el factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF).

4.6.1. Fase de crecimiento folicular basal (de folículo primordial a folículo preantral, con capacidad de respuesta a las gonadotropinas)

En gran parte de los mamíferos, las oogonias alcanzan la fase de oocito primario durante el desarrollo fetal para después permanecer en profase meiótica constituyendo una reserva de folículos primordiales que accederán a la etapa de crecimiento a lo largo de la vida reproductiva. Se ha determinado que en el ovario del feto ovino ya existen folículos desde el día 70 de la gestación, completando la dotación folicular (40,000-300,000 folículos) al momento del nacimiento (Cahill *et al.*, 1979).

Durante el desarrollo prepuberal existe una reducción, de manera que en las ovejas adultas existen alrededor de 12,000 y 86,000 folículos primordiales y entre 100 y 400 en crecimiento, de los cuales solo unos 10-40 son visibles en la superficie ovárica, dependiendo de la raza (Rubianes, 2000).

El folículo primordial está estructuralmente constituido por el oocito, cual no tiene una zona pelúcida y se encuentra rodeado de un estrato de células epiteliales planas

precursoras de las células de la granulosa, y una lámina basal externa (Webb *et al.*, 2004).

En la oveja, al igual que otras especies, el inicio del crecimiento del folículo primordial no sólo es independiente de la FSH y LH (Webb *et al.*, 2004), sino que al parecer es desencadenado por el propio oocito (Reddoch *et al.*, 1986), experimentado éste la síntesis de ARN para sintetizar ciertas proteínas, algunas de las cuales están destinadas a formar la zona pelúcida, e induciendo la primera diferenciación y proliferación de células epiteliales (pre-granulosa), transformándose en células cúbicas (granulosa) (Webb *et al.*, 2004). En esta fase tiene también lugar la diferenciación de las células tecales que se sitúan concéntricas a la lámina basal.

Además, se menciona que este crecimiento está influido por dos hormonas intraováricas que son el estradiol y testosterona (Schreiber y Ross, 1976) para las cuales se tiene receptores en fases muy tempranas, así como el factor de crecimiento de tipo insulínico y factor de crecimiento epidermal (Driancourt, 1991), no obstante parece ser controlado por una “comunicación” entre el oocito y células de la granulosa. Las hormonas de la pituitaria LH y FSH no resultan necesarias para el crecimiento y diferenciación del folículo primordial a folículo pre-antral, sugiriéndose que factores de crecimiento producidos localmente a través del oocito o por células de la granulosa parecen ser los elementos indispensables en etapas tempranas de la foliculogénesis.

Factores como la hormona anti-mulleriana (AMH), factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), y factor de células troncales (C-kit/SCF) pueden estar involucrados en el reclutamiento de folículos primordiales en ratones, pero el mecanismo aún no es del todo claro (Parrot y Skinner, 1999, Vitt *et al.*, 2000; Durlinger *et al.*, 2002).

4.6.1.1. C-kit/SCF (Factor de células troncales)

El receptor de la tirosina quinasa (c-kit) y su ligando SCF han sido localizados en el oocito y células de la granulosa. En ratones, existen mutaciones que previenen la producción de SCF resultando en una detención del crecimiento durante la etapa de folículo primario (Huang *et al.*, 1993). *In vitro* se ha observado que en ovarios de ratas pre-pubescentes el reclutamiento y desarrollo de folículo basal a folículo primordial es bloqueado por la adición de anticuerpos contra c-Kit y su ligando SCF, apoyando la hipótesis que estos dos elementos tienen un papel en el reclutamiento y crecimiento del folículo basal (Parrot y Skinner, 1999).

4.6.1.2. GDF- 9 (Factor de crecimiento y diferenciación 9)

El GDF-9 es secretado por el oocito y pertenece a la familia de TGF- β , se piensa que tiene una función importante en el reclutamiento y crecimiento del folículo basal y su ausencia causa infertilidad en ratones (Dong *et al.*, 1996). Por otra parte se ha observado que la administración de GDF-9 en ratas jóvenes causa un incremento en el número de folículos primarios y antrales y reduce el número de folículos primordiales (Vitt *et al.*, 2000).

4.6.1.3. BMP-15 (Proteína morfogenética ósea 15)

BMP-15 también llamada GDF-9B, debido a su alta homología con GDF-9, pertenece a la superfamilia TGF- β , se ha observado que ratones sin capacidad de producir BMP-15 tienen una ligera disminución de la fertilidad debido a problemas en la ovulación (Yan *et al.*, 2001). Así mismo, ovejas deficientes en BMP-15 son estériles, deteniendo el crecimiento folicular en la etapa de folículo primario (Galloway *et al.*, 2000).

4.6.1.4. Andr6genos

Los andr6genos estimulan el reclutamiento de fol6culos primordiales en los monos y tienen un efecto correlacionado con un incremento en la expresi3n de receptores para IGF-I e IGF-II en los ovocitos de los fol6culos primordiales (Vendola *et al.*, 1999).

Otros factores como el bFGF (factor b6sico de crecimiento de fibroblastos), NGF (Factor de crecimiento neural) e insulina tambi3n han sido involucrados en la estimulaci3n del reclutamiento y el crecimiento del fol6culo basal (Dissen *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2001; Kezele *et al.*, 2002).

4.6.1.5. AMH (Hormona anti-M6lleriana)

La AMH podr6a regular de forma negativa el reclutamiento y crecimiento del fol6culo basal. Los ovarios de ratones incapaces de producir AMH contienen fol6culos primordiales, pero menos fol6culos pre-antrales y antrales, teniendo un m6s r6pido agotamiento (Durlinger *et al.*, 1999), esta disminuci3n se debi3 a un reclutamiento acelerado de fol6culos primordiales. De hecho la adici3n de AMH a cultivos de ovarios de rat3n causa la inhibici3n del 40% del n6mero de fol6culos (Durlinger *et al.*, 2002).

La complejidad de este sistema regulador es reforzada por la interacci3n entre los factores anteriormente descritos. Una interacci3n entre SCF y GDF-9 ya se describi3 anteriormente. Adem6s existen mecanismos de retroacci3n entre el CFS, CKIT y BMP-15, en donde, el BMP-15 estimula la expresi3n de los fluidos que son cr6ticos en las c6lulas de la granulosa y el SCF inhibe la expresi3n de BMP-15 por el ovocito (Otsuka y Shimasaki, 2002). Es posible que acciones e interacciones importantes difieran entre especies, por ejemplo, las mutaciones de c-kit en mujeres no parece afectar la funci3n reproductiva, en contraste a lo observado en ratones (McGee y Hsueh, 2000). Del

mismo modo, BMP-15 parece esencial para el crecimiento del folículo en ovinos, pero no en ratones.

4.6.2. Fase de crecimiento folicular tónico o de reclutamiento folicular (de folículo preantral a folículo antral, dependiente de gonadotropinas)

Se define como el conjunto de folículos pequeños que presentan una cavidad denominada antro. En ovejas se presentan de dos a cuatro oleadas de crecimiento folicular en un ciclo estral, y en la mayoría de los casos el folículo ovulatorio es el de la última oleada (Evans, 2003). Se observa que un aumento transitorio en las concentraciones periféricas de FSH está correlacionado con el inicio de una nueva oleada de folículos (Viñoles *et al.*, 1999; Bartlewski *et al.*, 2000).

Cuando el folículo primario está completamente desarrollado y posee teca interna se encuentra expuesto al medio hormonal del plasma periférico; así, su desarrollo posterior es dependiente de factores extraováricos, principalmente FSH (Driancourt *et al.*, 1987). Los requerimientos de gonadotropinas por parte de los folículos primarios para iniciar esta fase de crecimiento son hasta el momento desconocidos, no obstante se ha observado que al retirar estas hormonas mediante hipofisectomía se causa una detención en la formación de folículos antrales, por lo tanto la presencia de gonadotropinas en esta etapa permite al folículo entrar en un proceso de reclutamiento, produciéndose la diferenciación a folículo secundario el cual forma un antro o cavidad llena de líquido. Cahill y Mauleon (1980), mencionan que los folículos comienzan a formar el antro cuando alcanzan un tamaño de 0,2 mm de diámetro; al principio el incremento de tamaño es lento, pero entre los 0,5 y 2 mm se transforma en un proceso

muy rápido que dura aproximadamente 5 días y que se debe casi exclusivamente a la acumulación de líquido folicular en dicho antro.

La FSH actúa, además, induciendo la formación de receptores para LH en las células de la granulosa (Richards y Midgley, 1976), aumentando su número y sensibilidad desde que aparecen en el folículo de 2,5 mm (McNeilly *et al.*, 1986), hasta ser los predominantes en el folículo preovulatorio.

Los folículos de mayor tamaño que han entrado en el proceso de reclutamiento comienzan a secretar elevadas cantidades de estradiol e inhibina que inducen, a nivel hipofisario, una disminución en la secreción de FSH.

La liberación folicular de estrógenos se produce por un mecanismo en el que intervienen tanto la capa granulosa como la teca interna (Ryan *et al.*, 1968) estimuladas por las gonadotropinas séricas (Armstrong y Papkoff, 1976). Las células de la teca interna, inducidas por la acción de la LH, se diferencian (Fortune *et al.*, 1988) y secretan andrógenos, principalmente androstenodiona (Erickson y Ryan, 1976). Las células de la granulosa convierten los andrógenos en estrógenos por medio de la actividad aromatasas, capacidad enzimática adquirida por acción de la FSH.

4.6.3. Crecimiento de folículo pre-antral a etapa final (fase sensible a gonadotropinas)

4.6.3.1. Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-I)

En ratones el IGF-I parece estar involucrado en el desarrollo de folículos que presentan antro, de hecho la inactivación de genes que expresan los IGF-I detienen el desarrollo folicular en la etapa de folículos pre-antrales y son incapaces de responder al estímulo con gonadotropinas (Baker *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997). Los IGF-I estimulan la

expresión de receptores para FSH en células de la granulosa y por lo tanto las hacen susceptibles a la acción de la FSH (Zhou *et al.*, 1997).

4.6.4. Fase de selección y dominancia folicular (de folículo dependiente de gonadotropinas a folículo dominante)

En esta fase se lleva a cabo la selección de los folículos que van a ovular, teniendo que en la fase folicular del ciclo estral, el incremento de la concentración de estrógenos e inhibina ejerce un efecto de retroacción negativa en la hipófisis, dando como consecuencia una disminución progresiva en la secreción de FSH, disminuyendo las concentraciones plasmáticas por debajo del umbral necesario para el mantenimiento de otros folículos dependientes de gonadotropinas (Martin *et al.*, 1988), así, al final de la fase folicular el total de folículos susceptibles de ser reclutados, son solo aquellos capaces de soportar bajas concentraciones de FSH para continuar su desarrollo permitiéndoles pasar a la fase de selección, lo cual conduce a la diferenciación de un folículo terciario susceptible de ovular, con lo cual el resto de los folículos al no tener un aporte adecuado de FSH sufren de atresia.

Existen diferencias para cada individuo en el umbral de sensibilidad a FSH, lo que permite explicar la enorme variabilidad en la tasa ovulatoria en respuesta a los tratamientos de superovulación (Picton y McNeilly, 1991). Al parecer, el comienzo del mecanismo de selección requiere una inducción inicial crítica de la actividad aromatasa y capacidad de respuesta a la LH. De esta manera, cuando se alcanza el umbral de FSH en un folículo (Hillier *et al.*, 1988) éste será el primero en aromatizar andrógenos tecales y en producir estrógenos, que sensibilizan localmente a las células de su propia granulosa al efecto de la FSH, dándole al folículo destinado a ser dominante y

ovulatorio una mayor sensibilidad a la FSH (Henderson *et al.*, 1987) permitiéndole mantenerse con niveles inferiores de esta hormona. Además, en esta etapa, los folículos dominantes cambian su necesidad de FSH a LH, lo que les permite crecer y madurar hasta alcanzar su tamaño preovulatorio. El folículo terciario tiene un elevado grado de desarrollo tanto de la teca como de la granulosa, además de una gran cantidad de receptores para LH (Webb y England, 1982); estos receptores responden al incremento de pulsos de LH durante esta fase, que culmina en la ovulación en caso de producirse la descarga preovulatoria de LH después de la luteólisis (Cumming *et al.*, 1971).

Esta dependencia de la LH para el establecimiento de la dominancia explica el hecho de que durante la fase lútea, los folículos preovulatorios no tengan oportunidad de establecer dominancia; en esta fase el cuerpo lúteo secreta progesterona, cuyo efecto inhibitorio sobre la hipófisis mantiene una baja frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. Cuando se destruye el cuerpo lúteo y comienza una nueva fase folicular, los niveles de progesterona descienden y se eleva la producción de LH pudiendo llegar a establecerse la dominancia (Cunningham, 2003).

Además, el mecanismo de selección folicular en la oveja, podría operar mediante activación de factores intraováricos que limitan la viabilidad de folículos vecinos y el número de folículos antrales (Cahill *et al.*, 1985).

Los folículos de gran tamaño tienen una mayor actividad aromatasa y producen gran cantidad de estrógenos; además, producen inhibina que, junto con los estrógenos, actúa sobre la hipófisis disminuyendo la secreción de FSH (McNeilly, 1984).

Los folículos en menor grado de desarrollo, en presencia de un folículo grande (Martin *et al.*, 1988) carecen, por tanto, de concentraciones elevadas de FSH. En ese momento todavía no presentan receptores de LH suficientes como para utilizar esta hormona; únicamente los folículos antrales (2-4 mm) con elevada actividad aromatasa, son capaces de mantener un medio altamente estrogénico.

4.6.5. Selección y dominancia

Durante el crecimiento terminal de folículos reclutados, solo uno (en especies monoovulatorias) continuará su desarrollo y se convertirá en el folículo dominante, mientras que los demás folículos del conjunto degenerarán por medio del proceso denominado atresia. La selección se asocia con una disminución en los niveles circulantes de FSH. El folículo es seleccionado, durante la regresión del cuerpo lúteo, altas concentraciones circulantes de FSH permiten el crecimiento de un grupo de folículos en desarrollo terminal. En la fase folicular temprana la pulsatilidad de LH se acelera, mientras que hay una disminución en las concentraciones de FSH en respuesta a la retroacción negativa en la pituitaria de estradiol e inhibina, las cuales son secretadas por estos folículos. El ambiente endocrino se limita solo al folículo funcional que está mejor adaptado, debido a que adquirió receptores de LH y por lo tanto puede sobrevivir a la disminución de FSH, continuando el desarrollo (David y Webb, 1997).

4.6.6. Ovulación

Pocas horas después del pico pre-ovulatorio de LH se presenta la ovulación por un tipo de reacción inflamatoria en que el folículo libera al ovulo que se encuentra rodeado de células del cumulus ooforus. Las células de la granulosa y teca se transforman en células lúteas y forman el cuerpo lúteo, las cuales secretan principalmente

progesterona que es esencial para el establecimiento de la gestación. Si no se produce la fertilización el cuerpo lúteo desaparece por medio una luteólisis durante la última parte de la fase lútea (Webb *et al.*, 2004).

4.6.7. Atresia

La atresia o involución folicular es el destino de la mayoría de los folículos presentes en el ovario. Cerca del 99.9 % de los folículos de todas las etapas de desarrollo folicular son degenerados por atresia. Este proceso se caracteriza por detener la proliferación y dar muerte a las células de la granulosa, debido a la fragmentación de la lámina basal, la pérdida de uniones entre las células de la granulosa y la reducción de la vascularización de la teca. En folículos en crecimiento, la atresia terminal también es acompañada por la pérdida de expresión y actividad de la enzima aromatasa y la sensibilidad a las gonadotropinas por parte de las células de la granulosa, lo que lleva a la caída de las concentraciones de estrógenos y andrógenos en el líquido folicular. Otro fenómeno importante es el gran aumento de las concentraciones de proteínas que se unen a los IGF: IGFBP2 y IGFBP4 en el líquido folicular (Monget *et al.*, 1993). La supervivencia de un folículo depende de un equilibrio entre los factores que estimulan e inhiben su desarrollo. Es relativamente difícil definir lo que estos factores pueden modular la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células foliculares.

4.7. Función y características del cuerpo lúteo

4.7.1. Luteogénesis

La formación del cuerpo lúteo se inicia por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos de las células de la teca interna y granulosa del folículo preovulatorio,

terminando con la luteinización de las mismas, debido a un incremento en las concentraciones de LH (Niswender y Nett, 1994; Wiltbank, 1994). Antes y después del estímulo ovulatorio las células de la granulosa se hipertrofian y tienen una activación nuclear (Niswender y Nett, 1994), llenándose de sangre rápidamente el folículo después su ruptura formando el cuerpo hemorrágico, las células de la teca y la granulosa rápidamente se incrementan en número y los coágulos sanguíneos son absorbidos, mientras que elementos vasculares de la teca penetran en la cavidad del folículo roto empezando a acumular grandes cantidades de colesterol (Niswender y Nett, 1994; Hafez, 1996).

4.7.2. Tipos de células del cuerpo lúteo

Morfológicamente existen cuatro tipos distintos de células lúteas: Las células esteroideogénicas pequeñas y grandes, células capilares endoteliales y fibroblastos. Las células esteroideogénicas grandes representan aproximadamente 40 % del volumen del cuerpo lúteo y constituyen aproximadamente el 10 % del número total de células (Wiltbank, 1994), tienen 22-50 μm de diámetro y son de forma poliédrica, con un gran núcleo localizado centralmente con distintos nucleolos, prominente lámina basal, numerosas mitocondrias, gotas de lípidos, existencia de retículo endoplásmico rugoso y abundante retículo endoplásmico liso (Fitz *et al.*, 1982; Rodgers *et al.*, 1983; Niswender y Nett, 1994).

Las concentraciones de receptores varían en los dos tipos de células; los receptores para prostaglandina $F_{2\alpha}$ y estradiol se localizan en las células lúteas grandes y los receptores de LH están presentes principalmente en las células lúteas pequeñas (Wiltbank, 1994).

Las células luteales esteroideogénicas grandes tienen 42 % más de ARNm para la enzima 3 β -HSD (β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) que las células pequeñas, lo cual tiene una relación directa en la concentración de progesterona, especulándose que una de las acciones inmediatas de la PGF_{2 α} es la reducción de las cantidades de ARNm para 3 β -HSD la cual precede a la disminución de las concentraciones de progesterona (Hawkins *et al.*, 1993).

Las células capilares endoteliales constituyen el 10 % del volumen del cuerpo lúteo y representan aproximadamente el 50 % del número total de células. Los fibroblastos se han encontrado infiltrados en el cuerpo lúteo después del rompimiento de la membrana basal durante la ovulación y luteinización y no se ha determinado su función (Wiltbank, 1994).

4.7.3. Vida media del cuerpo lúteo

La vida media del cuerpo lúteo es de 12.4 ± 0.5 y 10.9 ± 0.3 días para ovejas Western cara blanca y Finn respectivamente (Bartlewski *et al.*, 1999b). El cuerpo lúteo puede detectarse mediante ultrasonografía desde los días 4 o 5 después del estro (Schrick *et al.*, 1993; Bartlewski *et al.*, 1999b). En los inicios de desarrollo del cuerpo lúteo (tres días) se observan cavidades centrales con un diámetro de 2 a 3 mm y entre los días 9 al 12 de crecimiento estas cavidades desaparecen, presentándose como una estructura sólida e uniforme (Schrick *et al.*, 1993). El cuerpo lúteo logra su completa actividad secretora en la oveja cerca del sexto al octavo día del ciclo estral y continua secretando progesterona a un nivel constante hasta cerca del día 15, los niveles máximos inician cerca del día 8 y empiezan a disminuir uno o dos días antes del siguiente estro (Jablonka *et al.*, 1993; Gordon, 1997; Bartlewski *et al.*, 1999b).

4.7.4. Luteólisis

La luteólisis es la regresión del cuerpo lúteo, en donde ocurren cambios como la disminución de la cantidad de retículo endoplásmico, un incremento en el número de vacuolas autófagas, heterolisosomas y muchas células que muestran un incremento en el número de vacuolas citoplásmicas (Niswender y Nett, 1994) y degeneración celular, siendo removidas por macrófagos (Gangrade y May 1990; Pate, 1994), seguido de una rápida disminución de las concentraciones de progesterona en suero (Knickerbocker *et al.*, 1988).

Se ha determinado que el útero está involucrado en el proceso de luteolisis y que el factor luteolítico es la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) la cual parece pasar directamente de la vena uterina a la arteria ovárica en la oveja (Niswender y Nett, 1994; Pate, 1994), y actúa de manera directa en las células luteas. Se ha demostrado que la frecuencia normal de $PGF_{2\alpha}$ puede ocurrir de una manera anticipada a la luteólisis en ausencia de oxitocina lutea (Mann, 1999) lo que evidencia que el estímulo para la liberación luteolítica no es de oxitocina lutea, sugiriéndose la posibilidad de que la oxitocina de origen neurohipofisial pueda proveer el detonador inicial para la liberación de $PGF_{2\alpha}$ (McCracken *et al.*, 1984). Sin embargo Silvia y Raw (1993), demostraron que la $PGF_{2\alpha}$ puede por si misma disparar su liberación por un generador de pulso dentro del útero.

El mecanismo por el cual la $PGF_{2\alpha}$ reduce la concentración de progesterona circulante es por que aumenta su catabolismo (Jones y Hsueh, 1981) y por una disminución de enzimas como la 3β -HSD (Hawkins *et al.*, 1993), colesterol esterasa y colesterol sintetasa (Pate, 1994). Esto es seguido por una disminución del flujo sanguíneo en el cuerpo lúteo (Niswender *et al.*, 1976), reducción del número de receptores a LH,

desacoplamiento del receptor de LH a adenilato ciclasa (Niswender y Nett, 1994), activación de la proteína quinasa C (Wiltbank *et al.*, 1989); flujo de altos niveles de calcio (Kneth *et al.*, 1987; Hoyer y Marion, 1989) y por efecto citotóxico (Dodson y Schomberg, 1987).

Se piensa que el sistema inmune está involucrado en la regresión del cuerpo lúteo ya que el día 14 del ciclo estral se ha encontrado la presencia de células linfocíticas que se infiltran en el cuerpo lúteo, lo cual es mediado por la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Pate, 1994). Este sistema está regulado por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), el cual tiene dos clases de MHC I y II, la clase I se expresa virtualmente en células nucleadas, mientras que las moléculas de la clase II se limitan a linfocitos y células que presentan antígenos (macrófagos). La activación de los linfocitos T en la iniciación de la respuesta inmune requiere del reconocimiento por las células T de antígenos extraños presentados por una molécula de MHC, así que el grado de activación de moléculas de MHC pueden influir en la activación de las células T y la respuesta total del sistema inmune (Pate, 1994).

En vacas las células lúteas expresan moléculas de MHC clase II, al día 10 del ciclo estral y se incrementan conforme avanza la edad del cuerpo lúteo (día 10 al 18), teniendo que en la mitad del ciclo solamente las células lúteas grandes expresan moléculas de la clase II, mientras que el día 18 antes de la regresión lútea, estas moléculas se expresan en células lúteas grandes y pequeñas (Benyo *et al.*, 1991). La elevación de la expresión de las moléculas del MHC en el cuerpo lúteo potencializa los mecanismos de la respuesta inmune, también se ha detectado, la expresión de las moléculas durante la luteólisis inducida por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Benyo *et al.*, 1991).

Se ha reportado que la regresión del cuerpo lúteo puede ocurrir por procesos degenerativos de apoptosis. Sawyer *et al.* (1990) reportan evidencias morfológicas de que las células no esteroideogénicas dentro del cuerpo lúteo experimentan apoptosis, posiblemente iniciada por hipoxia. Por su parte Juengel *et al.* (1993) detectaron fragmentación del ADN durante la regresión luteal, y esto es considerado una característica de la apoptosis debida, a la activación de endonucleasas. Sin embargo esto ocurre tiempo después de la disminución de progesterona en plasma, por lo que puede existir una interacción entre las células luteas y las células inmunes para disparar los procesos de apoptosis (Pate, 1994).

4.8. Relacion de la nutrición con la reproducción

Durante la evolución los animales desarrollaron estrategias reproductivas para asegurar que el final de la gestación y subsecuente lactación coincidan con los periodos de abundancia en alimento, sugeriéndose un vínculo en la actividad sexual a cambios en el fotoperiodo el cual resulta ser un indicador confiable de cambio en las estaciones, y con ello un patrón en el suministro de alimento dependiente de la estación (Martin *et al.*, 2004), lo anterior permite reconocer el papel importante que tiene la nutrición en la actividad reproductiva a través del suministro de energía o proteína en la dietas, pudiendo modificar la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el ciclo estral y la actividad ovárica, entre otros (Blanche, 2003).

El impacto de la nutrición en la reproducción puede variar desde pequeños cambios en la tasa o frecuencia de ovulación cuando la dieta está por debajo de lo óptimo pero aún es adecuada, hasta la total supresión del proceso reproductivo cuando las señales del ambiente son muy desfavorables, posponiendo esta actividad hasta que las

condiciones mejoren, canalizando su energía en su propia sobrevivencia (Krasnow y Steiner, 2006).

Se conocen algunas variables reproductivas que son afectadas por deficiencias nutricionales. El inicio de la pubertad se retrasa cuando el crecimiento del animal es retardado por falta de nutrientes (Shillo, 1992). En novillas ciclando la pérdida debida a bajo consumo alimenticio indujo un anestro cuando el peso del animal cayó aproximadamente un 20 % (Rhodes *et al.*, 1995).

4.8.1 Efecto de la condición corporal en la reproducción

Existe evidencia de que cambios en el peso vivo y la condición corporal en ganado bovino tienen una estrecha correlación con la reproducción, encontrándose que la condición corporal (CC) al parto es un factor determinante para el reinicio de la actividad ovárica y de la gestación. Así, las vacas que al parto alcanzaron una CC >5 retornaron al estro más pronto que vacas que parieron con una CC <4 ($P < 0.01$) (Richards *et al.*, 1986). Además se conoce que la ganancia de peso corporal en el periodo posparto es más importante para las vacas que parieron en baja condición corporal coincidiendo con lo reportado por Selk *et al.* (1988), Bolaños *et al.* (1996a) y Lalman *et al.* (1997) quienes concluyeron que la condición corporal al parto es un factor determinante en la duración del anestro posparto. Butler (2000) señala que conforme la pérdida de condición corporal es mayor las tasas de concepción disminuyen. Así, los animales que pierden más de un punto de CC (escala de 1 a 5) durante la lactación temprana tienen mayor riesgo de presentar una baja fertilidad, con tasas de concepción de 17 a 38%.

4.8.2. Efecto de la energía y proteína sobre la reproducción

Una nutrición inadecuada, ya sea en hembras sometidas a regímenes nutritivos excesivamente altos (Lozano *et al.*, 2003) o nutritivamente deficientes, puede comprometer la sobrevivencia del oocito (O'Callaghan *et al.*, 2000), la función lutea (Jabbour *et al.*, 1991) y el desarrollo embrionario (Abecia *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que el contenido de energía en la dieta, y en consecuencia el metabolismo energético, ejercen profundos efectos sobre el sistema de comunicación neurohormonal que regula la función sexual tanto antes como después de la madurez sexual (Dun y Moss, 1992). Se ha observado que el índice de concepción a primer servicio tanto en vaquillas como en vacas posparto está influenciado por el consumo de energía y proteína de las dietas.

4.8.3. Dinámica folicular durante la restricción nutricional

Durante el ciclo estral normal en el bovino se producen 2 ó 3 oleadas foliculares, por lo que se generan el desarrollo y atresia de uno o dos folículos dominantes antes de que se desarrolle el folículo ovulatorio (Wettermann y Bossis, 1999).

Bossis *et al.* (1999) encontraron que el día de emergencia del folículo ovulatorio en vaquillas que perdieron peso durante dos ciclos estrales, previos a que se produjera un estado anovulatorio debido a la restricción alimenticia, fue similar al de vaquillas que mantuvieron su peso. Sin embargo, el folículo ovulatorio fue mayor ($P < 0.01$) en vaquillas que mantuvieron el peso vivo (15.7 ± 0.9 mm), comparado al de vaquillas con restricción nutricional (10.4 ± 0.9 mm). Este mismo comportamiento se presentó en la tasa de crecimiento del folículo dominante, lo que sugiere que la restricción alimenticia severa resulta en cambios hormonales que afectan el ritmo de desarrollo de éste.

Por su parte, Rhodes *et al.* (1995) señalan que el número de folículos dominantes por ciclo estral, no se alteró en vaquillas Brahman inducidas al anestro mediante la restricción nutricional. Sin embargo, por cada 10 kg de peso vivo que disminuían estas vaquillas, se detectó una reducción de 0.31 ± 0.006 mm en el diámetro del folículo dominante. De igual forma Stagg *et al.* (1995 a) citan que la tasa de crecimiento y el diámetro del folículo dominante fueron menores en vaquillas con restricción nutricional e inducidas al anestro, comparados con previos ciclos ovulatorios. Igualmente, el tamaño del cuerpo lúteo y su funcionalidad es afectado en este tipo de programa (Rhodes *et al.*, 1995; Bossis *et al.*, 1999).

4.8.4. Señales metabólicas

4.8.4.1. Ácidos grasos

En rumiantes, los ácidos grasos volátiles son considerados de suma importancia, debido a que se producen en grandes cantidades a través del proceso de digestión. La adición de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato) a una dieta en ovinos, aumentó la frecuencia de secreción de LH (Boukhliq *et al.*, 1997) sugiriendo que éstos son parte de las señales que afectan la secreción de gonadotropinas.

Se ha observado que las concentraciones de ácidos grasos volátiles aumentan en el plasma de rumiantes al aumentar el consumo de alimento, además se ha visto que un estado de balance energético negativo causa un incremento de ácidos grasos no esterificados (NEFA, siglas en inglés), β -hidroxibutirato y cuerpos cetónicos, tal como sucede con cambios en el nivel de energía en la alimentación en vacas lactantes (Holtenius *et al.*, 2003).

4.8.4.2. Glucosa

La glucosa ha sido por mucho tiempo reconocida como un metabolito de enlace entre la nutrición y la reproducción (Shillo, 1992), durante la hipoglicemia inducida por insulina se impacta negativamente la secreción pulsátil de LH (Heisler *et al.*, 1994), por otra parte se ha reportado que la privación de glucosa por medio de aplicación de 2-deoxyglucosa (2DG), un inhibidor competitivo de la glucólisis, se interrumpe la ciclicidad en hamsters (Schneider *et al.*, 1993) y la aplicación intraventricular del mismo producto suprime inmediatamente la secreción pulsátil de LH en ratas (Nagatani *et al.*, 1996) concluyendo que cambios en la disponibilidad de glucosa controlan la función reproductiva al regular la liberación de GnRH/LH.

El ovino tiene poca absorción de glucosa desde el tubo digestivo, siendo las concentraciones de ésta en plasma normalmente bajas en comparación con los no rumiantes, sin embargo se ha demostrado que los rumiantes tienen un mecanismo glucostático importante que influye en la actividad reproductiva, observándose que la hipoglicemia inducida por insulina o bien la administración de 2DG en el ovino disminuye la frecuencia y secreción de los pulsos de LH (Clarke *et al.*, 1990; Funston *et al.*, 1995; Bucholtz *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 1998), no obstante la aplicación de insulina aumenta los pulsos de LH en ovinos deficientes en insulina, independientemente de la vía en que es administrada, ya sea periférica (Bucholtz *et al.*, 2000) o central (Tanaka *et al.*, 2000), lo cual contrasta con lo reportado en experimentos con carneros alimentados con una dieta baja en energía, donde se ha encontrado que infusiones de glucosa intraabomasal o intravenosas no estimulan la secreción pulsátil de LH (Miller *et al.*, 1995; Bouckhliq y Martín, 1996).

Por consiguiente se afirma que la glucosa no actúa independientemente como una señal nutricional de los tejidos periféricos al cerebro, sino que podría estar involucrada en la interacción de otros factores metabólicos (Blanche, 2003). Entre estos factores el GLUT-4, un transportador de insulina capaz de ser regulado en los tejidos periféricos (Zornano y Camps, 1977) es muy interesante porque se afecta por el nivel nutricional en el músculo esquelético y en el tejido adiposo de ratones (Ezaqui, 1997), lo cual sería compatible con la interacción insulina-glucosa en el control de la secreción de GnRH, si GLUT-4 estuviera presente en las neuronas de GnRH o en las neuronas que controlan la secreción de GnRH, insulina podría activar la secreción de GnRH estimulando el consumo de glucosa por las neuronas. Sin embargo, la localización cerebral de GLUT-4 necesita verificarse en borregos ya que Abe *et al.* (1997), no pudieron localizar su ARNm en el cerebro de bovinos.

4.9. Hormonas metabólicas

La asociación entre el estado nutricional y la función reproductiva es mediada por una serie de señales sanguíneas que reflejan el estado metabólico del animal y que actúan simultáneamente a varios niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, existen diferentes hipótesis que tratan de explicar como la secreción de LH podría ser regulada por las reservas de grasa corporal o por señales metabólicas presentes en la sangre, como ácidos grasos libres (AGL), insulina, tiroxina, GH, IGF-I y leptina (Randel, 1990; Hall *et al.*, 1992; Nagatani *et al.*, 2000; Roche *et al.*, 2000), reflejando el estado metabólico del animal. Sin embargo, no se ha concluido si es una sola señal nutricional específica la que controla la secreción de LH, o quizá se debe a la participación de varias señales, conociéndose poco la ruta en que el organismo informa al sistema

nervioso central sobre su estado nutricional y de cómo esta información es traducida como una señal neuroendocrina (Lozano *et al.*, 2003).

4.9.1. Insulina

Blache *et al.* (2000) proponen que la insulina, pasa de el páncreas al torrente sanguíneo y de ahí al fluido cerebro espinal (CSF) del tejido hipotalámico, es el principal modulador metabólico de la secreción de GnRH.

La insulina no solo transmite información acerca de la cantidad de las reservas periféricas de energía a los caminos neuronales que modulan el consumo y gasto de energía, sino que también tiene el potencial de transmitir información metabólica a las rutas neuroendocrinas que controlan la función reproductiva, fundamentándose por la presencia de ARNm para el receptor de insulina ovina en el tejido hipotalámico de carneros (Blanche *et al.*, 2000).

Varios estudios han revelado una asociación entre las concentraciones en los niveles plasmáticos de insulina y alteraciones en la secreción pulsátil de LH. Aún en periodos relativamente cortos de privación de alimento se presentan reducciones paralelas en los niveles de insulina plasmática y pulsatilidad de LH (Helmreich *et al.*, 1993; Schreihof *et al.*, 1993). Contrariamente, la realimentación después de un ayuno es acompañada por incremento en la concentración de insulina y la secreción de LH (Williams *et al.*, 1996), por lo tanto, parecería que aunque los niveles bajos de insulina deberían indicar al hipotálamo y pituitaria inhibir la secreción de LH durante periodos de consumo calórico limitado, otros mecanismos de la secreción de insulina inducida por el consumo de alimento son capaces de restaurar la secreción de LH en respuesta a la realimentación.

En experimentos con animales tratados con insulina se han obtenido resultados contradictorios con respecto a la función reproductiva. La interpretación de los experimentos en los cuales la insulina es inyectada periféricamente es complicada por la hipoglucemia que resulta de la administración de grandes dosis de insulina. En muchas especies, la administración de insulina sistémica tiene efectos inhibidores sobre varios indicadores de la función reproductiva, incluyendo el generador del pulso de GnRH (Chen *et al.*, 1992; Ohkura *et al.*, 2004), la secreción pulsátil de LH (Clarke *et al.*, 1990; Medina *et al.*, 1998) y el tiempo de la elevación de LH inducida por estrógenos (Medina *et al.*, 1998).

En ovejas ovariectomizadas, los efectos inhibidores de la administración periférica de insulina sobre la secreción de LH y el tiempo de la elevación de LH inducida por estrógenos son revertidos por la inyección simultánea de glucosa (Clarke *et al.*, 1990; Medina *et al.*, 1998). Inyectar insulina directamente al cerebro (en dosis que no alteran las concentraciones de insulina periférica o glucosa) es otra manera de evitar la hipoglucemia inducida por insulina, aunque los experimentos en los cuales los animales han recibido infusiones centrales de insulina también han aportado resultados variables. Por otra parte, se ha reportado que la administración central de insulina por 4 días incrementa la frecuencia del pulso de LH en carneros adultos (Miller *et al.*, 1995). Otro estudio con corderas ovariectomizadas en crecimiento restringido, demostró que las infusiones centrales no tienen efecto en la secreción de LH y reduce la concentración media y frecuencia del pulso de LH cuando ésta es administrada después de dos semanas de realimentación (Hileman *et al.*, 1993).

Es posible que la ruta simple, en la cual la insulina pancreática pasa vía fluido cerebroespinal al tejido neural, no sea la ruta por la cual las señales metabólicas estimulen a las neuronas productoras de GnRH y no sea relevante para la respuesta a las infusiones intracerebroventriculares de la hormona. Una alternativa es que la sensibilidad del tejido neural a la insulina varía con los cambios en la dieta, así que las concentraciones de insulina pudieran no necesariamente ser fluctuantes, lo cual implicaría cambios en la expresión del receptor de insulina o los mecanismos de señalación intracelular (Blanche *et al.*, 2003).

4.9.2. Hormona de crecimiento (GH)

La presencia de ARNm de receptores para la hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) en hipotálamo, hipófisis y folículos ováricos (Kirby *et al.*, 1996; Lucy *et al.*, 1998), ha planteado la posibilidad de que la GH tenga una función de enlace entre el estado nutricional y la secreción de gonadotropina. El balance de energía afecta las concentraciones de GH en plasma. La GH sérica aumenta por una restricción alimenticia, se ha observado que la frecuencia de pulsos de GH se incrementa antes de que las vaquillas dejen de ovular después de una restricción alimenticia (Bossis *et al.*, 1999). Sin embargo, estudios recientes sugieren que el efecto de GH en el eje reproductivo podría ser mediado por la síntesis de IGF-I (por sus siglas en inglés), en hígado o por efecto directo en el desarrollo folicular (Gong, 2002). En borregos machos, GH no parece estar involucrada en la estimulación de la secreción de GnRH porque un incremento en la nutrición induce una disminución de la concentración de GH en plasma. GH podría tener un amplia función en el comportamiento, pero es improbable

que tenga una función directa en el funcionamiento reproductivo a nivel central (Kerry y Harvey, 2000).

4.9.3. IGF-I

En bovinos se ha observado que las concentraciones periféricas de IGF-I se correlacionan negativamente con la edad al inicio de la pubertad y con el intervalo del parto a la primera ovulación (Zurek *et al.*, 1995; Thatcher *et al.*, 1996).

Además del efecto a nivel cerebral de estas hormonas, también actúan a nivel gonadal. Se ha confirmado que la insulina y el IGF-I estimulan *in vitro* la secreción de estradiol por parte de las células de la granulosa (Gutiérrez *et al.*, 1997).

De igual modo, estudios *in vivo* indican que el diámetro folicular está asociado con altas concentraciones de IGF-I (Enright *et al.*, 1994; Butler, 2000). Spicer *et al.* (1990) señalan que el balance energético está asociado con la concentración de IGF-I y la producción de progesterona en vacas lecheras durante el periodo postparto. Estos resultados fueron corroborados por Jolly *et al.* (1995), quienes al trabajar con vacas de razas de carne observaron que las concentraciones de IGF-I, están asociadas con el estado nutricional.

La presencia de IGF-I y su receptor en el hipotálamo de la rata (Schechter *et al.*, 1994) ha generado la posibilidad de que el IGF-I tenga una función similar a la de insulina como enlace entre la reproducción y la secreción de gonadotropinas. El hecho de que los receptores de insulina y de IGF-I tengan reacción cruzada (Gammeltoft *et al.*, 1984) puede significar que la insulina esté unida por receptores a IGF-I y produzca respuestas similares al IGF-I (Recher y Nissley, 1986) o bien que el IGF-I pueda ocasionar regulación a la baja de receptores o bien actúe en los receptores de insulina

(Gammeltoft *et al.*, 1984). Se ha demostrado que la aplicación intracerebroventricular (ICV) de IGF-I induce liberación de GnRH y de LH, por lo que al menos en animales maduros, el IGF-I actúa como un mediador central del estado nutricional.

Las concentraciones plasmáticas de IGF-I están correlacionadas negativamente con la duración del anestro postparto y positivamente correlacionadas con la condición corporal y el consumo de alimento (Beam y Butler, 1999). Los valores plasmáticos de IGF-I disminuyen en vaquillas con restricción alimenticia provocando el anestro y durante el postparto de vacas lecheras. Las concentraciones de IGF-I aumentan linealmente hasta el día de la primera ovulación (Beam y Butler, 1997; Diskin *et al.*, 2003). También, la presencia de IGF-I y su receptor en el hipotálamo de la rata (Schechter *et al.*, 1994) sugieren que el IGF-I podría tener una función directa en el control de las neuronas productoras de GnRH. En ratas jóvenes y cercanas a la pubertad, inyecciones intra cerebro-ventricular (ICV) de IGF-I indujeron la liberación de GnRH y LH (Hiney *et al.*, 1996). En borregos castrados la administración periférica de dosis fisiológicas de IGF-I estimula la secreción de LH (Adam *et al.*, 1998).

En el carnero las concentraciones periféricas de IGF-I pero no de CSF se afectan por la dieta (Miller *et al.*, 1998), estudios preliminares sugieren que la infusión de IGF-I en el tercer ventrículo no afecta la frecuencia pulsátil de LH, por consiguiente parece improbable que, al menos en carneros, IGF-I actúe como un mediador central de estado nutricional.

En bovinos la función de IGF-I parece ser diferente en hembras debido a que aparentemente no hay efecto asociado con la pulsatilidad de LH y el retorno al estro

(Rutter *et al.*, 1989). Además, la IGF-I puede mediar parcialmente el efecto de la nutrición en la reproducción a diversos niveles en el eje reproductivo en ambos sexos.

4.9.4. Leptina

La clonación posicional del gen *ob* por el grupo de Friedman en 1994 guió al descubrimiento de una proteína, la cual fue nombrada leptina (Zhang *et al.*, 1994). La leptina circulante es transportada al fluido cerebroespinal donde está disponible para acoplarse y activar receptores específicos en el hipotálamo que median la regulación del balance de energía (Tartaglia, 1997). El receptor para la leptina es una sola proteína que atraviesa la membrana con homología estructural y funcional a la familia del receptor de la citoquinina clase I (Tartaglia, 1997). Mutaciones espontáneas en el gene del receptor de leptina en ratones *db/db* y ratas *fa/fa* producen receptores defectuosos, resultando en una severa obesidad con resistencia a la leptina endógena y a la administrada vía exógena (Kim y Moustaid-Moussa, 2000).

Tanto la administración periférica como central de leptina disminuye el consumo de alimento y el peso corporal (Campfield *et al.*, 1995). Los efectos de la leptina en el peso corporal son mediados al menos en parte por el neuropeptido Y (NPY), un potente estimulador del consumo de alimento (Wang, 1998).

Los mecanismos intrínsecos a través de los cuales la leptina reduce el consumo de alimento, incrementa el gasto de energía y altera la actividad endocrina (Ahima *et al.*, 1996) no son completamente entendidos.

Actualmente se piensa que la leptina actúa en el cerebro, ya que el ARN del receptor de leptina fue localizado en el núcleo ventromedial y arcuato del hipotálamo y la parte anterior de la pituitaria de la oveja (Dyer *et al.*, 1997a). Por lo tanto, la leptina podría

actuar en el cerebro y pituitaria para regular la secreción de LH (Barb, 1999). Varias investigaciones demostraron los efectos de la administración de leptina en el eje hipotálamo-pituitaria. El tratamiento con leptina incrementó las concentraciones de LH, FSH y testosterona en ratones mantenidos en ayuno y ratones ob/ob (Ahima *et al.*, 1996; Barash *et al.*, 1996). La leptina administrada ICV estimula la secreción de LH en ratas ovariectomizadas (Yu *et al.*, 1997). Además la leptina estimuló la liberación de GnRH en cultivos de eminencia media y nucleo arcuato (Yu *et al.*, 1997), sin embargo en cerdas la administración de leptina por esta vía no alteró la secreción de LH, lo cual aunque no es concluyente, se sugiere que existen mecanismos diferentes entre cerdos y roedores (Barb, 1999).

Aunque mucha de la información sugiere un sitio central para el efecto de la leptina en el eje reproductivo, también se sugiere un efecto directo en el ovario. Estudios *in vitro* demostraron que la leptina inhibe la producción de progesterona inducida por insulina y estradiol en células de la granulosa en bovinos (Spicer y Francisko, 1997). Además, la leptina atenua selectivamente la acción sinérgica de IGF-I sobre la producción de estradiol estimulado por FSH, en células de ratas en cultivo (Zachow y Magoffin, 1997). Lo anterior apoya la idea de que la leptina es necesaria para iniciar la función reproductiva, aunque altas concentraciones de ésta pueden contribuir a desensibilizar el eje GnRH, LH y la esteroidogénesis ovárica, indicando un umbral inhibitorio.

Los rumiantes comparados con los no rumiantes tienen respuestas menos precisas a cambios en el consumo de energía a corto plazo, aunque en vaquillas (Amstalden *et al.*, 2000) y ovejas castradas e implantadas con estradiol (Nagatani *et al.*, 2000), representan los modelos de rumiantes en los cuales el ayuno ha demostrado impedir

la frecuencia de los pulsos y concentración de LH (Foster y Olster, 1985; Morrison *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2000). El tratamiento con leptina no afecta la secreción de LH en ovejas ovariectomizadas (Henry *et al.*, 1999) alimentadas adecuadamente y en vacas (Amstalden *et al.*, 2002), pero evita una reducción en la frecuencia de los pulsos de LH en vacas castradas tratadas con estrógenos que se encontraban en ayuno (Nagatani *et al.*, 2000) y en vaquillas pre-puberes intactas en ayuno (Maciel *et al.*, 2004). Además en trabajos iniciales, la leptina pareció estimular la secreción de LH en ovejas ovariectomizadas restringidas de alimento (Henry *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que ovejas ayunadas previamente alimentadas con una dieta normal responden de forma precisa a leptina, mientras ovejas restringidas de nutrientes a largo plazo que fueron ayunadas no respondieron con un incremento en la secreción de LH (Henry *et al.*, 2001). No obstante el efecto estimulador de leptina en la secreción de LH en rumiantes se manifiesta principalmente en periodos de estrés nutricional (Amstalden *et al.*, 2000; Nagatani *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2001; Maciel *et al.*, 2004). En vacas adultas, aunque el ayuno a corto plazo (2-3 d) es incapaz de restringir la frecuencia de pulsos de LH, aun en animales moderadamente delgados (Amstalden *et al.*, 2002), la leptina estimuló un drástico incremento en las concentraciones de LH. Esto ocurre como resultado de un aumento de la amplitud de pulsos individuales de LH (Amstalden *et al.*, 2002). Estos descubrimientos junto con recientes observaciones usando extracto de pituitaria anterior, son consistentes en que los efectos de la leptina en la concentración de LH en la hembra rumiante adulta residen a nivel de adenohipofisis (Amstalden *et al.*, 2003). En estudios mas recientes, se midió GnRH directamente de fluido cerebroespinal (CSF, siglas en inglés) colectado del tercer

ventrículo y observaron la habilidad de leptina para incrementar la concentración de GnRH y el tamaño de los pulsos individuales de GnRH. Por lo tanto, es claro que el incremento mediado por la leptina para aumentar la secreción de LH en la vaca puede ser afectado tanto a nivel de hipotálamo como de pituitaria anterior.

La incapacidad de la leptina para estimular un incremento en la concentración de LH en ganado bovino u ovino bien alimentados, no es conocido completamente; aunque, la literatura sugiere que leptina estimula el eje hipotálamo-adenohipofisario principalmente en animales estresados nutricionalmente. Además, los efectos de leptina en el eje hipotálamo-pituitaria parecen ser dependientes de la dosis. La leptina de origen ovino inyectada intravenosamente causa una reacción inversa, con un incremento relacionado a la dosis sobre las concentraciones basales de LH en vacas ovariectomizadas implantadas con estradiol y mantenidas en ayuno por 60 h (Zieba *et al.*, 2005). Una dosis de $0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ maximizó el incremento en LH, mientras dosis de 2 y $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ causaron muy bajo o ningún incremento, respectivamente. Por lo tanto, la duración y/o cantidad de exposición a la hormona parece determinar el nivel de resistencia.

En los rumiantes se han identificado receptores para leptina en el hipotálamo (Dyer *et al.*, 1997a), se ha demostrado que la leptina regula el consumo de alimento (Morrison *et al.*, 2001) e interviene en los procesos reproductivos (Nagatani *et al.*, 2000) y la termorregulación (Mostyn *et al.*, 2001) de la oveja.

La administración central de leptina en rumiantes bien alimentados disminuyó significativamente ($P < 0.01$) el consumo de alimento (Morrison *et al.*, 2001). Asimismo, los niveles de energía ingerida se han correlacionado positivamente con la expresión

de leptina (ARNm) en el tejido adiposo (Amstalden *et al.*, 2000). El establecimiento del radioinmunoanálisis específico de leptina en rumiantes permitió demostrar que el 35 y 17% de la variación en los niveles plasmáticos de leptina fueron explicados respectivamente por la adiposidad y el estatus nutricional en ovejas adultas (Delavaud *et al.*, 2000) y un 37% por la condición corporal en vacas lecheras (Ehrhardt *et al.*, 2000).

Sansinaea *et al.* (2001) encontraron que un grupo de vaquillas Herford sometidas a restricción nutricional por 30 días, disminuyeron significativamente las concentraciones séricas de leptina ($3.51 \pm 0.29 \text{ ng ml}^{-1}$) en comparación a vaquillas alimentadas sin restricción, que presentaron valores de $6.05 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$. Amstalden *et al.* (2000) al evaluar un periodo de restricción nutricional aguda (48 h) en vaquillas F1 (Brahman x Herford) pre-púberes observaron una disminución significativa ($P < 0.01$) en las concentraciones circulantes de leptina, IGF-I e insulina, así como en la frecuencia de los pulsos de LH. Resultados similares fueron reportados en ovinos con ayuno de 72 horas donde las concentraciones circulantes de leptina disminuyeron en un 30% (Nagatani *et al.*, 2000). En otro estudio se asociaron bajos niveles de leptina con una disminución en la frecuencia de pulsos de LH. Estas evidencias señalan que la leptina actúa como señal metabólica, y que junto con otras hormonas tiene influencia en los procesos fisiológicos de la reproducción (Spicer, 2001).

Delavaud *et al.* (2000) encontraron en ovejas una correlación significativa entre el peso vivo y los niveles de leptina ($r = 0.47$) y una correlación mayor entre la condición corporal y los valores de leptina ($r = 0.72$; $P < 0.01$). Por su parte Keisler *et al.* (1999) y Pisabarro *et al.* (1999) encontraron en poblaciones de humanos obesos los niveles de

leptina eran notablemente mayores comparados con personas no obesas ($P < 0.01$), existió también una fuerte correlación entre leptina y el índice de la masa corporal ($r = 0.57$), esta asociación fue todavía superior con grasa corporal ($r = 0.61$, $P < 0.01$). Recientemente, se ha encontrado una relación positiva entre las concentraciones de leptina y el tamaño del adiposito tanto en vacas gordas como delgadas (Delavaud *et al.*, 2002), al parecer es el tamaño de los adipocitos el principal factor de regulación de las concentraciones plasmáticas de leptina esta especie.

4.9.5. Grelina

La grelina es un péptido de 28 aminoácidos con una cadena de ácido graso y una modificación en el extremo amino terminal del tercer aminoácido, esta hormona originalmente fue aislada del estómago, es encontrada en la glándula oxíntica en el fondo del estomago (la parte que secreta ácido clorhídrico (HCL) en el estomago), pero no en la región pilórica, además se ha encontrado un número muy pequeño de células inmunopositivas en el intestino delgado y grueso, se considera que un 30% de la secreción es por parte del intestino delgado (Ariyasu *et al.*, 2001), además de encontrar su expresión de ARN mensajero en el hipotálamo (Kojima *et al.*, 1999).

Se ha observado que los niveles circulantes cambian en el transcurso del día siendo estos altos durante el ayuno y disminuyendo 60-120 minutos después del consumo de alimento (Tschöp *et al.*, 2000). Se ha reportado que los niveles de grelina en animales en ayuno pueden disminuir por el llenado del estómago con una solución al 50% de glucosa, pero no con el mismo volumen de agua, sugiriendo que el detonador no es la expansión física del estómago (Tschöp *et al.*, 2000).

Además se ha observado la expresión de grelina en el endometrio, sugiriéndose un posible papel parácrino/autócrino en la implantación embrionaria (Tanaka *et al.*, 2003), por otra parte ésta es sintetizada en la placenta y puede tener un papel en el crecimiento fetal, observándose que ratas gestantes tratadas con grelina tienen crías más grandes (Gualillo *et al.*, 2001a). La grelina se expresa en el ovario de la rata (Caminos *et al.*, 2003), la expresión es cíclica encontrándose el nivel más alto en el cuerpo lúteo, lo cual podría ser inhibido por el pre-tratamiento con un agonista de GnRH. La expresión no cíclica fue observada en los niveles circulantes de grelina o en la expresión en el estómago (Caminos *et al.*, 2003). La grelina se expresa en las células de Leydig del testículo e inhibe la liberación estimulada de testosterona (Barreiro *et al.*, 2002). La administración central de inhibina inhibe la pulsatilidad de LH en ratas hembras (Korbonits *et al.*, 2004), aunque la administración de grelina o GHS periférica no cambia los niveles de LH/FSH en humanos (Takaya *et al.*, 2000). Ningún cambio en los niveles de grelina se observó en animales machos y hembras gonadectomizadas (Gualillo *et al.*, 2001b). Esto es contrastante con los datos en humanos, donde los hombres hipogonadales tuvieron menores niveles de grelina que los testigo y los niveles de grelina se restauraron por el remplazo de testosterona (Pagotto *et al.*, 2003). Tomando en cuenta el hecho de que el eje reproductivo es altamente dependiente del estado nutricional, la grelina actúa a nivel central y periférico, puede ser uno de los mecanismos de señales que vinculan el estado nutricional al eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (Caminos *et al.*, 2003).

4.10. Grasas

Los lípidos son sustancias insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos, entre sus funciones se encuentra la de formar parte de las membranas biológicas, y como reserva de energía (McDonald, 1993).

La estructura de los ácidos grasos está determinada por su longitud en el número de carbonos, tipo de enlaces presentes e isómeros de estos mismos en lo cual determina su función, con base en lo anterior los ácidos grasos denominados saturados no tienen dobles enlaces en su cadena de carbonos, mientras los ácidos grasos insaturados se les denomina a aquellos que tienen al menos un doble enlace, como ejemplo se tiene al ácido linoleico con 18 átomos de carbonos y dos doble enlaces (C18:2), con su primer doble enlace en la sexta posición de metil final, y es por lo tanto un miembro de la familia n-6, ácido linoleico (C18: 3) pertenece a la familia n-3 porque el primero de sus doble enlace está en la posición del tercer carbón (Jenkins, 1992).

4.10.1. Digestión y absorción de grasas

Las grasas, como aceites de origen vegetal o cebo de origen animal, incluidos en la dieta de rumiantes pueden experimentar modificaciones en el rumen, por la acción de la microbiota ruminal digiriendo triacilglicerolos (triglicéridos), fosfolípidos y galactolípidos, teniendo como consecuencia la liberación de glicerol y ácidos grasos, para posteriormente entrar a un proceso de lipólisis (reducción de la cadena de carbonos) y en caso de presentar dobles enlaces a un proceso de biohidrogenación. Gran parte del glicerol es fermentado a ácido propiónico (Williams y Stanko, 1999), uno de los principales ácidos grasos volátiles y un precursor para la síntesis de glucosa.

Una vez que los ácidos grasos libres han llegado al intestino son emulsificados, dispersados dentro de las micelas gracias a la acción de las sales biliares y posteriormente difundidos dentro de las células del intestino; aquí los ácidos grasos son re-esterificados y transportados vía lipoproteínas de muy baja densidad o quilomicrones a través del sistema linfático. En los rumiantes, los ácidos grasos absorbidos se incorporan predominantemente a lipoproteínas de muy baja densidad en lugar de los quilomicrones, mientras que el hecho inverso resulta cierto en los no rumiantes. Los ácidos grasos absorbidos por los rumiantes son más saturados y favorecen la síntesis de lipoproteína de muy baja densidad, mientras los ácidos grasos poli-insaturados determinan la síntesis de quilomicrones. Los ácidos grasos y los triglicéridos son captados por la célula y utilizados para obtener energía ó para sintetizar triglicéridos en tejido adiposo hepático y mamario (Wu *et al.*, 1991).

4.10.2. Grasa protegida contra la acción de la microbiota del rumen (sales de calcio)

Las sales de calcio de ácidos grasos fueron originalmente desarrolladas en los inicios de los 80's en la Universidad del estado de Ohio como una forma de grasa inerte en el rumen para evitar la fermentación ruminal y problemas de digestión. A inicios de los 90's recibieron atención por escapar parcialmente de la biohidrogenación (Jenkins y Bridges, 2007). Por ejemplo Wu *et al.* (1991), reportaron 49 % de biohidrogenación en dietas conteniendo sales de calcio de aceite de palma comparada con 80 % de biohidrogenación en dietas que contenían grasa animal-vegetal. De forma similar Klusmeyer y Clark (1991) encontraron menor biohidrogenación en dietas suplementadas con sales de calcio al compararlas con dieta testigo.

4.10.3. Efecto de la grasas en la reproducción de rumiantes

La reproducción en rumiantes está estrechamente asociada a la disponibilidad de energía y las grasas son importantes fuentes de energía, por lo que se sugiere que favorecen la función reproductiva, sin embargo se ha sugerido que los efectos de la grasa de la dieta pueden ser independientes de la contribución de la densidad de la energía en la dieta (Funston, 2004) y que los constituyentes específicos de los ácidos grasos pueden estimular la función ovárica (Lucy *et al.*, 1992), como lo sugiere el estudio realizado por Petit *et al.* (2002), quienes mencionan que los ácidos grasos pueden influenciar en la fertilidad por actuar como precursores de la prostaglandinas, o bien pueden afectar la esteroidogénesis a través del incremento en la disponibilidad de colesterol.

Se ha reportado en bovinos que la pérdida de embriones ocurre principalmente entre los días 8 y 16 pos-inseminación (Sreenan *et al.*, 2001), lo cual puede ser asociado a la incapacidad de inhibir la acción luteolítica de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) durante el periodo crítico de reconocimiento materno de la gestación.

En años recientes ha existido un mayor interés en el ácido graso eicosapentaenoico (EPA, por su siglas en inglés) y en el ácido docosahexanoico (DHA, por su siglas en inglés), debido a su aparente habilidad de reducir la secreción uterina de $PGF_{2\alpha}$ en las células endometriales a través del desplazamiento del ácido araquidónico, precursor de la biosíntesis de $PGF_{2\alpha}$, tanto *in vitro* como *in vivo*, (Mattos *et al.*, 2003). Por su parte Childs *et al.* (2008), han aportado evidencia de un mejoramiento en la función reproductiva después de suplementar con aceite de pescado en ganado bovino, lo cual puede ser en parte mediado a través del incremento sistémico de colesterol o bien por

un adecuado funcionamiento del cuerpo lúteo, lo cual causaría un incremento en las concentraciones de progesterona. Además de lo anterior se menciona un elevación en las concentraciones sistémicas de IGF-I, sugiriéndose ésta como consecuencia de la adición de aceite de pescado, el cual tiene un papel en el incremento en la fertilidad (Childs *et al.*, 2008).

4.10.4. Efecto en la dinámica folicular

Varios estudios han mostrado que la adición de suplementos de grasa en la alimentación altera la dinámica de crecimiento del folículo ovárico y que este efecto es independiente del consumo de energía. El suplementar alimento con grasa de manera isocalórica, con la dieta testigo sin suplemento de grasa, estimuló el crecimiento programado de un folículo preovulatorio (Lucy *et al.*, 1993). Los efectos de suplementar grasa también influyen en el número total de folículos (Lucy *et al.*, 1991; Beam y Butler, 1997) e incrementa el tamaño de los folículos preovulatorios (Beam y Butler, 1997). El incremento del tamaño de folículos preovulatorios puede deberse en parte al incremento en las concentraciones de LH en plasma, lo cual estimula el crecimiento en la última etapa folicular. Se requiere más investigación para determinar si los ácidos grasos en la dieta afectan la secreción de LH y si el incremento de tamaño y número de folículos está asociado al incremento en la tasas de gestación.

En ganado de carne la suplementación con varios ácidos grasos poli-insaturados (por sus siglas en inglés PUFAS's) de cadena larga (tanto n-3 y n-6) indujo cambios en varios aspectos de la foliculogénesis, incluyendo tanto el incremento en el número total de folículos como en el tamaño del folículo dominante o pre-ovulatorio (Bilby *et al.*, 2006a; Bilby *et al.*, 2006b; Ambrose *et al.*, 2006). En contraste, Petit *et al.* (2002) y Petit

et al. (2004) encontraron poco o ningún efecto en dietas suplementados con semilla de lino, aceite de pescado, y semilla de girasol sobre la dinámica folicular.

Las células de la granulosa colectadas de folículos de vacas suplementadas con PUFA (n-6), mostraron un incremento en la secreción *in vitro* (Wherman *et al.*, 1991) y durante la fase folicular en las concentraciones de estradiol y estas concentraciones fueron mayores en vacas suplementadas con ácido linoleico (Robinson *et al.*, 2002).

4.10.6. Efecto en la función del CL y secreción de P₄

Se ha observado que células de la granulosa colectadas de folículos de vacas suplementadas con grasa mostraron un incremento en la secreción de progesterona y de androstendiona *in vitro* (Wehrman *et al.*, 1991), en apoyo a lo anterior Grummer y Carroll, (1991); Staples *et al.* (1998) observaron que suplementación con grasa la dieta de vacas incrementa las concentraciones de colesterol y con ello un incremento en las concentraciones de P₄, mencionando como posible causa de este incremento la ovulación de folículos más grandes, y con ello la formación de un cuerpo lúteo grande el cual se piensa tenga un incremento en la capacidad esteroidogénica, no obstante Hinckley *et al.* (1996) reportan que la incubación de células lúteas dispersadas con PUFA's como ácidos eicosapentaenoico y docohexanoico disminuyen la secreción de progesterona, sugiriendose que se requiere más investigación para determinar si la grasa de la dieta afecta la secreción de progesterona.

Por otra parte se menciona que una causa en la disminución en la concentración de P₄ en suero sanguíneo en bovinos suplementados con grasa es la reducción de la tasa metabólica de progesterona cuando los animales son suplementados con grasas, reportando que cuando los cuerpos lúteos de vacas fueron removidos por ovariectomía,

la tasa de disminución de la concentración de progesterona en plasma fue menor en vacas alimentadas con un suplemento de grasa (CalCFA) que en vacas sin alimento con suplemento de grasa (Hawkins *et al.*, 1995).

Robinson *et al.* (2002) observaron que vacas con dietas altas de ácido linolenico, disminuyeron los niveles de progesterona (50%) del día 4 al 8 del ciclo estral, sugiriendo que el ácido linolenico actúa tanto directamente o indirectamente (via PG's) sobre la síntesis de esteroides, sin embargo otros investigadores, no encontraron cambios en la secreción de progesterona lútea en dietas que contenían semilla de lino (principalmente ácido del tipo n-3), semilla de girasol (n-6) (Ambrose *et al.*, 2006), harina de pescado (Mattos *et al.*, 2002), o aceite de pescado (Bilby *et al.*, 2006b).

El incremento de las concentraciones de progesterona en plasma se ha asociado con el aumento en las tasas de concepción de rumiantes lactando (Staples *et al.*, 1998) vía un incremento en la vida media del cuerpo lúteo en ganado bovino (Williams y Stanko, 1999), sin embargo aún se requiere de más investigación para determinar si la grasa de la dieta afecta la secreción de progesterona *in vivo*.

4.10.8. Efecto en la secreción de LH

La secreción de LH de la pituitaria y el crecimiento folicular en ganado bovino, son regulados parcialmente por el estado energético del animal. El estatus de energía en animales lactando ha sido definido como el consumo de energía neta del animal, menos la energía neta requerida para el mantenimiento y la producción de leche. Los estados de energía negativa, prolongan el anestro pos-parto (Randel, 1990) y reducen la frecuencia de pulsos de LH necesarios para el crecimiento de los folículos ováricos para la etapa preovulatoria en bovinos y ovinos (Shillo, 1992). Las grasas incluídas en

raciones para incrementar la concentración de energía en la dieta, pueden resultar en un incremento en el consumo de energía y mejoramiento del estado energético de la vaca (Palmquist y Weiss, 1994; Harrison *et al.*, 1995). La energía provista por los suplementos de grasa incrementa la secreción de LH en animales que consumen menos energía de la requerida (Hightshoe *et al.*, 1991; Sklan *et al.*, 1994).

El mecanismo independiente de energía por el cual los ácidos grasos de la dieta afectan la secreción de LH no ha sido establecido (Mattos *et al.*, 2000). En algunos estudios la frecuencia de pulsos de LH fue estimulada por la suplementación con grasa, pero en otros estudios no existieron cambios (Staples *et al.*, 1998). El mecanismo por el cual la suplementación de grasa estimula la liberación de LH es desconocido pero hay evidencia de que en vacas productoras de leche existe una disminución de la glucosa en la glándula mamaria proveyendo una señal al sistema de control hipotálamo-pituitaria para secretar más LH (Staples *et al.*, 1998). De igual forma, la suplementación de grasa puede incrementar la producción de glucosa a través del incremento de la producción de propionato. Este incremento en glucosa puede tener un efecto positivo en la liberación de LH (Funston *et al.*, 1995).

4.10.9. Efecto en la secreción de prostaglandinas

Existe evidencia de que el ácido linoleico, y eicosapentanoico (EPA), inhiben la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células endometriales en bovinos (Mattos *et al.*, 2003), mientras en ovejas ciclando se ha observado que una dieta alta en ácido linoleico retrasa la regresión lutea, por medio de la reducción del metabolito de PGF 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM) (Mattos *et al.* 2002). Petit *et al.* (2002) reportaron una mayor concentración de este PGFM en vacas que recibieron una mezcla de semilla de linaza

y aceite de pescado comparado con la semilla de linaza sola, además Petit *et al.* (2004), reportaron una tendencia a una mayor concentración de PGFM el día 15 con una dieta suplementada con semilla de girasol comparada con semilla de lino o grasa de sobrepaso (Megalac). Sin embargo, Robinson *et al.* (2002) no encontraron efecto en las concentraciones de PGFM en dietas basadas en ácido linoleico o ácido linolenico los días 15, 16 y 17 del ciclo, lo anteriormente descrito sugiere que cambios en la dieta involucrando PUFA's puede influenciar la respuesta de PGFM, pero no se ha presentado un patrón consistente.

El ácido linolenico puede ser desaturado y enlongado para formar ácido araquidónico, el cual es un precursor para la síntesis $PGF_{2\alpha}$. Las enzimas reguladoras esta conversión incluyen Δ_6 -desaturasa y cyclooxygenasa. El ácido linoleico puede inhibir la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ por inhibición competitiva con estas enzimas claves (Staples *et al.*, 1998). En contraste, Grant *et al.* (2003) encontraron que al suplementar vacas de carne durante el posparto con semillas de cártamo altas en linoleato se incrementó el metabolito PGF de 25 a 80 días posparto y tendió a disminuir la tasa de concepción. Filley *et al.* (2000) también demostraron que la alimentación con sales de calcio de aceite de palma incrementó el ácido linolenico y metabolitos de PGF en vaquillas de carne.

El ácido araquidónico y dos ácidos grasos encontrados en harina de pescado, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexanoico (DHA), han mostrado inhibir la actividad de la enzima ciclooxigenasa (Mattos *et al.*, 2000). Wamsley *et al.* (2003) encontraron que vaquillas con baja concentración de progesterona en la fase lutea, suplementadas con harina de pescado tuvieron menores concentraciones del metabolito de PGF,

después de disminuir las concentraciones de oxitocina, aunque, la harina de pescado no tuvo efecto en vaquillas con progesterona alta durante la fase lutea. El ácido linolenico ha mostrado también ser un inhibidor de la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Thatcher *et al.*, 1994). La cantidad y el tipo de ácidos grasos particulares que alcanzan los tejidos blanco probablemente influyen estimulando o inhibiendo la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Thatcher y Staples, 2000). También se ha sugerido que la disminución en las concentraciones de estradiol intrafolicular (Wherman *et al.*, 1991) y en suero (Hightshoe *et al.*, 1991), están asociadas con el suplemento de grasa lo cual puede implicar un importante papel en modular la respuesta luteal a la prostaglandina (Staples *et al.*, 1998).

4.10.10. Calidad de folículos y embriones

Los ácidos grasos en la dieta tienen un efecto importante sobre la tasa de gestación después del primer parto (50 %) en vacas alimentadas con una fuente de ácidos grasos de n-6 comparadas con el 87.5 % para vacas alimentadas con una fuente de ácidos grasos de n-3 (Petit *et al.*, 2001). Otros resultados han mostrado que vacas alimentadas con semilla de lino entera no presentan mortalidad embrionaria comparada con aquellas alimentadas tanto con Megalac o soya micronizada (Petit y Twagiramungu, 2006). Estos resultados sugieren que las dietas basadas en semilla de lino afectan la secreción de prostaglandinas y las propiedades funcionales de la respuesta de células mononucleares.

Las mayores proporciones de PUFA's en los fosfolípidos de oocitos se relacionaron con un incremento en la fertilidad en vacas lecheras (Zeron *et al.*, 2001), mientras que la alimentación con PUFA comparado con ácidos grasos mono insaturados resultó en

oocitos de calidad similar y subsecuente desarrollo de embriones *in vitro* (Bilby *et al.*, 2006b).

Alimentar con una fuente rica de ácidos grasos n-3 comparados con las sales de calcio de ácidos grasos de palma disminuyó la calidad de los embriones de las vacas lecheras donadoras, por una menor tasa de fertilidad y mayor degeneración de embriones, pero no existió efecto en la tasa de gestación de las vaquillas que recibieron embriones congelados de muy buena calidad. Alimentar con ácidos grasos n-3 no modifica el ambiente uterino de vaquillas receptoras como se demuestra por la falta de efecto de la dieta en el porcentaje de gestación, después de la transferencia de embriones, esto sugiere que los beneficios previamente documentados de los ácidos grasos n-3 en la fertilidad de vacas lecheras reflejan acciones biológicas alternativas (Petit *et al.*, 2008).

La suplementación de grasa en ganado lechero tiene efectos benéficos sobre el folículo, oocito, embrión y útero (Bilby *et al.*, 2006a). Los ácidos grasos juegan un papel importante en el cambio de las propiedades biofísicas y actividad biológica de las membranas, incluyendo la fluidez y proliferación de células.

Zeron *et al.* (2001), examinaron los efectos de los cambios estacionales en la composición de ácidos grasos del fluido folicular, células de la granulosa y oocitos colectados de ganado lechero, tanto en verano como en invierno. Las proporciones de ácidos grasos saturados en oocitos y células de la granulosa fueron mayores en verano y el porcentaje de ácidos grasos mono-insaturados y poli-insaturados fueron mayores en oocitos y células de la granulosa durante el invierno. Además, se detectaron relaciones entre la concentración de PUFA's, desarrollo del embrión y fertilidad. La

concentración de PUFA's del fluido folicular disminuyó en verano en asociación con una reducción en el desarrollo del embrión y fertilidad de las vacas lecheras.

El número de folículos, calidad del oocito, composición de lípidos en los componentes foliculares, y transición de la fase lipídica en oocitos fueron examinados en ovejas alimentadas por 13 semanas con una dieta suplementada con una sal de calcio de aceite de pescado (Zeron *et al.*, 2002), las ovejas alimentadas con aceite de pescado tuvieron más folículos, oocitos de mejor calidad, membranas de mejor integridad, y un incremento en la proporción de ácidos grasos de cadena larga insaturada en las células del cumulus.

La alimentación con una dieta alta en sales de calcio de aceite de palma (800 g d⁻¹) en vacas de leche lactando incrementó el número de blastocitos, producidos *in vitro* después de una recolección de ovocitos comparados con blastocitos obtenidos de vacas con una dieta baja en sales de calcio de aceite de palma (200 g d⁻¹) (Fouladi-Nashta *et al.*, 2004), no obstante no se determinó si los efectos benéficos fueron debidos a un enriquecimiento de ácidos grasos de cadena de 18: 2 o trans 18: 1 o ambos, indicando que la variación en la composición de los ácidos grasos tiene efectos diferenciales en las respuestas reproductivas y pueden afectar el desarrollo el oocito y embrión.

Existe evidencia que todos estos eventos pueden ser influenciados por la dieta con PUFA's. Oocitos de diferentes especies contienen altos niveles de ácidos grasos (FA's) (McEvoy *et al.*, 2000), pero en las células de la granulosa, se ha observado que la proporción de ácidos grasos saturados es mayor comparadas con la células circulantes en plasma, sugiriéndose un mecanismo selectivo en el consumo de ácidos

grasos por parte de estas células (Adamiak *et al.*, 2005). Los ácidos grasos son usados como una fuente de energía durante la maduración del oocito y el periodo de desarrollo del embrión antes de la implantación. Los oocitos bovinos expuestos a methyl palmoixirato para bloquear la oxidación de ácidos grasos redujeron la capacidad de formar blastocitos después de la fertilización (Ferguson y Leese, 2006).

El contenido PUFA del oocito puede afectar la maduración, criopreservación y subsecuente competencia de desarrollo. El ácido linoleico ha sido implicado en el crecimiento y diferenciación del oocito, regulación del arresto meiotico en la etapa de vesícula germinal y en prevenir el rompimiento de la vesícula germinal. Un gran número de oocitos considerado de muy buena calidad se colectaron en ovejas suplementadas con n-3 PUFA's (Zeron *et al.*, 2002). Las diferencias en la composición de ácidos grasos entre oocitos de muy buena calidad y buena calidad sugiere que estos pueden ser importantes para la competencia del oocito, así como la fertilización y desarrollo del mismo (Kim *et al.*, 2001).

5. Literatura citada

- Abe, H., M. Morimatsu, H. Nikami, T. Miyashige, and M. Saito. 1997. Molecular cloning and mRNA expresión of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *J. Anim. Sci.* 75:182-188.
- Abecia, J. A., J.M. Lozano, F. Forcada, and L. Zarazaga. 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 209–218
- Adam, C.L., P.A. Findlay PA and A.H. Moore. 1998. Effects of insulin-like growth factor-1 on luteinizing hormone secretion in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 50: 45-56.
- Adamiak, S.J., K. Mackie, R.G. Watt, R. Webb, and K.D. Sinclair. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* 73: 918-926.
- Adams, G.P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 54: 17-32.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Q. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier, and J.S. Flier. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 382: 250-252.
- Ambrose, D.J., J.P. Kastelic, R. Corbett, P.A. Pitney, H.V. Petit, J. A. Small, and P. Zalkovic. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 89: 3066-3074.
- Amstalden, M., M.R. Garcia, S.W. Williams, R.L. Stanko, S.E. Nizielski, C.D. Morrison, D.H. Keisler and G.L. Williams. 2000. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: Relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor 1. *Biol. Reprod.* 63:127-133.
- Amstalden, M., M.R. Garcia, R.L. Stanko, S.E. Niezielski, C.D. Morrison, D.H. Keisler, et al. 2002. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. *Biol. Reprod.* 66: 1555-1561.
- Amstalden, M., D.A. Zieba, J.E. Edwards, P.G. Harms, T.H. Welsh, R.L. Stanko, et al. 2003. Leptin acts at the bovine adenohypophysis to enhance basal and GnRH- mediated release of LH: Diferential effects are dependent upon nutritional history. *Biol. Reprod.* 69: 1539-1544.
- Ariyasu H., K. Takaya, T. Tagami, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Suda, T. Koh, K. Natsui, S. Toyooka, G. Shirakami, T. Usui, A. Shimatsu, K. Doi, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2001. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin like immunoreactivity levels in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 4753–4758.

- Armstrong, D.T., and H. Papkoff. 1976. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, 99: 1144.
- Armstrong, D.T., A.P. Pfitzner, G.M. Warnes, and R.F. Seemark. 1983. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora Goat. *J. Reprod. Fert.* 67: 403-410.
- Armstrong, D.T., and G. Evans. 1983. Factors influencing success of embryos transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19:31-42.
- Baird, D.T. 1992. Luteotropic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 28:95-102.
- Baker, J., M.P. Hardy, J. Zhou, C. Bondy, F. Lupu, A.R. Bellve, and A. Efstratiadis. 1996. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol.* 10: 903-918.
- Barash, I. A., C. C. Cheung, D. S. Weigle, H. P. Ren, E. B. Kabigting, J. L. Kuijper, D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 137: 3144-3147.
- Barb, C.R. 1999. The Brain-Pituitary-Adipocyte Axis: Role of Leptin in Modulating Neuroendocrine Function. *J. Anim. Sci.* 77: 1249-1257.
- Baril, G., B. Remy, B. Leboeuf, J.C. Vallet, J.F. Beckers and J. Saumande. 1992. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. 8th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1:126.
- Barreiro, M.L., F. Gaytan, J.E. Caminos, L. Pinilla, F.F. Casanueva, E. Aguilar, C. Dieguez, and M. Tena-Sempere. 2002. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis, *Biol. Reprod.* 67:1768–1776.
- Bartlewski, P.M., A.P. Beard, S.J. Cook, R.K. Chandolia, A. Honaramooz and N.C. Rawlings. 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil* 115:11-24.
- 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 gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 273-291.
- Beam, S.W., and W.R. Butler. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56: 133-142.
- Beam, S.W., and W.R. Butler. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 4: 411-424.
- Bearden, H.J., and J.W. Fuquay. 1984. *Applied Animal Reproduction*. 2nd Edition. Preston Publishing Company, Inc. A Prentice-Hall Professional Technical, Virginia. Pp. 4560.

- Benyo, D. F., G.F. Haibel, H.B. Laufman, and J.L. Pate. 1991. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine corpus luteum during the estrous cycle, luteolysis, and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 45: 229-234.
- Bilby, T. R., J. Block, B.C. do Amaral, O. Sa Filho, F.T. Silvestre, P. J. Hanser, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2006a. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *J. Dairy Sci.* 89: 3891-3903.
- Bilby T.R., A. Sozzi, M.M. Lopez, F.T. Silvestre, A.D. Ealy, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2006b. Pregnancy, bovine somatotropin and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: 1. Ovarian, conceptus, and growth hormone-insulin-like growth factor system responses. *J. Dairy Sci.* 89: 3360-3374.
- Binelli, M., J. Hampton, W.C. Buhi, and W.W. Thatcher. 1999. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biol. Reprod.* 61: 127–134.
- Blache, D., R.L. Tellam, L.M.L Chagas, M.A. Blackberry, P.E. Vercoe, and G.B. Martin. 2000. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J. Endocrinol.* 165:625-637.
- Blanche, D. 2003. Balance de energía y reproducción en rumiantes: Procesos endocrinos y neuroendocrinos. Memoria. Colegio de Postgraduados. 151-167.
- Blache, D., S. Zhang, y G.B. Martin. 2003. Fertility in males: modulators of the acute effects of nutrition on the reproductive axis of male sheep. *Reprod. Suppl.* 61: 387–402.
- Bolaños, J.M., M. Forsberg, H. Kindahl, and H. Rodriguez-Martinez. 1996. Influence of body condition and restricted suckling on post-partum reproductive performance of Zebu cows (*Bos indicus*) in the humid tropics. *Reprod. Dom. Anim.* 31:363-367.
- Bossis, L., R.P. Wettemann, S.D. Welty, J.A. Vizcarra, L.J. Spicer, and M.G. Diskin. 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J. Anim. Sci.* 77:1536-1546.
- Boukhliq R and Martin GB. 1996. Relationship between the nutritional stimulation of gonadotrophins secretion and peripheral cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of glucose and insulin in rams. *Anim. Reprod. Sci.* 41:201-204.
- Boukhliq, R., G.B. Martin, C.L. White, M.A. Blackberry, and P.J. Murray. 1997. Role of glucose, fatty acids and protein in regulation of testicular growth and secretion of gonadotrophin, prolactin, somatotrophin and insulin in the mature ram. *Reprod. Fert. Dev.* 9:515-524.
- Bucholtz, D.C., N.M. Vidwans, C.G. Herbosa, K.K. Schillo, and D.L. Foster. 1996. Metabolic interfases between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinology.* 137:601-607.

- Bucholtz, D.C., A. Chiesa, W.N. Pappano, S. Nagatani, H. Tsukamura, K.I. Maeda, and D.L. Foster. 2000. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the developing diabetic sheep. *Biol. Reprod.* 62:1248-1255.
- Bungartz, L., and H. Niemann. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fert.* 101:583-591.
- Butler, W.R., J.J. Calaman and S.W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74: 858–865.
- Butler, W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:449-457.
- Cahill, L.P., J.C. Mariana, and P. Mauleon. 1979. Total follicular population in ewes of high and low ovulation rate. *J. Reprod. Fert.* 55:27-36.
- Cahill, L.P., and P. Mauleon. 1980. Influences of season, cycle and breed on the follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fert.* 59:321-328.
- Cahill, L.P., M.A. Driancourt, W.A. Chamley, and J.K. Findlay. 1985. Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 75:599-607.
- Caminos, J.E., M. Tena-Sempere, F. Gaytan, J.E. Sanchez- Criado, M.L. Barreiro, R. Nogueiras, F.F. Casanueva, E. Aguilar, and C. Dieguez. 2003. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144: 1594–1602.
- Campbell, B.K., R.J. Scaramuzzi, and R. Webb. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:335-350.
- Campfield, L.A., F.J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn. 1995. Recombinant mouse ob protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and the central neural networks. *Science* 269: 546-549.
- Caraty A and D. Skinner. 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 140: 1-6.
- Caraty, A., and B. Delaleux. 2001. The neuronal control of ovulation in the ewe: Dynamics of steroid regulation of GnRH secretion during the oestrus cycle. *Memoria. II curso Internacional. Fisiología de la reproducción en rumiantes. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De Mexico del 18 a 21 de septiembre. Pag 137-154.*
- Cerri, R. L.A., R.G.S. Bruno, R.C. Chebel , K.N. Galvao, H. Rutigliano, S.O. Juchem, W.W. Thatcher, D. Luchini, and J.E.P. Santos. 2004. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: (Suppl. 1): 297. (Abstr.).

- Chen, M. D., K.T. O'Byrne, S.E. Chiappini, J. Hotchkiss, and E. Knobil. 1992. Hypoglycemic "stress" and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: Role of the ovary. *Neuroendocrinology* 56: 666-673.
- Childs, S., A.A. Hennessy, J.M. Sreenan, D.C. Wathes, Z. Cheng, C. Stanton, M.G. Diskin, and D.A. Kenny. 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology*. 70: 595-611.
- Clarke, L. J., R.J. Horton, and B.W. Doughton. 1990. Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 127: 1470-1476.
- Cumming, I.A., J.M. Brown, M.A. Blockey, C.G. Winfield, R. Baxter, and J.R. Goding. 1971. Constancy of interval between LH release and ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 24: 134-135.
- Cunningham, J.G. 2003. *Fisiología veterinaria*. Tercera Edición. Elsevier España. Pp 575.
- David G.A., and R. Webb. 1997. Ovarian follicular dominance: The role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* 2: 139–146.
- D'Alessandro, A., G. Martemucci, M.A. Colonna, C. Cafueri, F. Totoda. 1997. Some effects of adding p-LH in defined amounts to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrous ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 91-98.
- Delavaud, C., F. Bocquier, Y. Chilliard, D.H. Keisler, A. Gertler, and G. Kann. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: Effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J. Endocrinol.* 165:519-526.
- Delavaud, C., A.F. Erly, Y. Faulconnier, F. B Ocquier, G. Kann, and Y. Chilliard. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J. Anim. Sci.* 80:1317-1328.
- Diskin, M.G., D.R. Mackey, J.F. Roche and J.M. Sreenan. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78:345-370.
- Dissen, G.A., C. Romero, A.N. Hirshfield, and S.R. Ojeda. 2001. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*. 142: 2078-86.
- Dodson, W.C. and D.W. Schomberg. 1987. The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 120: 512-516.

- Doney, J. M., R.G. Gunn, J.N. Peart, and W.F. Smith. 1981. Effect of body condition on pasture type herbage intake, performance during lactation and subsequent ovulation rate in Scottish Blackface ewes. *Anim. Prod.* 33, 241–247
- Dong, J., D.F. Albertini, K. Nishimori, T.R. Kumar, N. Lu, and M.M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383 531-535.
- Downey, B.R. 1980. Regulation of the estrous cycle in domestic animals: A review. *Can. Vet. J.* 21: 301-306.
- Downing, J.A., and R.J. Scaramuzzi. 1991. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophin and metabolic hormones in sheep. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 43: 209-227.
- Downs, S.M. 1995. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev. Biol.* 167 502-12.
- Driancourt, M.A. R.C. Fry, I.J. Clarke, and L.P. Cahil. 1987. Follicular growth y regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.* 79: 635-641.
- Driancourt, M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 35: 55-79.
- Dunn, T., y G. Moos. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70:1580-1593.
- Durlinger, A.L., P. Kramer, B. Karels, F.H. de Jong, J.T. Uilenbroek, J.A. Grootegoed and A.P. Themmen. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 140. 5789-5796.
- Durlinger, A.L., M.J. Gruijters, P. Kramer, B. Karels, H.A. Ingraham, M.W. Nachtigal, J.T. Uilenbroek, J.A. Grootegoed and A.P. Themmen. 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 143: 1076-1084.
- Dyer, C.J., J.M. Simmons, R.L. Matteri, and D.H. Keisler. 1997^a. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissue and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14:119-128.
- Dyer, C.J., I.M. Simmons, R.L. Matteri and D.H. Keisler. 1997^b. Effects of an intravenous injection of NPY on the leptin and NPY-Y1 receptors mRNA expression in ovine adipose tissue. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14: 325- 333.
- Ehrhardt, R.A., R.M. Slepatis. I. Siegal-Willott, M.E. Van Amburgh, A.W. Bell and Y.R. Boisclair. 2000. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J. Endocrinol.* 166: 519-528.
- Enright, W.I., L.I. Spicer, D.I. Prendiville, M.G. Murphy and R.M. Campbell. 1994. Interaction between dietary intake and ovariectomy on concentrations of insulin-like growth factor - I, GH and LH in plasma of heifers. *Theriogenology.* 41: 1231-1240.

- Eppig, J.J. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*. 13: 569-574.
- Erikson, G.F., and K.J. Ryan. 1976. The effect of LH/FSH, dibutiryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogens by rabbit granulosa all in vitro. *Endocrinology*, 97: 108.
- Erikson, G.F., and D.A. Magoffin. 1983. The endocrine control of the follicle androgen Biosynthesis. *J. Steroid. Biochem.*, 19: 113-117.
- Evans, N.P., G.E. Dahl, D. Mauger, and F.J. Karsch. 1995. Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the resurge period in the ewe. *Endocrinology* 136:1603-1609.
- Evans, A. C. O., J.D. Flynn, K.M. Quinn, P. Duffy, P. Quinn, S. Madgwick, T.F. Crosby, M.P. Boland, and A.P. Beard. 2001. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality of fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology*. 56: 923–936
- Evans, A.C. 2003 Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 240-246.
- Ezaqui, O. 1997. Regulatory elements in the insulin responsive glucose transporter (Glut4) gene. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 241:1-6.
- Ferguson, E.M., and H.J. Leese. 2006. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1195-1201.
- Filley, S.J., H.A. Turner, and F. Stormshak. 2000. Plasma fatty acids, prostaglandin F_{2α} metabolite, and reproductive response in postpartum heifers fed rumen by-pass fat. *J. Anim. Sci.* 78: 139-144.
- Fink, G. 1988. Gonadotropin secretion and its control. *The physiology of reproduction*. Ed. New York, Raven Press.
- Fitz, T. A., M.H. Mayan, H.R. Sawyer, and G.D. Niswender. 1982. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 27:703-711.
- Fitz, T.A., D.F. Contois, M.M. Marr, C.F. Rexroad and M.A. Fritz. 1993. Effects of substrate supplementation with hydroxycholesterol analogues and serum lipoproteins on ovine luteal cell progesterone secretion *in vitro*: demonstration of prostaglandin F_{2α} luteolytic actions in a defined model system. *J. Reprod. Fertil.* 97:57-63.
- Flynn, J. D., P. Duffy, M.P. Boland, and A.C.O. Evans. 2000. Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 285–296
- Fortune, J.E., J. Sirois, and S.M. Quirk. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, 29: 95-109.

- Foster, D.L., and D.H. Olster. 1985. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: Patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology* 116: 375-381.
- Foster, D.L. and S. Nagatani. 1999. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: Role in timing puberty. *Biol. Reprod.* 60:205-215.
- Fouladi-Nashta, A.A., C.G. Gutierrez, H. F. Russel, P.C. Garnsworthy, and R. Webb. 2004. Effects of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol. Reprod. Special Issue*: 107. (Abstr.).
- Funston, R.N., A.J. Roberts, D.L. Hixon, D.M. Hallford, D.W. Sanson, and G.E. Moss. 1995. Effect of acute glucose antagonism on hypophyseal hormones and concentrations of insulin like growth factors (IGF-I) and IGF- binding proteins in serum, anterior pituitary and hypothalamus of ewes. *Biol. Reprod.* 52: 1179-1186.
- Funston, R.N. 2004. Fat supplementation and reproduction in beef females. *J. Anim. Sci.* 82: E154-161.
- Galloway, S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Lairo, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H. Davis and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25: 279-83.
- Gammeltoft, S., P. Staun-Olsen, B. Ottesen and J. Fahrenkrug. 1984. Insulin receptors in rat brain cortex. Kinetic evidence for a receptor subtype in the central nervous system. *Peptides*.5:937-944.
- Gangrade, B., and J.V. May. 1990. The production of transforming growth factor-B in the porcine ovary and its secretion in vitro. *Endocrinology.* 127: 2372-2380.
- Gaston-Parry, O., K. Heasman, J.K. Nemorin, and T.J. Robinson. 1988. A radioimmunoassay for fluorogestone acetate (FGA) and its application to the measurement of plasma FGA and progesterone in ewes treated with FGA-impregnated intravaginal sponges. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 57-67
- Gayerie, F., Y. Cognie, A. Locatelli and J. Saumande. 1983. A study of ovarian activity in the ewe using chronic catheterization of the utero-ovarian vein. *Theriogenology.* 19:739.
- Gong, J.G. 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:229-241.
- Gonzalez, B.A., J. Santiago M., J. Cocero M., and A. Lopez S. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54: 1055-1064.
- Gonzalez, B.A., R.M. Garcia G., V. Dominguez, S. Moreno J., A. Lopez S., and J. Cocero M. 2002a. Influence of physical ablation of dominant follicles on sheep superovulatory yields. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 234 (abstr).

- Gonzalez, B.A., J. Santiago M., J. Cocero M., C.J.H. Souza, N.P. Groome, R.M. Garcia G., A. Lopez S., and D.T. Baird. 2002b. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. *Theriogenology* 57: 1263-1272.
- González, B.A., D. Baird, B.K. Campbell, J. Cocero M., R.M. García-García, E.K. Inskeep, A. López S., A.S. McNeilly, J. Santiago M., C.J.H. Souza and A. Veiga L. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 421-435.
- Goodman, R.L., and F.J. Karsch. 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: Differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 107:1286-1290.
- Goodman, R.L. 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *The Physiology of Reproduction* (Editors: E. Knobil and JD Neill), 2nd Edition. Raven Press, New York. Pp. 660-693.
- Gordon, I. 1997. Introduction to controlled reproduction in sheep. *Controlled reproduction in sheep and goats*. Cab. International. Dublin, Ireland. 1-6 p.
- Grant, M.H.J., B.W. Hess, D.L. Hixon, E.A. Van Kirk, B.M. Alexander, T.M. Nett, and G.E. Moss. 2003. Effect of feeding high-linoleate safflower seeds on reproductive endocrine dynamics in postpartum beef females. *Proc. West. Sec. Amer. Soc. Anim. Sci.* 54: 36-39.
- Greaney, K.B., M.F. McDonald, H.W. Vivanco and H.R. Tervit. 1991. Out of season embryo transfer in five breeds of imported sheep. *Proc. New Zealand Soc. of Anim. Prod.* 51:129-131.
- Greve, T., H. Callesen, P. Hyttel, R. Hoier, and R. Assey. 1995. The effects of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43: 41-50.
- Grummer, R.R. y D.J. Carroll. 1991. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 69: 3838–3852.
- Gualillo, O., J.E. Caminos, M. Blanco, T. Garcia-Caballero, M. Kojima, K. Kangawa, C. Dieguez, and F.F. Casanueva. 2001a. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142: 788–794.
- Gualillo, O., J.E. Caminos, M. Kojima, K. Kangawa, E. Arvat, E. Ghigo, F.F. Casanueva, and C. Dieguez. 2001b. Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach, *Eur. J. Endocrinol.* 144:687–690.
- Gutierrez, C.G., B.K. Campbell, and R. Webb. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 56: 608-616.
- Hadley, M.E. 1988. *Endocrinology*. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey Pp. 518.
- Hafez, E.S.E. 1996. *Reproducción e inseminación en animales domesticos*, Sexta edición. Interamericana-McGraw-Hill.Pp.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2002. *Reproducción e Inseminación en animales*. Séptima Edición. McGraw-Hill. Pp.

- Hall, J.B., K.K. Schillo, S.M. Hileman and J.A. Boling. 1992. Does tyrosine act as a nutritional signal mediating the effects of increased feed on luteinizing hormone patterns in growth restricted lambs? *Biol. Reprod.* 46:573-579.
- Harrison, J.H., R.L. Kincaid, J.P. McNamara, S. Waltner, K.A. Loney, R.E. Riley and J.D. Cronrath. 1995. Effect of whole cottonseeds and calcium salts of long-chain fatty acids on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:181-193.
- Hauger, R.L., F.J. Karsch, and D.L. Foster. 1977. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology* 101:807-17.
- Hawkins, D.E., C.J. Belfiore, J.P. Kile, and G.D. Niswender. 1993. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 48: 1185-1190
- Hawkins, D.E., K.D. Niswender, G.M. Oss, C.L. Moeller, K.G. Odde, H.R. Sawyer, and G.D. Niswender. 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J. Anim. Sci.* 73: 541-545.
- Heisler, L.E., A.J. Tumber, R.L. Reid, and D.A. Van Vugt. 1994. Vasopressin mediates hypoglycemia-induced inhibition of luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *Neuroendocrinology.* 60: 297-304.
- Helmreich, D. L., L.G. Mattern, and J.L. Cameron, J. L. 1993. Lack of a role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fasting-induced suppression of luteinizing hormone secretion in adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology.* 132: 2427-2437.
- Henderson, K.M., K.P. McNatty, L.E. O'keefe, S. Lun, D. Heat, and M.D. Prisk. 1987. Differences in gonadotropin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from Booroola and Merino ewes which are homozygous, heterozygous or non carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.* 81:395-402.
- Henry, B.A., J.W. Godin, W.S. Alexander, A.J. Tilbrook, B.J. Canny, F. Dunshea, A. Rao, A. Mansell and I.J. Clarke. 1999. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the neuroendocrine function. *Endocrinology.* 140: 1175-1182.
- Henry, B.A., A.J. Tilbrook, F.R. Dunshea, A. Rao, D. Blanche, G.B. Martin, et al. 2000. Long-term alternations in adiposity affect the expression of melanin-concentrating hormone and enkephalin but not proopiomelanocortin in the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 168: 317-324.
- Henry, B.A., J.W. Godin, A.J. Tilbrook, F.R. Dunshea, and I.J. Clarke. 2001. Intracerebroventricular leptin infusion elevates the secretion of luteinizing hormone without affecting food intake in long-term

- food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of body weight. *J. Endocrinol.* 168: 67-77.
- Hightshoe, R.B., R.C. Cochran, L.R. Corah, G.H. Kiracofe, D.L. Harmon and R.C. Perry. 1991. Effects of calcium soaps of fatty acids on post-partum reproductive function in beef cows *J. Anim. Sci.* 69: 4097-4103.
- Hileman, S. M., K.K. Schillo, and J.E. Hall. 1993. Effects of acute, intracerebroventricular administration of insulin on serum concentrations of luteinizing hormone, insulin, and glucose in ovariectomized lambs during restricted and ad libitum feed intake. *Biol. Reprod.* 48: 117-124.
- Hillier, S.G., C.R. Harlow, H.J. Shaw, E.J. Wikings, A.F. Dixon, and J.K. Hodges. 1988. Cellular aspects of pre-ovulatory folliculogenesis in primate ovaries. *Hum. Reprod.* 3: 507-511.
- Hinckley, T., R.M. Clark, S.L. Bushmich, and R.A. Milvae. 1996. Long chain polyunsaturated fatty acids and bovine luteal cell function. *Biol. Reprod.* 55: 445-449.
- Hiney, J.K., V. Srivastava, C.L. Nyberg, S.R. Ojeda and W.L. Dees 1996. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology.* 137: 3717-3728.
- Holtenius, K., S. Agenas, C. Delavaud and Y. Chilliard. 2003. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci.* 86. 883-891.
- Hoyer, P. B., and S.L. Marion. 1989. Influence of agents that affect intracellular calcium regulation cells of the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 86:445-455.
- Huang, E.J., K. Manova, A.I. Packer, S. Sanchez, R.F. Bachvarova and P. Besmer .1993. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev. Biol.* 157:100-109.
- Hunter, R.H. 1989. Ageing of the unfertilized cow egg *in vivo*: How soon is fertility compromised?. *Vet. Rec.* 124: 489-490.
- I'anson, H. and J.S. Legan. 1988. Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 82: 341-351.
- Jabbour, H. N., J.P. Ryan, G. Evans, and W.M. Maxwell. 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH_p to induce superovulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 3,699-707.
- Jablonka, A., A.T. Grazul-Bilska, D.A. Redmer, and L.P. Reynolds. 1993. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology.* 133: 1871-1879.
- Jenkins, T.C. 1992. Lipid Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 76: 3851-3863.
- Jenkins, T.C., and W.C. Bridges Jr. 2007. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 109: 778-789.

- Jolly, D.P., S. McDougall, L.A. Fitzpatrick, K.L. Macmillan, and K.W. Entwistle. 1995. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 49:477-492.
- Jones, P. C., and A.W. Hsueh. 1981. Regulation of progesterone metabolizing enzyme by adrenergic agents, prolactin, and prostaglandin in cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 109: 1347-1354.
- Juengel, J.L., H.A. Garverick, A.L. Johnson, R.S. Youngquist, and M.F. Smith. 1993. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132: 249
- Kafi, M., and M.R. McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48:137–157.
- Kerry L.H., and S. Harvey. 2000. Growth hormone: a reproductive endocrine–paracrine regulator? *Rev. Reprod.* 5:175–182.
- Karsh, F.J., J.E. Bittman, D.L. Foster, R.L. Goodman, S.J. Legan, and J.E. Robinson. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 40:185-232.
- Karsch, F.J., J.M. Bowen, A. Caraty, N.P. Evans, and S.M. Moenter. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* 56:303-309.
- Keisler, D.H., J.A. Daniel, and C.D. Morrison. 1999. The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54: 425-435.
- Kezele, P.R., E.E. Nilsson and M.K. Skinner. 2002. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell Endocrinol.* 192: 37-43.
- Kim, J.Y., M. Kinoshita, M. Oshnishi, and Y. Fukui. 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction.* 122: 131-138.
- Kim, S. and N. Moustaid-Moussa. 2000. Secretory, Endocrine and Autocrine/Paracrine Function of the Adipocyte. *Am. Soc. Nut. Sci. Supplement.* 3110s-3115
- Kirby, C.J., W.W. Thatcher, R.J. Collier, F.A. Simmen and M.C. Lucy. 1996. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. *Biol. Reprod.* 55: 996-1002.
- Klusmeyer T.H., and J.H. Clark. 1991. Effects of dietary fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74: 3055-3067.
- Kneth, M., P. Feng, and K.J. Catt. 1987. Bifunctional role of transforming growth factor-B during granulosa cell development. *Endocrinology.* 120:1243-1249.
- Knickerbocker, J.J., M.C. Wiltbank, and G.D. Niswender. 1988. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Dom. Anim. Endocrin.* 5: 91-107.

- Kojima, N. F. 1991. Regulation of circulating concentrations of LH, FSH and 17 β -estradiol in the bovine by synthetic progestins and progesterone. Master Thesis, Faculty of The Graduate College in the University of Nebraska. Lincoln, Nebraska.60-70 p.
- Kojima, F. N., T.T. Stumpf, A.S. Cupp, L.A. Werth, M.S. Robertson, M.W. Wolfe, R.J. Kittok, and J.E. Kinder. 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony do not mimic the corpus luteum in regulation in luteinizing hormone and 17 β -estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.* 47:1009–1017.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656–660.
- Korbonits, M., A.P. Goldstone, M. Gueorguiev, and A.B. Grossman. 2004. Ghrelin—a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25: 27–68.
- Krasnow, M.S., and R.A. Steiner. 2006. Physiological mechanism integrating metabolism and reproduction. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition. Elsevier. P. 2553-2625.
- Lalman, D.L., D.H. Keisler, J.E. Williams, E.J. Scholljegerdes, and D.M. Mallet. 1997. Influence of postpartum weight and body condition change on duration of anestrus by undernourished suckled beef heifers. *J. Anim. Sci.* 75:2003-2008.
- Leyva, V., B.C. Buckrell, and J.S. Walton. 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*. 50: 395-416.
- Lozano, J.M., J.A. Abecia, F. Forcada, L. Zarazaga and B. Alfaro. 1998. Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the cycle. *Theriogenology* 49: 539–546.
- Lozano, J.M., P. Lonergan, M.P. Boland, and D. O'Callaghan. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: Effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 125 : 543-553.
- Lucy, M.C., R.C. Staples, M.F. Michel, and W.W. Thatcher. 1991. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:473-482.
- Lucy, MC., 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.
- Lucy M.C., R.L. De la Sota, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 1993. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (Sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J. Dairy Sci.* 76: 1014-1027.

- Lucy MC, C.K. Boyd, A.T. Koenigsfeld and C.S. Okamura .1998. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *J. Dairy Sci.* 81: 1889-1895.
- Maciel, M.N., D.A. Zieba, M. Amstalden, D.H. Keisler, J. Neves, and G.L. Williams. 2004. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its GnRH-mediated release in peripubertal heifers. *Biol. Reprod.* 70: 229-235.
- Mann, G.E. 1999. The role of luteal oxytocin in episodic secretion of prostaglandin F_{2α} at luteolysis in the ewe. *Anim Reprod. Sci.* 57:167-175.
- Martin, G.B. and G. Banchemo H. 1999. Nutrición y reproducción en rumiantes. I Curso Internacional de fisiología de la reproducción de Rumiantes. Memoria. XX Aniversario de Ganadería Colegio de Postgraduados, Montecillo, Pag 27-58.
- Martin, G.B., C.A. Price, J.C. Thiery, and R. 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. Rodger and D. Blache. 2004. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 491–501.
- Mattos, R., C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2000. Effects of dietary acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5: 38-45.
- Mattos R., C.R. Staples, J. Williams, A. Amorocho, M.A. McGuirre, and W.W. Thatcher. 2002. Uterine, ovarian and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fishmeal. *J. Dairy Sci.* 85: 755-764.
- Mattos R. A. Guzeloglu, L. Bandinga, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2003. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F_{2α} and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase A₂ in bovine endometrial cells. *Biol. Reprod.* 69: 780-787.
- Maurer, R.R. and S.E. Echternkamp .1982. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology.* 17:11–22.
- McCracken, J.A., W. Schramm, and W.C. Okulicz. 1984. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF_{2α} from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7:31-35.
- McCracken, J.A., E.E. Custer, J.C. Lamsa, and A.G. Robinson. 1995. The central oxytocin pulse generator: A pacemaker for luteolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 395:133-154.
- McDonald, P., R. Edwards, and J.F.D. Greenhalgh. 1993. *Nutrición animal* 4^a Edición. Editorial Acribia, Zaragoza (España). 571 pp.

- McEvoy, T.G., G.D. Coull, P.J. Broadbent, J.S.Hutchinson, and B.K. Speake. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucid. *J. Reprod. Fertil.* 118: 163-170.
- McGee, E.A., and A.J. Hsueh. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21: 200-214.
- McNeilly, A.S. 1984. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 72: 165-72.
- 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.
- Medina, C. L., S. Nagatani, T.A. Darling, D.C. Bucholtz, H. Tsukamura, K. Maeda, and D.L. Foster. 1998. Glucose availability modulates the timing of the luteinizing hormone surge in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 10:785-792.
- Mihm, M., N. Curran, P. Hyttle, P.G. Knight, M.P. Boland, and J.F. Roche. 1999. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 116: 293-304
- Miller, D.W., D. Blache and G.E. Martin. 1995. The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. *J. Endocrinol.* 147: 321-329.
- Miller, D.W., D. Blache, R. Boukhliq, J.D. Curlewis, and G.B. Martin. 1998. Central metabolic messengers and the effects of diet on gonadotrophin secretion in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility.* 112: 347-356.
- Moenter, S.M., A. Caraty and F.J. Karsch. 1990. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology.* 127:1375-1384.
- Moenter, S.M., A. Caraty, A. Locatelli and F.J. Karsch. 1991. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology.* 129:1175-1182.
- Monget, P., D. Monniaux, C. Pisselet and P. Durand. 1993. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology.* 132: 1438-1446
- Moore, N.W., and J. Eppleston. 1979. Embryo transfer in the Angora goat. *Aust. J. Agric. Res.*, 30: 973-981.
- Morrison, C.D., J.A. Daniel, B. Holmberg, N. Raver, A. Gertler and D.H. Keisler. 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: Effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 168:317-324.

- Mostyn, A.D., H. Keisler, R. Webb, T. Stephenson, and M.E. Symonds. 2001. The role of leptin in the transition from fetus to neonate. *Froc. Nutr. Soc.* 60:187-194.
- Murdoch, W. J. 1985. Follicular determinants of ovulation in the ewe. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2:105-121.
- Nagatani S, D.C. Bucholtz, K. Murahashi, M.A. Estacio, H. Tsukamura, D.L. Foster, and K.I. Maeda. 1996. Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats. *Endocrinology.*137:1166-1170
- Nagatani, S., Y. Zeng, D.R. Keisler, D.L. Foster and C.A Jaffe. 2000. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology* 141:3965-3975.
- Nilsson, E., J.A. Parrott and M.K. Skinner. 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 175: 123-130.
- Niswender G.D., T.J. Reimers, M.A. Diekman, and T.M. Nett. 1976. Blood flow: A mediator of ovarian function. *Biol. Reprod.* 14: 64-81.
- Niswender, G.D., and T.M. Nett. 1988. The corpus luteum and its control. En: E. Knobil et al. (eds). *The Physiology of Reproduction.* Raven Press. New York. Pag. 489-525.
- Niswender, G.D., and T.M. Nett. 1994. Corpus luteum and its control in infraprimate species. *The Physiology of Reproduction* 2nd ed. Knobil, E. and J.D. Neill (Eds). Raven Press. Ltd., New York. 781-816 p.
- Noel, B., J.L. Bister, and R. Paquay. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod Fert.* 99:695-700.
- O'Callaghan D., H. Yaakub, P. Hyttel, L.J. Spicer and M.P. Boland. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fert.* 118: 303-313.
- Ohkura, S., T. Ichimaru, F. Itoh, S. Matsuyama, and H. Okamura. 2004. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinology.* 145: 3239-3246.
- Otsuka, F. and S. Shimasaki. 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8060-8065.
- Otto, K.L., J.D. Ferguson, D.G. Fox, and C.J. Sniffen. 1991. Relationship between body condition score and composition of ninth to eleventh rib tissue in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:852-859.
- Pace-Asciak C., and L. S. Wolfe. 1968. Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoleic, and linolenic acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 152: 784-787.

- Padilla R.F.J., S.G.E. Mapes, and K.F. Jimenez. 1988. Perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. *Técnica Pecuaria en México* 28: 96-108.
- Pagotto, U., A. Gambineri, C. Pelusi, S. Genghini, M. Cacciari, B. Otto, T. Castaneda, M. Tschop, and R. Pasquali. 2003. Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4139–4143.
- Palmquist, D.L., and W.P. Weiss. 1994. Blood and hydrolyzed feather meals as sources of undegradable protein in high fat diets for cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77:1630–1643.
- Pant, H.C., C.R.N. Hopkinson and R.J. Fitzpatrick. 1977. Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 73:247–255.
- Parrott, J.A., and M.K. Skinner. 1999. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology.* 140: 4262-4271.
- Pate, J.L. 1994. Cellular components involved in luteolysis. *J. Anim. Sci.* 72: 1884-1890.
- Peluso, J., B.C. Delidow, J. Lynch, and B.A. White. 1991. Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of 17β -estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology.* 128: 191-196.
- Petit, H.V., R.J. Dewhurst, J.G. Proulx, M. Khalid, W. Haresign, and H. Twagiramungu. 2001. Milk production, milk composition, and reproductive of dairy cows fed different fats. *Can J. Anim. Sci.* 81:263-271.
- Petit, H.V., R.J. Dewhurst, N.D. Scollan, J.G. Proulx, M. Khalid, W. Haresign, H. Twagiramungu, and G.E. Mann. 2002. Milk production and composition, ovarian function and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fatty acids. *J. Dairy Sci.* 285: 889-899.
- Petit, H.V., C. Germiquet, and D. Lebel. 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition and prostaglandin secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 3889-3898.
- Petit, H.V., and H. Twagiramungu. 2006. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology.* 66:1316-1324.
- Petit, H.V., F.B. Cavaliere, G.T.D. Santos, J. Morgan and P. Sharpes. 2008. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flax seed and the success of embryo transfer. 91: 1796-1790.
- Picazo, R.A. y A. Lopez-Sebastian. 1995. Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Investigación Agraria*, 10, 77-93.
- 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. Fertil.* 93: 43-51.

- Pisabarro, R., E. Irrazabal, A. Recalde, E. Barrios, A. Arocena, B. Aguirre, L.J. Garcia y J. Bonifazi. 1999. Leptina: Una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio en muestra poblacional uruguaya. Rev. Med. Uruguay 15: 1-12.
- 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. Fertil. 55:37-44.
- Randel, R.D. 1990. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. J. Anim. Sci. 68: 853-862.
- Recher, M.M. and Nyssey SP. 1986. Insulin-like growth factor (IGF)/somatomedin receptor subtypes: Estructure, function, and relationships to insulin receptors and IGF carrier proteins. Horm. Res. 24:152-159.
- Reddoch, R.B., R.M. Pelletier, G.J. Barbe, and D.T. Armstrong. 1986. Lack of ovarian responsiveness to gonadotropic hormones in infantile rats sterilized with busulfan. Endocrinology. 119: 879-886.
- Remy B., G. Baril, J.C. Vallet, R. Dofour, C. Chouvet C. J. Saumande, D. Chupin and J.F. Beckers. 1991. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats wich have been treated repetedly with porcine follicle-stimulating hormone?. Theriogenology. 36: 389-399.
- Rhodes, F.M., L.A. Fitzpatrick, K.W. Entwistle and G. Death. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. J. Reprod. Fert. 104: 41 - 49.
- Richards, J.S., and A.R. Midgley. 1976. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. Biol. Reprod. 14: 82-84.
- Richards, M.W., J.C. Spitzer, and M.B. Warner. 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at Calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. J. Anim. Sci. 62: 300-306.
- Roberts, R.M., J.C. Cross, and D.W. Learman. 1992. Interferons as hormones of pregnancy. Endocr. Rev. 13: 432-452.
- Robinson, J.J. 1996. Nutrition and reproduction. Anim. Reprod. Sci. 42: 25-34.
- Robinson J.J., C.J. Ashworth, J.A. Rooke, L.M. Mitchell, and T.G. McEvoy. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. Anim. Feed Sci. Tech. 126: 259-276.
- Robinson, R.S., P.G.A Pushpakumara, Z. Cheng, A.R. Peters. D.R.E. Abayasekara, and D.C. Wathes. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. Reproduction. 124: 119-131.
- Robinson, T. J. 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. Nature 206, 39-41.

- Roche, J.F. D. Mackey and M.D. Diskin. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60- 61: 703-712.
- Rodgers, R.J., J.D. O'Shea and J.K. Findlay. 1983. Progesterone production in vitro by small and large ovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* 69: 113.
- Rubianes, E. 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Acta de Fisiología*, 6: 93-103.
- Rutter, L.M., R. Snopek and J.G. Manns .1989. Serum concentrations of IGF-I in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 67: 2060-2066.
- Ryan, K.J., Z. Petro, and J. Kaiser. 1968. Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol.* 328: 355.
- Sansinanea, S.A., S.I. Cerone, L. Zonco, C. Garcia and N. Auza . 2001. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. *Nutr. Res.* 21: 1045 - 1052.
- Santos, J.E., W.W. Thatcher, R.C. Chebel, R.L. Cerri, and K.N. Galvao. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 513-535.
- Sawyer, H R., K.D. Niswender, T.D. Braden, and G.D. Niswender. 1990. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂ α Domest. *Anim. Endocrinol.* 7: 229-238.
- Scaramuzzi, R.J. 1984. Changes in pituitary-ovarian functions in ewes immune to steroid hormones. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 15, 191-194.
- Schechter, R., J. Whitmire, G.S. Wheet, D. Beju, K.W. Jackson, R. Harlow, and J.R. Gavin. 1994. Immunohistochemical and situ hybridization of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. *Brain Research.*639:9-27.
- Schneider, J.E., D.G. Friedenson, A.J. Hall, and G.N. Wade.1993 .Glucoprivation induces anestrus and lipoprivation may induce hibernation in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol.* 264:R573-R577.
- Schiewe M.C., J.G. Horward, L.S. Stuart, K.L. Goodrowe and D.E. Wildt. 1985. Human menopausal gonadotropin (HMG) for superovulation in sheep. *Theriogenology.* 23: 227.
- Schreiber, J.R., and G.T. Ross. 1976. Further characterization of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear translocation. *Endocrinology.* 99: 590.
- Schreihofe, D. A., D.B. Parfitt. and J.L. Cameron. 1993. Suppression of luteinizing hormone secretion during short term fasting in male rhesus monkeys: The role of metabolic versus stress signals. *Endocrinology.* 132: 1881-1889.
- Schrick, N.F., 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, R.P. Aitken, and I.S. Robertson. 1993. The effect of two different levels of progesterone priming on the response of ewes to superovulation. *Theriogenology*. 39:433–442
- Selk, G.E., R.P. Wettemann, K.S. Lusby N.V. Oltjen, S.L. Mobley, R.J. Rasby and J.C. Garmendia. 1988. Relationships among weight change, body condition and reproductive performance of orange beef cows. *J Anim. Sci.* 66: 3153-3159.
- Shillo, K.K. 1992. Effect of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1271-1282.
- Short, R.E., R.A. Bellows, R.B. Staigmille, J.G. Berardinelli, and E.E. Custer. 1990. Physiological mechanism controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68:799.
- Silvia J.W., and R.E. Raw. 1993. Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F_{2α} from the ovine uterus by ovarian steroids. *J. Reprod. Fertil.* 98:341-347.
- Simon, A.M., D.A. Goodenough, E. Li, and D.L. Paul. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*: 385 525-529.
- Skinner, D.C., B. Malpoux, B. Delaleu, and A. Caraty .1995. Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: Correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology* 136: 3230-3237.
- Skinner, D., N. Evans, B. Delaleu, R. Goodman, P. Bouchard, and A. Caraty. 1998. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:10978-10983.
- Skinner D.C., T. G. Harris, and N. P. Evans. 2000. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol Reprod.* 63: 1135-1142.
- Sklan, D., M. Kaim, U. Moallem, and Y. Folman. 1994. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows *J. Dairy Sci.* 77:1652–1660.
- Souza, C.J., B.K. Campbell, R. Webb, and D.T. Baird. 1997. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (FecB) *Endocrinology* 138:5333–5340.
- Spicer, L.J. W.B. Tucker and G.D. Adams. 1990. Insulin-Like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity and estrous behavior. *J. Dairy Sci.* 73: 929-937.
- Spicer, L.J., and C.C. Francisko. 1997. The adipose obese gene product, leptin: Evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology.* 38: 3374–3379.
- Spicer, L.J. 2001. Leptin. A possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21: 251-270.

- Sreenan, J.M., M.G. Diskin, and D.G. Morris. 2001. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. *Fertility in the High-Producing Dairy Cow*. 93-104.
- Staples, C.R., J.M. Burke, and W.W. Thatcher. 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:856-871.
- Stringfellow, D.A., K.P. Riddell, and O. Zurovac. 1991. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. *New Zealand Vet. J.* 8-17.
- Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:4908–4911.
- Tanaka, T., S. Nagatani, D.C. Bucholtz, S. Ohkura, H. Tsukumara, M. Kei-Ichiro, and D.L. Foster. 2000. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol. Reprod.* 62:1256-1261.
- Tanaka, K., H. Minoura, T. Isobe, H. Yonaha, H. Kawato, D.F. Wang, T. Yoshida, M. Kojima, K. Kangawa, and N. Toyoda. 2003. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 2335–2340.
- Tartaglia, L.A. 1997. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 6093-6096.
- Thatcher, W.W., C.R. Staples, G. Danet-Desnoyers, B. Oldick, and E.P. Schemitt. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl 3): 16-30.
- Thatcher, W.W., R.L. De la Sota, E. J. Schmitt, T.C. Diaz, L. Badinga, F. A. Simmen, C. R. Staples and Drost. M. 1996. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod. Fert. Devel.* 8: 203-217.
- Thatcher, W.W., M. Binelli, J. Burke, C.R. Staples, J.D. Ambrose and S. Coelho. 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology.* 47: 131-140.
- Thatcher W.W. and C.R. Staple. 2000. Effects of dietary fat supplementation on reproduction in lactating dairy cows. *Adv. Dairy Technol.* 12: 213-232.
- Thomas, G.B., J.E. Mercer, T. Karalis, A. Rao, J.T. Cummins and I.J. Clarke. 1990. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology* 126: 1361-1367.
- Thompson, J.G.E., A.C. Simpson, R.W. James, and H.R. Tervit. 1990. The application of progesterone-containing CIDR devices to superovulated ewes. *Theriogenology* 33:1297–1304

- Torres S., Y. Cognie, y G. Colas. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*. 27: 107-119.
- Tschöp, M., D.L. Smiley, M.L. Heiman. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913.
- Ungerfeld, R., and E. Rubianes. 1999. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *J. Anim. Sci.* 68, 349–353.
- Vendola, K., J. Zhou, J. Wang, O.A. Famuyiwa, M. Bievre and C.A Bondy. 1999. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol. Reprod.* 61: 353-357.
- Viñoles, C., A. Meikle, M. Forsberg and E. Rubianes. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51:1351-1361.
- 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 Gil, C. 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala.
- Vitt, U.A., E.A. McGee, M. Hayashi and A.J. Hsueh. 2000. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*. 141: 3814-3820.
- Vivanco, M.H.W. 1998. Trasnferencia embrionaria en ovinos y caprinos. Seminario Internacional “Aplicación de técnicas biotecnológicas en la reproducción de ovinos y caprinos”. Memoria. Chapingo Mex. P. 44-92.
- Wamsley, N.E., P.D. Burns, T.E. Engle, and R.M. Enns. 2003. Effect of fishmeal supplementation on endometrial sensitivity to oxytocin in beef heifers having low luteal phase progesterone. *Proc. West. Sec. Amer. Soc. Anim. Sci.* 54: 302-305.
- Wang J. A. 1998. Nutrient sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. 393:684–688.
- Warwick, B.L., R.O. Berry and W.R. Horlachwer. 1934. Results of mating rams to Angora females goats. *Proc. Am. Soc. Anim. Prod.* 225 (abstr.).
- Webb, R. and B.G. England. 1982. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: Associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology*. 110: 873-881.
- 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(E. Suppl.):E63–E74.

- Wehrman, M.E., T.H. Welsh, and G.L. Williams. 1991. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biol Reprod.* 45: 514-522.
- Wettemann, R.P., and L. Bossis. 1999. Energy intake regulates ovarian function in beef cattle. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1 - 8.
- Wheaton JE, Thomas DL, Kusina NT, Gottredson RG and Meyer RL .1996. Effects of passive immunization against inhibin-peptide on secretion of follicle-stimulating hormone and ovulation rate in ewes carrying the Booroola fecundity gene *Biol. Reprod.* 55: 1351–1355.
- Whisnant, C.S. and R.L. Goodman. 1988. Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol. Reprod.* 39:1032-1038.
- Williams, N. L., M.J. Lancas, and J.L. Cameron. 1996. Stimulation of luteinizing hormone secretion by food intake: evidence against a role for insulin. *Endocrinology.* 137: 2565-2571.
- Williams, G.L. and R.L. Stanko. 1999. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. *J. Anim. Sci.* Available: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0915.pdf>.
- Wiltbank, M.C., J.J. Knickerbocker and G.D. Niswender. 1989. Regulation of corpus luteum by protein kinase C. I. Phosphorylation activity and steroidogenic action in large and small ovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 40: 1194-1200.
- Wiltbank, C.M. 1994. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *J. Anim. Sci.* 72:1873-1883.
- Wu, Z., O.A. Ohajuruka, and D.L. Palmquist. 1991. Ruminal synthesis biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74: 3025-3034.
- Yan, C., P. Wang, J. DeMayo, F.J. DeMayo, J.A. Elvin, C. Carino, S.V. Prasad, S.S. Skinner, B.S. Dunbar, J.L. Dube, A.J. Celeste and M.M. Matzuk. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.* 15:854-866.
- Yu, W.H., A. Walczewska, S. Karanath, and S.M. McCann. 1997. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology.* 138:5055–5058.
- Zachow, R.J. and D.A. Magoffin. 1997. Direct intraovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 β production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138: 847–850.
- Zeron, Y., A. Ocheretny, O. Kedar, A. Borochoy, D. Sklan, and A. Arav. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction.* 121: 447-454.

- Zeron, Y., D. Sklan, and A. Arav. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 271-278.
- Zhang, Y., M. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J.M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425.
- Zhou, J., T.R. Kumar, M.M. Matzuk and C. Bondy. 1997. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol. Endocrinol.* 11: 1924-1933.
- Zieba, D.A., M. Amstalden, and G.L. Williams. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29: 166-185.
- Zornano A and M. Camps. 1977. GLUT4 in insulin resistance. In *Facilitative Glucosa Transporters.* pp137-165. ED.Gw Gould.Springer, New York. Abstract.
- Zurek, E. G.R. Foxcroft and N. Kennelly. 1995. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 78:1909-1920.

CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PROGESTERONA, PICO PRE-OVULATORIO DE LH Y ESTRO EN OVEJAS CON DISTINTO REGIMEN ALIMENTICIO Y PROGRAMA DE SINCRONIZACIÓN DE ESTROS

1.1. Introducción

La secreción de progesterona (P_4) es una señal que regula el comportamiento reproductivo mediante una retroacción negativa en la secreción GnRH y, por consiguiente, a las gonadotropinas secretadas por la pituitaria (Skinner *et al.*, 2000). La imitación de la acción reguladora de la P_4 sobre el eje reproductivo es la base de muchos programas de sincronización. Las esponjas impregnadas con progestágenos como MAP y FGA y algunos otros dispositivos impregnados con P_4 son generalmente utilizados. La liberación de progestágeno por estos dispositivos genera un incremento en las concentraciones en suero 3 días después de su aplicación, pero después tiende a disminuir hasta el momento del retiro del dispositivo (Carlson *et al.*, 1989; Simonetti *et al.*, 2000). En cambio, la secreción del cuerpo lúteo en un ciclo estral natural se realiza con un aumento constante desde su formación, alcanza su máxima secreción en los días ocho o nueve del ciclo (Jablonka *et al.*, 1993; Bartlewski *et al.*, 1999), y luego inicia su declive.

El pre-tratamiento con P_4 es un requisito importante para una completa expresión de la retroacción del estradiol sobre la secreción de GnRH en la oveja (Caraty y Skinner, 1999), aunque la concentración de P_4 , al igual que otras hormonas, está sujeta a factores externos como la nutrición (Kiyama *et al.*, 2004; Daniel *et al.*, 2002), con una relación inversa entre el nivel de nutrición y concentraciones periféricas de P_4 , lo cual puede afectar la subsecuente gestación.

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de dos dietas y de la concentración de progesterona plásmatica sobre el inicio y duración del estro e inicio, presentación, duración, amplitud del pico de LH en un ciclo sincronizado.

1.2. Materiales y métodos

Animales

El experimento se realizó en las instalaciones de la Granja Experimental del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, en época reproductiva en el otoño de 2006. Se usaron 67 hembras Dorset, Suffolk, y cruza de estas razas; las ovejas no estaban gestantes, lo cual se confirmó mediante un examen ecográfico.

Tratamientos

Se formaron dos grupos 17 días antes de insertar las esponjas: 1) testigo (T; n= 34), recibió 1 kg d⁻¹ oveja⁻¹ de concentrado comercial con 90 % MS, 2.40 Mcal EM kg⁻¹ MS y 16 % proteína cruda; 2) grupo (H; n=34) recibió 1 kg d⁻¹ oveja⁻¹ de heno de avena (H) que contenía 90 % MS, 2.0 Mcal EM kg⁻¹ MS y 10 % de proteína cruda. Ambos grupos fueron subdivididos, la mitad de las ovejas de cada grupo fueron pre-sincronizadas (Grupos P) con 15 mg de prostaglandinas (PGF_{2α}), inyectadas 14 y 7 días antes de la aplicación de la esponja con acetato de flurogestona (FGA), para que al momento de insertar la esponja cada borrega tuviera un cuerpo lúteo de aproximadamente 6 días, los grupos no pre-sincronizados (S), recibieron una dosis de 15 mg de PGF_{2α} 10 días después de la aplicación de FGA, para lisar un posible cuerpo lúteo presente, al final los tratamientos fueron: HS (heno de avena sin pre-sincronización), TS (testigo sin pre-sincronización), HP (heno de avena pre-sincronizado) y TP (testigo pre-sincronizado).

La sincronización de estros se realizó con una esponja con 40 mg de FGA durante 12 días. Al inicio del experimento se registró el peso y espesor de grasa dorsal de las ovejas con un ultrasonido (SONOVET, Medison) con un transductor de 7.5 Mhz el cual se colocó entre la 12^{va} y 13^{va} costilla, sobre el ojo del musculo *Longissimus dorsi* (Silvia *et al.*, 2006), realizando otra medición al momento de insertar la esponja.

Inicio y duración de estro

El estro se detectó 24 h después de retirar la esponja, monitoreándose cada 4 h durante 72 h, considerándose que la hembra estaba en estro cuando permitía la monta por parte del macho, registrándose así el inicio y duración de estro.

Muestreo de progesterona (P₄) y hormona luteinizante (LH)

Después de colocar las esponjas se recolectaron muestras de sangre vía yugular cada 48 h durante 14 d, para determinar la concentración de P₄ en suero. Para caracterizar las concentraciones de LH se colectaron muestras de sangre iniciando 24 h después de retirar las esponjas, recolectando muestras cada 4 h durante 3 d. Las muestras se centrifugaron a 1000 gravedades por 15 min y el suero se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Análisis hormonales

Los análisis de P₄ se realizaron mediante ensayo inmunoenzimático (Immunometrics, UK Ltd.). La sensibilidad analítica fue 0.10 ng mL⁻¹ con coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9.4 y 13.2 %. Los análisis de LH se realizaron por RIA de doble anticuerpo (Niswender *et al.*, 1969); la sensibilidad fue 0.78 ng mL⁻¹, con coeficientes de variación intra e inter ensayo de 9.5 y 13.3 %.

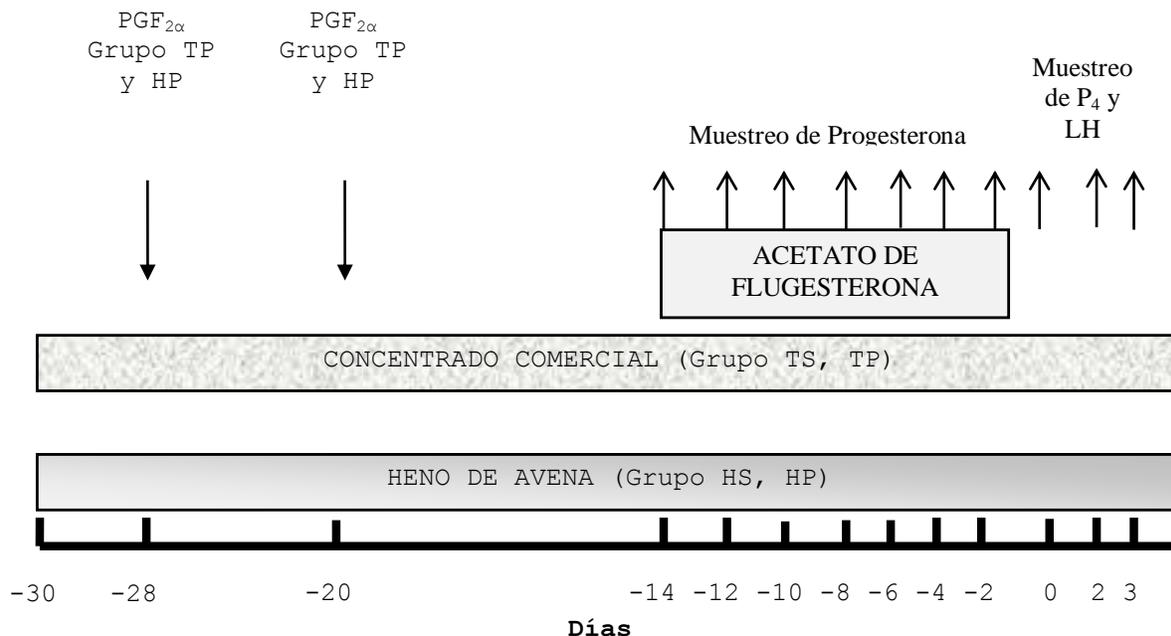


Figura 1. Protocolo experimental para la sincronización de estros

TS (testigo, sin pre-sincronización)
 TP (testigo, pre-sincronizado)
 HS (heno de avena, sin pre-sincronización)
 HP (heno de avena pre-sincronizado)

Variables Analizadas

Presentación de estros. Se determinó tomando en cuenta el porcentaje de hembras que presentaron estro después del retiro de la esponja con FGA, es decir, el número de ovejas tratadas / número de ovejas que mostraron estro multiplicado por 100.

Inicio de estro. Se cuantificaron las horas que transcurrieron desde el retiro de la esponja hasta el inicio de estro.

Duración de estro. Lapso de tiempo (h) entre el inicio de estro y fin del mismo, el cual fue determinado cuando la oveja no aceptó la monta del macho

Inicio del pico preovulatorio de LH. Se obtuvo al medir el tiempo transcurrido desde el retiro del dispositivo hasta que la secreción promedio basal de LH excedió por dos

desviaciones estandar y permanecieron por arriba de estas concentraciones por lo menos 4 horas (Van Cleeff *et al.*, 1998).

Duración del pico preovulatorio. Se consideró el inicio del pico preovulatorio cuando la concentración de LH fue dos desviaciones estándar mayor a la concentración media de manera individual, se mantuvo por lo menos cuatro horas y terminó cuando la concentración de nuevo fue basal (Van Cleeff *et al.*, 1998).

Amplitud del pico preovulatorio de LH. Se obtuvo al restar de manera individual a la máxima concentración de LH la concentración basal, esta última se obtiene al promediar la concentración de LH en los periodos que se encuentran antes y después del pulso preovulatorio de LH (Mattioli *et al.*, 1986).

Tasa de gestación. Número de ovejas gestantes/número de ovejas servidas multiplicadas por 100.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial de 2x2: dieta (heno de avena o concentrado) y programa de sincronización (sin o con pre-sincronización). Las variables de inicio y duración de estro, inicio del pulso preovulatorio, duración del pulso preovulatorio, amplitud del pico preovulatorio y pico de LH, se analizaron mediante un análisis de varianza con el procedimiento GLM (SAS, 1982). La concentración de progesterona se analizó mediante el procedimiento MIXED de SAS para un diseño completamente al azar (Litell *et al.*, 1998).

1.3. Resultados

Peso vivo y grasa dorsal

Para peso vivo y espesor de grasa dorsal al inicio del régimen alimenticio no se observaron diferencias entre grupos: 70 ± 2 kg y 2.3 ± 0.09 mm para el grupo testigo; y para el grupo alimentado con heno de avena fue 68 ± 2 kg y 2.2 ± 0.08 mm. Al momento de la inserción de las esponjas no hubo diferencias ($P > 0.05$) en peso vivo (69 ± 2 y 63 ± 2 kg), para ovejas de los grupos testigo y heno de avena. El espesor de grasa dorsal fue diferente ($P < 0.05$) entre el grupo testigo (2.6 ± 0.10 mm) y el que consumió heno de avena (1.8 ± 0.08 mm).

Inicio de estros

El inicio de estro fue diferente ($P < 0.05$) en el grupo alimentado con heno de avena (H), con un tiempo promedio de 50 ± 1.68 h, comparado con el grupo testigo (T) el cual fue de 43 ± 1.52 h. El grupo no pre-sincronizado (S) registró un tiempo de 47 ± 1.75 h, mientras que en el grupo pre-sincronizado (P) el tiempo promedio fue de 45 ± 1.62 h, ($P > 0.05$). Los grupos HS y HP tuvieron un inicio de estro más tardío ($P < 0.05$), con un tiempo promedio de 50 ± 1.83 y 49 ± 2.88 h, en comparación al grupo TP (40 ± 2 h), y el grupo TS (46 ± 2.1 h), sin diferir ($P > 0.05$) con los grupos anteriores.

Duración de estros

No existieron diferencias ($P > 0.05$) por el tipo de alimentación, siendo para el grupo T de 42 ± 1.62 h y para el grupo H de 37 ± 1.57 h. Sin embargo por el tipo de programa de sincronización hubo diferencias ($P < 0.05$) entre los grupos S y P, con una duración del estro de 36 ± 1.17 y 43 ± 1.80 h, respectivamente. Respecto a la interacción del tipo de alimento y programa de sincronización, la duración de estros fue diferente ($P < 0.05$)

entre grupos TP (45 ± 2.8 h) y HP (34 ± 1.86 h) mientras que los grupos TS y HS no fueron diferentes ($P>0.05$).

Secreción de progesterona

La secreción de progesterona no fue diferente ($P>0.05$) por el tipo de alimento teniendo para el grupo T (Testigo) una concentración promedio durante la fase lútea de 2.59 ± 0.27 ng mL⁻¹, mientras que las ovejas del tratamiento H (solamente heno de avena) tuvieron 2.35 ± 0.28 ng mL⁻¹. El tipo de programa de sincronización afectó ($P<0.05$) la secreción promedio de P₄ durante la fase lútea la cual fue de 1.98 ± 0.27 ng mL⁻¹ para el grupo S (No pre-sincronizado) comparado con 2.96 ± 0.28 ng mL⁻¹ para el grupo P (pre-sincronizado). En la interacción de los efectos anteriores hubo diferencias ($P<0.05$) en los grupos TP y HS, observándose para el primero una concentración promedio de 3.09 ± 0.39 ng mL⁻¹ y para el segundo 1.88 ± 0.39 ng mL⁻¹, mientras que para los grupos TS y HP fue 2.08 ± 0.38 y 2.82 ± 0.40 ng mL⁻¹, sin existir diferencias entre ellos ni con los otros grupos (Figura 2).

Caracterización del pico pre-ovulatorio de hormona luteinizante (LH)

Inicio del pico de LH

El régimen alimenticio influyó en el inicio de la elevación de LH ($P<0.05$), registrándose más rápido en los grupos alimentados con concentrado (T), comparado con el grupo alimentado con heno de avena (H) (Cuadro 1). Respecto al efecto de programa de sincronización, no se observaron diferencias ($P>0.05$) (Cuadro 2). En la interacción de los diferentes efectos sólo existieron diferencias ($P<0.05$) entre los grupos TS y HP (Cuadro 3).



Figura 2. Concentración promedio de progesterona para los diferentes tratamientos durante el periodo experimental.

TS (testigo, sin pre-sincronización)
 TP (testigo, pre-sincronizado)
 HS (heno de avena, sin pre-sincronización)
 HP (heno de avena pre-sincronizado)

Cuadro 1. Inicio de la elevación, presentación, amplitud y duración del pico pre-ovulatorio de LH, en ovejas con diferente régimen alimenticio.

Tratamiento	Variables, h			
	Inicio de la elevación h	Presentación del pico de LH h	Amplitud ng/ml	Duración h
Testigo	55.2 ± 1 ^a	60.2 ± 3 ^a	32.7 ± 3 ^a	4.94 ± 0.34 ^a
Heno de avena	64.5 ± 2 ^b	69.1 ± 2 ^b	30.8 ± 3 ^a	4.62 ± 0.26 ^a

^{a,b} Medias con distinta literal son diferentes (P<0.05).

Presentación del pico de LH

La presentación del pico fue afectada por el tipo de dieta, ocurriendo más tarde en los grupos alimentados con heno de avena (H), en comparación con los alimentados con concentrado (T) (Cuadro 1). El tipo de programa de sincronización no afectó la presentación del pico pre-ovulatorio (Cuadro 2). La interacción de los efectos nutricionales y tipo de programa de sincronización, ocasionó que el grupo TS tuviera una presentación más rápida del pulso preovulatorio de LH, comparada al grupo HP ($P < 0.05$) (Cuadro 3).

Amplitud y duración del pico de LH

Estas dos variables no fueron afectadas ($P > 0.05$) por el tipo de dieta, el programa de sincronización de estro ni la interacción entre estos efectos, lo cual coincide con lo reportado por Quirke *et al.* (1981) para duración del pico preovulatorio, mientras que la amplitud del mismo es similar a lo reportado por Batista *et al.* (1998).

Cuadro 2. Inicio, presentación, amplitud y duración del pico pre-ovulatorio de LH, en ovejas con o sin pre-sincronización de estro

Tratamiento	Variables			
	Inicio h	Presentación del pico de LH h	Amplitud ng/ml	Duración h
Sin PGF _{2α}	58.0 ± 2 ^a	62.9 ± 2 ^a	33.4 ± 4 ^a	4.45 ± 0.22 ^a
Con PGF _{2α}	61.6 ± 2 ^a	66.3 ± 2 ^a	29.9 ± 2 ^a	5.16 ± 0.38 ^a

^{a,b} Medias con distinta literal entre ellas son diferentes ($P < 0.05$).

1.4. Discusión

La disminución de peso y grosor de grasa dorsal, observado en el presente trabajo para el grupo que solo se le ofreció heno de avena, es de considerarse un efecto causado por la disminución de nutrientes ofrecidos hacia la oveja, lo cual ha sido observado en animales a los cuales se les ha restringido el acceso o bien limitado la cantidad de alimento (Rhind y McNeilly, 1998; Lozano *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Inicio, presentación, amplitud y duración del pico pre-ovulatorio de LH, debido a la interacción del régimen alimenticio y programa de sincronización de estro

Tratamiento	Variables			
	Inicio h	Presentación del pico LH h	Amplitud ng/ml	Duración H
Grupo TS	52.0 ± 2 ^a	58.0 ± 2 ^a	39.2 ± 6 ^a	4.4 ± 0.3 ^a
Grupo TP	58.0 ± 2 ^{ab}	62.0 ± 2 ^{ab}	25.4 ± 3 ^a	5.5 ± 0.6 ^a
Grupo HS	63.5 ± 3 ^{ab}	68.0 ± 3 ^{ab}	27.0 ± 5 ^a	4.4 ± 0.3 ^a
Grupo HP	65.0 ± 3 ^b	70.0 ± 3 ^b	34.0 ± 4 ^a	4.8 ± 0.4 ^a

^{a,b} Medias con distinta literal entre ellas son diferentes (P<0.05).

TS = grupo alimentado con concentrado sin pre-sincronizar;
TP = grupo alimentado con concentrado y presincronizado;
HS = grupo alimentado con heno de avena sin pre-sincronizar;
HP = grupo alimentado con heno de avena y presincronización.

Para que se presente el estro se requiere que las concentraciones de P₄ disminuyan y de forma conjunta exista un aumento en las de estradiol, sin embargo se ha observado que un bajo nivel de energía y proteína tiene un efecto negativo sobre este (Schillo, 1992; Bronson, 1998). Por su parte Renquist *et al.* (2008) observaron que la restricción de nutrientes en ovejas ovariectomizadas en época reproductiva suprimía las frecuencias del pulso de LH, y con ello la secreción de GnRH, el cual su secreción juega un papel importante en el comportamiento de estro (Caraty y Delaleux, 2001), sugiriéndose que en el presente trabajo la comunicación de estradiol hacia el centro

generador de GnRH se haya alterado como efecto de la falta de nutrientes en ovejas a las cuales se les suministró solamente heno de avena.

En las condiciones experimentales descritas existieron diferencias entre los grupos pre-sincronizados, en los que se indujo un cuerpo lúteo de aproximadamente 6 días al momento de la inserción de la esponja, que provocaría un aumento en las concentraciones de P_4 .

Se ha reportado la importancia de tener una concentración de P_4 mayor a 2 ng mL^{-1} y una duración semejante a la presente en la fase lútea de un ciclo estral natural de la oveja, lo cual tendría efectos benéficos en la retroacción positiva del estradiol y subsecuente secreción de GnRH y LH, logrando con ello una mejor manifestación de estro, como consecuencia de una mayor secreción de GnRH (Caraty y Skinner, 1999, Skinner *et al.*, 2000).

En el presente experimento la dieta no tuvo efecto en la concentración de P_4 , lo cual contrasta con lo reportado por O'Callaghan *et al.* (2000); Kiyama *et al.* (2004) y Daniel *et al.* (2002), los primeros autores lo realizaron durante un periodo de 60 días, mientras los segundos fue en periodos cortos 24 a 48 horas y mencionan que un ayuno o disminución de alimento afecta las concentraciones séricas de P_4 , siendo menor en los animales alimentados con una dieta de mantenimiento, mientras que en animales subnutridos la concentración de P_4 es mayor. Los resultados obtenidos en el presente experimento contrastan con lo anterior, posiblemente debido al tipo alimento consumido, teniendo como consecuencia que la cantidad de energía o la reducción de proteína no fue suficientemente drástica para aumentar la concentración periférica de P_4 .

No obstante el tipo de programa de sincronización afectó la secreción de P_4 ya que al momento de insertar las esponjas en ovejas pre-sincronizadas con $PGF_{2\alpha}$ existía la presencia de un cuerpo lúteo (CL) funcional de aproximadamente 6 días, que es el periodo donde inicia a incrementar la producción del P_4 por parte del CL (Jablonka *et al.*, 1993) considerándose la causa principal en la diferencia de concentraciones de P_4 en plasma.

Posiblemente el inicio más temprano de la elevación de LH, se debe a un rápido aumento en la secreción de estradiol, el cual desencadena el pico pre-ovulatorio de LH (Burke *et al.*, 1996); estas concentraciones pudieron aumentar debido a un rápido desarrollo de folículos con capacidad estrogénica, y por consiguiente con una mayor concentración de estradiol (Schrick *et al.*, 1993).

Sin embargo Rhind y McNeilly (1998), en ovejas que consumieron el doble (D) de los requerimientos nutricionales o la mitad de los requerimientos (M), encontraron: 1) una mayor cantidad de folículos de 1-2.5 mm; 2) no hubo diferencias en el número de folículos antrales, ni en su diámetro; 3) una alta tasa de síntesis de estrógenos y testosterona en ovejas del grupo M comparadas con las ovejas del grupo D, 4) pero la relación entre estradiol y testosterona fue menor en folículos de ovejas M, sugiriendo que sus folículos pudieron tener un aumento en la síntesis de andrógenos (testosterona), y una pequeña conversión de pregnenolona a estradiol debido a una disminución en la actividad de la aromatasa en los folículos de ovejas del grupo M.

1.5. Conclusiones

En el presente estudio se observó que el inicio de la presentación de estro fue sensible a la disminución en la cantidad de nutrientes otorgados vía alimentación, en el caso específico de la alimentación con solo heno de avena retrasó el inicio de la presentación del estro e influyó en el inicio de la elevación de LH, retardando la elevación en este grupo, mientras la presencia de un cuerpo lúteo funcional de 6 días fue capaz de aumentar las concentraciones de P_4 independientemente del tipo de alimento suministrado a las ovejas, y teniendo como consecuencia una mayor duración de estro en grupos que tuvieron este régimen de sincronización. No se observó alteración alguna en la amplitud o duración del pico pre-ovulatorio por efecto de dieta o la presencia de un cuerpo luteo funcional de 6 días.

1.6. Literatura citada

- Bartlewski, P.M., A.P. Beard, and N.C. Rawlings. 1999. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52: 115-130.
- Batista, A.M., F. González V., and A. Gracia M. 1998. Follicular quality and hormonal relationships (LH and progesterone) during the follicular phase of the oestrous cycle in the Canarian ewe. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 325-330.
- Burke, C. R., K.L. Macmillan, and M.P. Boland. 1996. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomized cows. *Anim. Reprod. Sci.* 45:13-28.
- Bronson, F.H.1998. Energy balance and ovulation: small cages versus natural habitats. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 127-137.
- Caraty A., and D.C. Skinner. 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 140: 165-170.
- Caraty, A., and B. Delaleux. 2001. The neuronal control of ovulation in the ewe: Dynamics of steroid regulation of GnRH secretion during the oestrus cycle. *Memoria. II curso Internacional. Fisiología de la reproducción en rumiantes. Colegio de Postgraduados.Montecillo, Texcoco, Edo. De Mexico del 18 a 21 de septiembre. Pag 137-154.*
- Carlson, K. M., H.A. Pohl, J.M. Marcek, R.K. Muser, and J.E. Wheaton. 1989. Evaluation of progesterone controlled internal drug release dispenser for synchronization of estrus in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 18: 205-218.
- Daniel, A. J., B.K. Whitlock, J.A. Baker, B. Steele, C.D. Morrison, D.H. Keisler, and J.L. Sartin. 2002. Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes. *J. Anim. Sci.* 80: 1083-1089.
- Fabre, N.C., and G.B. Martin. 1991. Roles of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and the preovulatory LH surge in the ewe. *J. Endocrinol.* 130 (3): 367-379.

- Jablonka, A., A.T. Grazul-Bilska, D.A. Redmer, and L.P. Reynolds. 1993. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 133: 1871-1879.
- Kiyama, Z., B.M. Alexander, E.A. Van Kirk, W.J. Murdoch, D.M. Hallford, and G.E. Moss. 2004. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *J. Anim. Sci.* 82: 2548-2557.
- Litell, R.C., P.R. Henry, and C.B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-1231.
- Mattioli, M., F. Conte, G. Giovanna, and E. Seren. 1986. Effect of naloxone on plasma concentration of prolactin and LH in lactating sows. *J. Reprod. Fert.* 76: 167-173.
- Niswender, G.D., L.E. Jr. Reichert, A.R. Jr. Midgley, and A.V. Nalbandov, 1969. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology* 84: 1166-1173.
- O'Callaghan D., H. Yaakub, P. Hyttel, L.J. Spicer and M.P. Boland. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fert.* 118: 303-313.
- Quirke, J.F., J.P. Hanrahan, and P.J. Gosling. 1981. Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. *J. Reprod. Fert.* 61: 265-272.
- Renquist, B. J., C.C. Calvert, B.M. Adams, T.E. Adams. 2008. Circulating estradiol suppress luteinizing hormone pulse frequency during dietary restriction. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34: 301-310.
- Rhind, S.M., and A.S. McNeilly. 1998. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 131-138.
- SAS, 1982. SAS. User's Guide: Statistics (Version 5 Ed.). Cary, N.C. U.S.A. Inst. Inc. 584 p.
- Shillo, K.K. 1992. Effect of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1271-1282.
- Schrick, N.F., 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.
- Silva, S.R., J.J. Afonso, V.A. Santos, A. Monteiro, C.M. Guedes, J.M.T. Azevedo, and A. Dias-da-Silva. 2006. *In vivo* estimation of sheep carcass composition using real-time ultrasound with two probes of 5 and 7.5 Mhz and image analysis. *J. Anim. Sci.* 84: 3433-3439.

- Simonetti, L., M.R. Blanco, J.C. Gardon. 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small Rum. Res.* 38: 243-247.
- Skinner D.C., T.G. Harris, and N.P. Evans. 2000. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol Reprod.* 63: 1135-1142.
- Van Cleeff, J., F.J. Karsch, and V. Padmanabhan. 1998. Characterization of endocrine events during the peri-estrous period in sheep after estrous synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15: 23-34.
- Viñoles, C., A. Meike, M. Forsberg, and E. Rubianes. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51 (7):1351-1361.

CAPITULO II. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN MAS LA ADICIÓN DE GRASA DE SOBREPASO EN EL CORTO PLAZO SOBRE LA TASA OVULATORIA Y CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA E INSULINA.

2.1. Introducción

La nutrición ha mostrado tener influencia en la producción de hormonas, calidad de los oocitos, fertilización, desarrollo embrionario así como en la actividad reproductiva (Boland *et al.*, 2001; Armstrong *et al.*, 2003; Boland y Lonergan, 2005). En condiciones desfavorables de alimentación la actividad reproductiva cesa, lo cual puede representar una respuesta para manejar de forma eficiente las demandas nutricionales de producción y cría, esto puede representar algunas estrategias fisiológicas desarrolladas a ambientes extremos, resultando clave para la supervivencia de la especie, debiéndose tener en cuenta la fisiología reproductiva del animal como el depósito y movilización de reservas corporales como parte integrante de la reproducción (Martin y Banchemo, 1999).

Existe poca información sobre la descripción de la condición corporal de los animales utilizados en los experimentos donde se evalúa el efecto de la nutrición sobre la tasa ovulatoria y los que han encontrado una asociación positiva usaron animales en condición corporal moderada más que baja (Parr, 1992; Viñoles *et al.*, 2007). El presente experimento tuvo como objetivo observar el cambio de peso vivo y grasa dorsal como un indicador del estado nutricional en las hembras y el efecto de adicionar grasa de sobrepaso en la tasa ovulatoria así como en la concentración sérica de progesterona e insulina durante el programa de superovulación y así como el porcentaje de ovejas que quedaron gestantes.

2.2. Materiales y métodos

El trabajo se realizó en la granja experimental del Colegio de Posgraduados, localizada en Montecillo, estado de México durante la época reproductiva. Treinta días antes del programa de superovulación, se seleccionaron doce ovejas de la raza Dorset las cuales fueron utilizadas como donadoras de embriones, mantenidas en corrales comunales con libre acceso al agua. Después de 5 días de adaptación a los corrales y a sus dietas, los animales se distribuyeron de forma aleatoria a uno de dos grupos. El tratamiento Testigo (T; n=6) alimentado con un kilogramo de concentrado durante toda la fase experimental, el cual contenía 90% de materia seca (MS), 2.40 Mcal de energía metabolizable kg^{-1} MS y 16% proteína cruda, el cual recibieron por un periodo de 34 días. El grupo con previa desnutrición (PD; n=6) fue alimentado con un kilogramo de heno de avena que contenía 90 % de materia seca, 2.0 Mcal de energía metabolizable kg^{-1} y 10 % de proteína cruda, por el mismo periodo que el tratamiento T (34 días), con el propósito de producir una deficiencia nutricional antes de ser sometidas a un programa de sincronización y superovulación (Figura 3). Ambos grupos al inicio del programa de sincronización y superovulación recibieron el mismo concentrado con el cual se alimentó al grupo T, más la adición de 100 gramos de grasa de sobrepeso durante siete días.

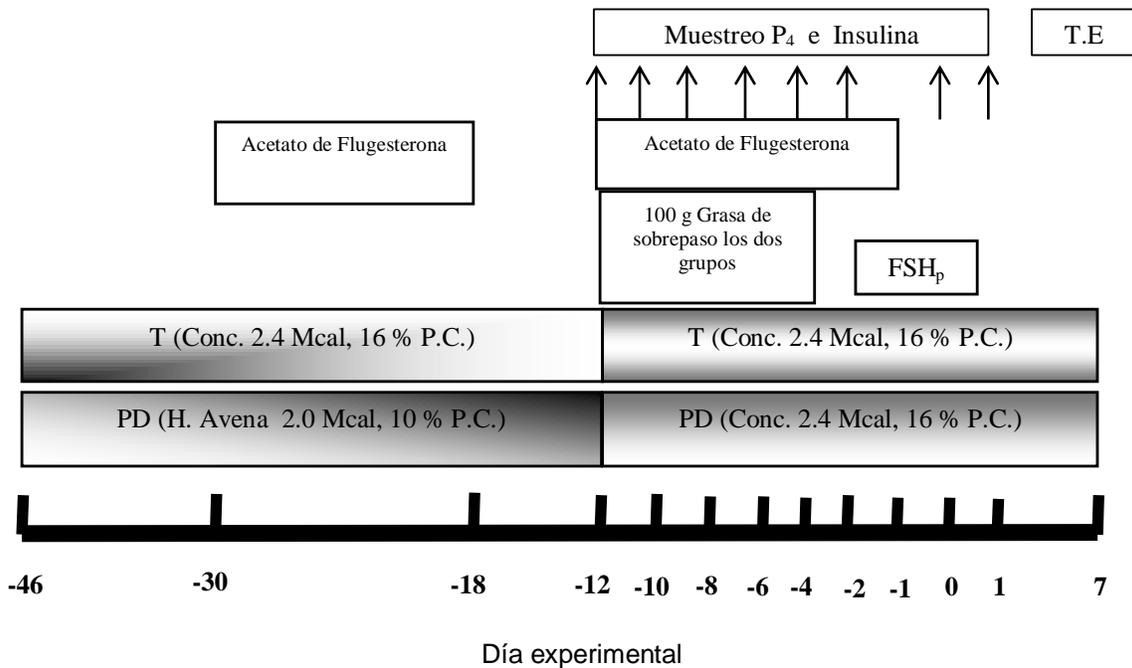


Figura 3. Protocolo experimental para el programa de superovulación y transferencia de embriones

T= (Concentrado comercial 2.4 Mcal, 16% P.C.)

PD= Previa desnutrición (Heno de Avena, 2.0 Mcal, 10 % P.C.)

↑= Recolección de muestras de sangre para Progesterona e Insulina.

T.E.= Recolección, evaluación y transferencia de embriones.

De manera paralela 35 ovejas fueron usadas como receptoras de embriones y alimentadas con dietas a base de un kilogramo de concentrado más un kilogramo de heno de avena, las cuales fueron mantenidas en corrales comunales con libre acceso a agua durante el experimento. Al inicio del experimento a las ovejas donadoras se les registró el peso y el espesor de grasa dorsal utilizando un equipo de ultrasonido de la marca SONOVET Medison con un transductor de 7.5 Mhz el cual se colocó en la 12^{va} y 13^{va} costilla, sobre el ojo del musculo *Longissimus dorsi* (Silva *et al.*, 2006), realizándose las dos mediciones después de insertar la esponja y cinco días después de su retiro. Las ovejas donadoras se pre-sincronizaron con esponjas impregnadas con 40 mg de acetato de flugesterona (Chronogest[®]; Intervet, France) por un periodo de 12 días,

diecisiete días antes de iniciar el programa de superovulación con la finalidad de que todas las ovejas estuvieran en la misma etapa fisiológica, cinco días después del estro se inició el programa de sincronización, superovulación y transferencia embrionaria, realizándose la sincronización de igual forma que la pre-sincronización. Las ovejas donadoras se superovularon con 200 mg NIH-FSH-equivalente (Folltropin-V[®], Vetrepharm Inc., Ontario), repartiéndose en ocho inyecciones en dosis decrecientes por vía intramuscular (40, 30; 30, 30; 30, 20; 10, 10 mg), iniciando 48 horas antes del retiro de la esponja y finalizando 24 horas después de retirada la misma. Los sementales fueron introducidos 24 horas después del retiro de la esponja para la detección de la presentación de estro a intervalos de 8 horas y al detectarse se permitió la monta del macho, repitiéndola 12 horas después del mismo. En ovejas receptoras el retiro de la esponja fue adelantado por 12 horas en relación a las ovejas donadoras y al momento del retiro de esponjas recibieron una inyección de 300 u.i de gonadotropina corionica equina (eCG; Folligon[®], Intervet, Boxmeer).

Para determinar la concentración de progesterona e insulina se colectaron muestras de sangre cada 48 horas en ovejas donadoras por venopunción yugular iniciando el día que se colocaron las esponjas de FGA hasta el fin del experimento. El día 5 después del retiro de la esponja, a las ovejas donadoras se les retiró la comida, el día 6 para que el día 7, las ovejas donadoras fueran rasuradas, lavadas y desinfectadas en la región abdominal para posteriormente ser tranquilizadas con xilacina al 2% (0.2 mg kg^{-1} de peso vivo) por vía i.m., y como anestésico se utilizó ketamina (2 mg kg^{-1} de peso vivo) por vía endovenosa, después se realizó una incisión de aproximadamente 5 cm de largo y 3 cm anterior a la ubre sobre la línea media. Se exteriorizaron los ovarios para

evaluar la respuesta a la superovulación y una vez realizado el conteo de cuerpos lúteos se introdujeron a la cavidad para posteriormente exteriorizar el útero. Se lavó cada cuerno uterino utilizando una sonda de Foley (calibre 10G), que se introdujo aproximadamente a 1 cm de la unión uterotubárica mediante una punción realizada con un catéter endovenoso (14Gx5½) para recuperar el medio de lavado. Posteriormente, a través de otro catéter endovenoso (18Gx¼) insertado en la punta del cuerno uterino, se administraron 60 ml de solución Dulbecco modificada a la que se le agregó 0.4 % de albúmina sérica bovina y penicilina G sódica (100 UI/ml). El medio se colectó en un filtro concentrador; concluida la recolección de embriones, se colocaron puntos de sutura en las incisiones hechas al útero, se regresó éste a la cavidad abdominal y se suturó la incisión realizada plano por plano. La viabilidad de los embriones fue evaluada por criterio morfológico (Overström, 1996; Gonzalez *et al.*, 2002).

Las variables estudiadas fueron: número de cuerpos lúteos, oocitos o embriones recuperados y embriones viables. El porcentaje de recuperación fue obtenido al dividir, el número total de ovocitos o embriones recuperados entre el número total de cuerpos lúteos (x100). El porcentaje de ovocitos no fertilizados fue obtenido al dividir el número de ovocitos entre el número total de ovocitos y embriones recuperados (x100). El porcentaje de embriones recuperados se obtuvo de dividir el número de embriones y ovocitos entre el número de embriones (x100). Una vez seleccionados los embriones se procedió a transferirlos a hembras que se tranquilizaron con xilacina al 2% (0.2 mg kg⁻¹ de peso vivo) por vía i.m., y como anestésico se utilizó ketamina (2 mg kg⁻¹ de peso vivo) por vía endovenosa, realizando dos incisiones en la pared abdominal a aproximadamente 4 cm de la línea media y 3 cm anteriores a la ubre, insertándose un

trocar con cánula por donde se introdujo el filamento óptico. Antes de insertar el trocar se insufló la cavidad con aire a través de una aguja de Verres. Se localizó el ovario con el cuerpo lúteo más desarrollado, y por la segunda cánula se introdujeron unas pinzas de Babcock con las que se retrajo y exteriorizó el cuerno ipsilateral a dicho cuerpo lúteo. En el cuerno uterino seleccionado se hizo una pequeña punción con un catéter endovenoso (18Gx¼) y se transfirieron los embriones (n= 2 por oveja) por medio de catéter (Tom Cat, USA); finalmente se regresó el cuerno a la cavidad abdominal y se suturaron las incisiones.

Los análisis de P₄ se realizaron mediante ensayo inmunoenzimático de (Immunometrics, UK Ltd., 280 Muster Road, London SW6 6BQ). La sensibilidad analítica fue de 0.10 ng ml⁻¹ con coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9.4 y 13.2% respectivamente. Los análisis de insulina se realizaron mediante RIA de doble anticuerpo en fase líquida, con una sensibilidad de 0.083 ng ml⁻¹ con coeficiente de variación intra e inter ensayo de 5.6 y 12.7 %, respectivamente. Ambos análisis se realizaron en el laboratorio de Biología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, los resultados de las hembras que presentaron estro y quedaron gestantes, se analizaron con una prueba de χ^2 por medio del PROC FREQ de SAS. Para el inicio de estro se realizó un análisis de varianza con el PROC GLM (SAS, 1982). Para las mediciones de peso vivo, grasa dorsal, concentración de P₄ e INS se utilizó el procedimiento PROC MIXED (Littell *et al.*, 1998), el modelo incluyó efectos fijos del tratamiento, día y su interacción. La

estructura de covarianza fue modelada de acuerdo a lo mencionado por Littell *et al.* (2000).

2.3. Resultados

Peso vivo y grasa dorsal

En las mediciones realizadas en diferentes puntos del experimento no se observaron diferencias entre grupos (T vs PD) para peso vivo (Figura 4), mientras para espesor de grasa dorsal fue diferente ($P < 0.05$) al momento de iniciar el programa de transferencia embrionaria (Figura 5). Se observó que el peso vivo disminuyó para el grupo PD tres días después de finalizado el programa superovulatorio con respecto al inicio de la administración de las dietas, no así para el espesor de grasa dorsal el cual fue mayor para ambos grupos al final del tratamiento superovulatorio.

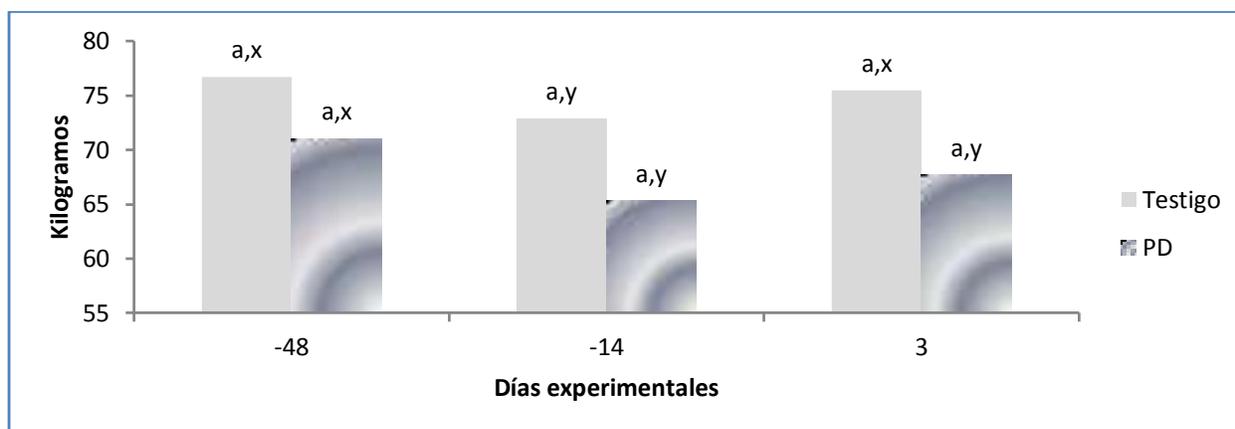


Figura 4. Peso vivo para los diferentes tratamientos al inicio de la dieta, día de la inserción y retiro de la esponja

^{a,b} Diferente literal entre columnas existen diferencias ($P < 0.05$) entre grupos.

^{x,y} Diferente literal entre días existen diferencias ($P < 0.05$) entre el mismo grupo.

Testigo. Grupo alimentado con concentrado comercial (2.4 Mcal kg^{-1} 16% PC) durante 34 días.

PD. Grupo con una previa desnutrición, alimentado con heno de avena (2.0 Mcal kg^{-1} , 10 % PC) durante 34 días.

Presentación e Inicio de estro

No se observaron diferencias entre grupos, registrándose para el grupo T un 100% contra 83.3 % de presentación de estro para el grupo PD. Para inicio de estro no existieron diferencias ($P>0.05$) entre grupos presentándose para ambos grupos a las 36.66 h después de retirada la esponja.

Progesterona

La concentración de progesterona fue mayor ($P<0.05$) en ovejas del grupo T en comparación al grupo PD durante la mayor parte del tratamiento con FGA (Figura 6). Se observan diferencias entre grupos en el día -12 de la fase lútea siendo mayor para el grupo T, hasta el día -6, no observándose diferencias ($P>0.05$) a partir del día -4.

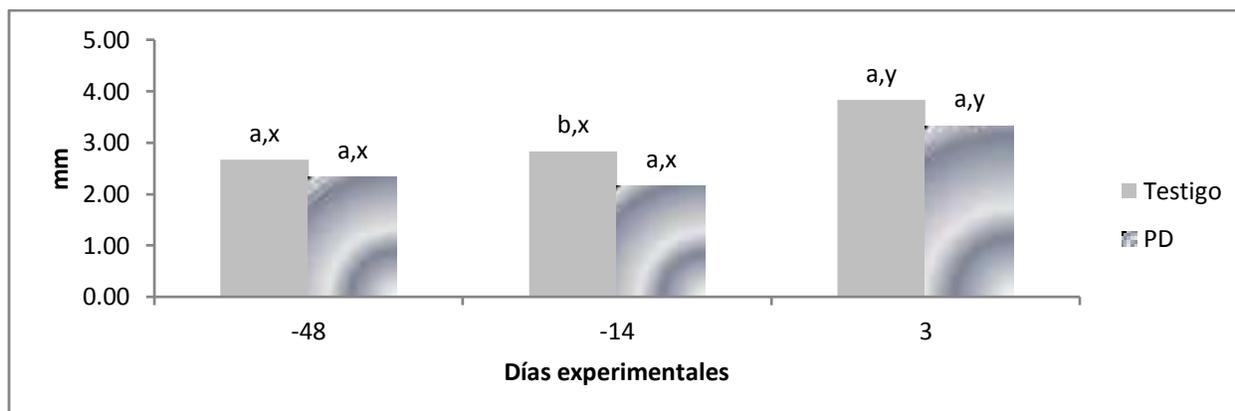


Figura 5. Medición de grasa dorsal para los diferentes tratamientos al inicio de la dieta, día de la inserción y retiro de la esponja

^{a,b} Diferente literal entre columnas existen diferencias ($P<0.05$) entre grupos.

^{x,y} Diferente literal entre días existen diferencias ($P<0.05$) en el mismo grupo.

Testigo. Grupo alimentado con concentrado comercial (2.4 Mcal kg^{-1} 16% PC) durante 34 días.

PD. Grupo con una previa desnutrición, alimentado con heno de avena (2.0 Mcal kg^{-1} , 10 % PC) durante 34 días.

Insulina

Las concentraciones promedio de insulina fueron superiores ($P < 0.05$) durante la fase lútea para el grupo PD (previa desnutrición), con respecto a la observada en el grupo T (grupo alimentado siempre con concentrado), pero solo existieron diferencias significativas en los días -10, -4 y -2 del experimento tomando en cuenta que el día 0 es el día de la presentación del estro (Figura 7).

Respuesta al tratamiento superovulatorio y estructuras recuperadas

La respuesta al tratamiento superovulatorio para el grupo T fue de 100% (6/6), mientras para el grupo PD fue de 66.6 % (4/6), no existiendo diferencias entre grupos. La cantidad promedio de cuerpos lúteos para el grupo T fue de 9.5 ± 0.85 , mientras para el grupo PD fue de 14.75 ± 2.36 , existiendo diferencias entre grupos ($P < 0.05$).

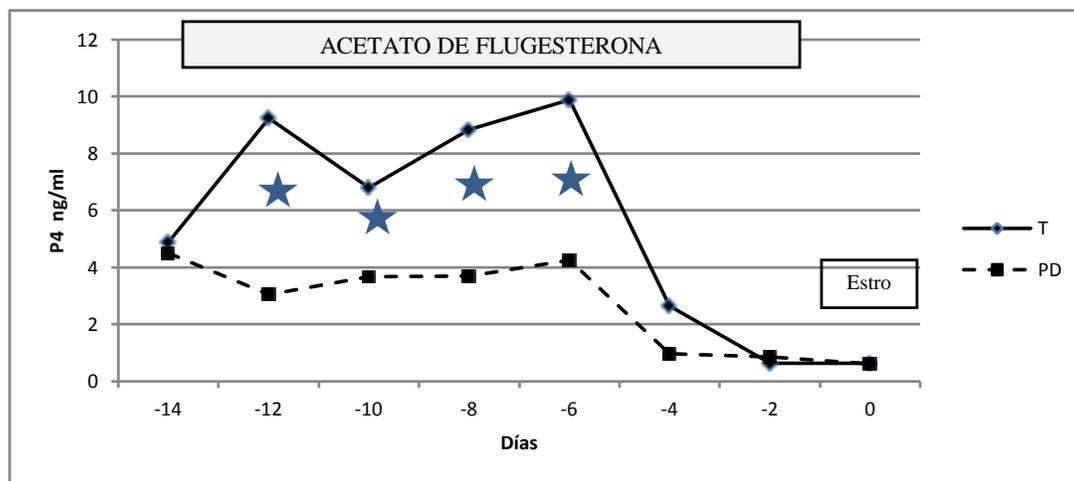


Figura 6. Concentración promedio de progesterona para los diferentes grupos de ovejas donadoras durante el programa de superovulación

Testigo. Grupo alimentado con concentrado (2.4 Mcal Kg^{-1} , 16 % PC) durante 34 días.

PD. Grupo con una previa desnutrición, alimentado con heno de avena (2.0 Mcal kg^{-1} , 10 % PC) durante 34 días.

★ = Diferencias estadísticas entre grupos

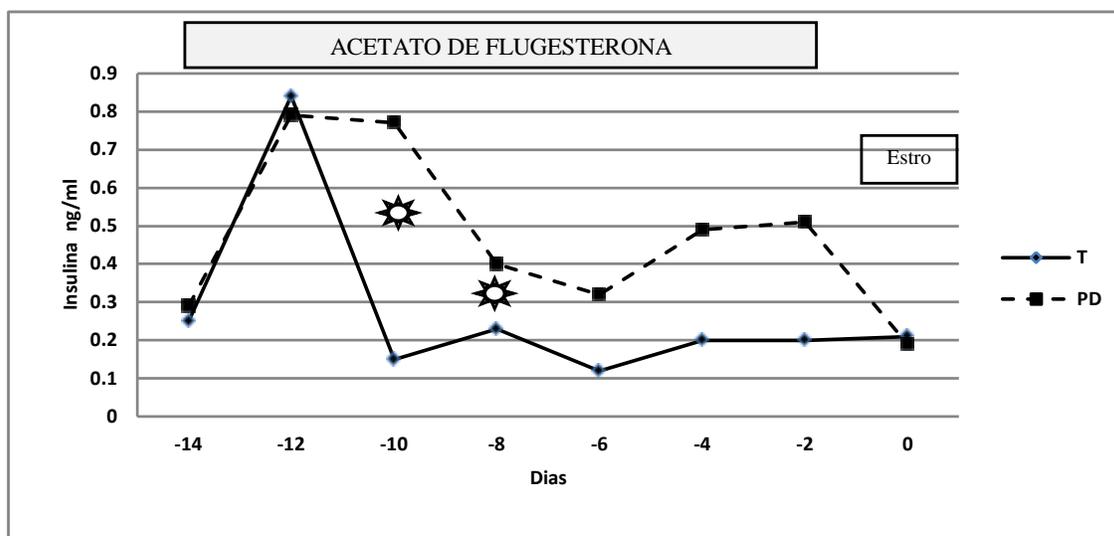


Figura 7. Concentración promedio de insulina para los diferentes grupos de ovejas donadoras durante el programa de superovulación

Testigo. Grupo alimentado con concentrado (2.4 Mcal Kg^{-1} , 16 % PC) durante 34 días.

PD. Grupo con una previa desnutrición, alimentado con heno de avena (2.0 Mcal kg^{-1} , 10 % PC) durante 34 días.

★=Diferencias estadística entre grupos

El porcentaje de recuperación de estructuras (embriones y ovocitos) fue de 75.4 % para el grupo T, mientras para el grupo con PD fue de 76 %, no existiendo diferencias ($P > 0.05$). El porcentaje de ovocitos recuperados fue menor para el grupo T ($P < 0.05$) en comparación al grupo PD registrándose el 0.07 y 28.8 %, respectivamente. El porcentaje de embriones recuperados para el grupo T fue de 93 % existiendo diferencias ($P < 0.05$) con respecto al grupo PD con 71 %. El porcentaje de mórulas tempranas o compactas, blastocitos tempranos o maduros, no existieron diferencias significativas entre grupos, los resultados se muestran en detalle en el Cuadro 4.

Porcentaje de gestación de hembras a las que se les transfirieron embriones

En lo que respecta al porcentaje de gestación no existieron diferencias entre grupos ($P > 0.05$), observándose 35 y 31.5 % para los grupos T y PD, respectivamente.

Cuadro 4. Tasa de ovulación (cuerpos lúteos), número de embriones recuperados y clasificación en ovejas superovuladas alimentadas de forma normal o con previa desnutrición.

	Testigo	PD
Ovejas Tratadas	6	6
Ovejas que Respondieron	6	4
Cuerpos Lúteos	57	59
Estructuras Recuperadas	43	45
Ovocitos	3 (0.07 %) ^a	13 (28.8 %) ^b
Embriones Transferibles	40	32
Mórulas Tempranas	19 (47 %) ^a	9 (28 %) ^a
Mórulas Compactas	11(27 %) ^a	15(46 %) ^a
Blastocito Temprano	7 (17 %) ^a	6 (18 %) ^a
Blastocito Tardío	3 (0.07 %) ^a	2 (0.06 %) ^a

^aDiferente literal entre columnas existen diferencias (P<0.05) entre grupos.

Testigo. Grupo alimentado con concentrado (2.4 Mcal Kg⁻¹, 16 % PC) durante 34 días.

PD. Grupo con una previa desnutrición, alimentado con heno de avena (2.0 Mcal kg⁻¹, 10 % PC) durante 34 días.

2.4. Discusión

Los resultados observados para peso vivo fueron de acuerdo a lo que se esperaba, sin embargo el grupo alimentado con concentrado tuvo un ligero descenso en su peso vivo, lo cual puede ser atribuido al manejo realizado durante la fase experimental. El grupo con previa desnutrición (PD) disminuyó su peso con respecto al peso inicial, a consecuencia de la deficiencia de energía y proteína ofrecida en la dieta de heno de avena, sin embargo a pesar de restaurarse la alimentación a concentrado comercial el peso vivo no aumentó de forma significativa, posiblemente debido al poco tiempo en el que se le ofreció el concentrado. En lo que respecta a la medición del espesor de grasa dorsal la deficiencia de nutrientes tuvo un impacto en esta variable, disminuyéndola para el grupo PD, y manteniéndose para el caso del grupo T, lo cual refleja el estado nutricional en el que se encuentra la oveja (Daniel *et al.*, 2002), sin embargo la adición

de grasa de sobrepaso aumentó el espesor de grasa en ambos grupos. Arana *et al.* (2006), han reportado que con la adición de grasa de sobrepaso a base de aceite de olivo, se observó un incremento en los depósitos internos de grasa renal en corderos alimentados durante 35 días, pero no afectó los depósitos de grasa subcutánea y espesor de grasa dorsal, sugiriéndose como posible causa la edad de los corderos que estaban en crecimiento.

La previa desnutrición impactó en la presentación del estro en respuesta al tratamiento superovulatorio observándose que una oveja no presentó estro, lo cual puede haberse debido al tipo de alimento que recibió durante treinta y cuatro días. Lozano *et al.* (2003), han reportado que una alimentación *ad-libitum* es perjudicial para la correcta presentación de estro, observando en su estudio un 64 % de presentación de estro, lo cual es bajo comparando al grupo subalimentado con 50 y el 100% de los requerimientos de mantenimiento, teniendo una presentación de 86 y 82 % de ovejas en estro, respectivamente, lo cual contrasta con nuestro estudio, sin embargo se sabe que situaciones extremas en la nutrición pueden afectar de manera negativa la función reproductiva (Dunn y Moss, 1992).

Para el inicio del estro no existieron diferencias entre grupos, presentándose 36 horas después del retiro de las esponjas, lo cual coincide con lo reportado por Lozano *et al.* (2003) y Cordeiro *et al.* (2003), quienes reportaron un inicio aproximado de 36 horas después del retiro de las esponjas. En el presente experimento no se observó un retraso en el inicio de estro como efecto de la adición de grasa, lo cual fue observado por Hawkins *et al.* (1995) quienes reportan un retraso en el inicio de estro, debido a la

alimentación de grasa de sobrepeso retirada cuatro días antes del fin del tratamiento progestacional.

La secreción de progesterona observada para el grupo T fue mayor al grupo PD, contrastando con lo reportado en la literatura donde la secreción de progesterona es afectada por el nivel de consumo de alimento, teniendo como consecuencia que un periodo de sub-alimentación, aumente las concentraciones de P_4 en suero, mientras que un régimen alimenticio alto en energía tendrá concentraciones menores en el torrente sanguíneo periférico (Abecia *et al.*, 1997), lo cual contrasta con lo observado en el presente experimento, por su parte O'Callaghan *et al.* (2000), mencionan que las diferencias no son debidas a una menor secreción de P_4 por parte del cuerpo lúteo, sino a una disminución en el tamaño de órganos vitales lo cual influye en el catabolismo de P_4 .

En el presente experimento no se observó una reducción considerable en el peso vivo y espesor de grasa dorsal lo cual posiblemente no fue suficiente para disminuir el tamaño de órganos vitales como el hígado y que éstos pudieran influir en el metabolismo de P_4 . Además en comparación con otros estudios (Abecia *et al.*, 1997; Lozano *et al.*, 2003), al grupo con previa desnutrición (PD), no se le suministró el mismo tipo de alimento, disminuyendo la cantidad de energía y proteína cruda debido a la disponibilidad de éstas en el heno de avena en comparación al concentrado comercial, no obstante al momento del programa de sincronización y superovulación ambos grupos recibieron el mismo alimento más grasa de sobrepeso sin influir en las concentraciones de P_4 , lo cual contrasta con lo observado por Espinoza *et al.* (1997) y Burke *et al.* (1996) quienes mencionan que una alta cantidad de grasa puede influir en

las concentraciones de P_4 debido a que las grasas son precursoras de colesterol y este a su vez es la base para la síntesis de P_4 .

Las concentraciones de insulina fueron mayores en el grupo que se alimentó previamente con heno de avena, y posteriormente se cambió el régimen alimenticio (flushing), en comparación al grupo alimentado de forma constante con concentrado comercial antes y durante el programa superovulatorio. Se ha observado que la diferencia en condición corporal influye en las concentraciones de insulina, siendo mayores en los animales que presentan una mayor condición corporal, en comparación a los de una menor, como consecuencia de un periodo previo de subnutrición (Caldeira *et al.*, 2007). Por otra parte la adición de grasa de sobrepeso tiene un efecto negativo en las concentraciones de insulina, sugiriéndose que a una mayor cantidad de grasa de sobrepeso, una menor concentración de insulina (Espinoza *et al.*, 1997; Espinoza *et al.*, 2008). La insulina es importante debido a que tiene un efecto permisivo en la tasa ovulatoria, por medio de un aumento en la cantidad de receptores a glucosa en las estructuras ováricas (Downing *et al.*, 1995). En el presente experimento la mayor concentración de insulina se observó en los animales que recibieron heno de avena, lo cual coincide con lo reportado por Recabarren *et al.* (2005), quienes reportaron mayores concentraciones de insulina en ovejas que estuvieron restringidas por 6 semanas, sugiriendo una resistencia a la insulina, como efecto del aumento compensatorio en las concentraciones plasmáticas basales de insulina, teniendo como objetivo biológico favorecer la disponibilidad de glucosa para los tejidos no insulino-dependientes, en particular el cerebro. Estas altas concentraciones son debidas a un cambio en la dieta, ya que los animales venían de condiciones de menor disponibilidad

de energía, debido a esto el organismo se hizo más eficiente en administrar la energía que tenía, pero cuando existe una mayor concentración de glucosa en sangre el organismo responde aumentando la concentración de insulina como una respuesta al administrar la energía obtenida por el organismo (Schwartz *et al.*, 1992).

La cantidad de cuerpos lúteos en respuesta al tratamiento superovulatorio fue mayor para el grupo con una previa desnutrición (PD) en comparación al grupo T. Se ha sugerido que la condición corporal tiene un papel importante sobre la tasa ovulatoria (Viñoles *et al.*, 2002), observándose que en ovejas con una condición corporal baja durante la última parte de la fase lútea no existen diferencias en la concentración de FSH a diferentes planos alimenticios, no así en las concentraciones de glucosa e insulina, sugiriéndose que una mayor respuesta en la tasa ovulatoria puede estar influenciada por las concentraciones existentes de glucosa e insulina durante esa fase (Viñoles *et al.*, 2005). Por otra parte Lucy *et al.* (1993), han observado que el suplemento alimenticio de grasa de manera isocalórica con respecto a una dieta testigo sin suplemento de grasa estimula el crecimiento del folículo preovulatorio además ésta influye en el número total de folículos (Beam y Butler, 1997; Lammoglia *et al.*, 1997) e incrementa el tamaño de los folículos preovulatorios (Beam y Butler, 1997; Oldick *et al.*, 1997), mencionándose que este incremento puede ser debido en parte al incremento en la pulsabilidad de LH en plasma, que estimulan en la última etapa de crecimiento folicular. Por otra parte en ovejas maduras alimentadas con una dieta baja en energía (aproximadamente 0.5-0.6 veces la energía requerida para mantenimiento) por 3 a 4 semanas se redujo la condición corporal (de 2.61 a 2.1 y de 2.5 a 2.33; Abecia *et al.*, 1999; Lozano *et al.*, 2003, respectivamente) observándose una disminución en la tasa

de división celular, número de embriones de buena calidad y tasa de gestación, mientras que en ovejas alimentadas *ad libitum* por aproximadamente 3 semanas se obtuvo un incremento en la condición corporal (de 2.58 a 2.7, en escala de 1 a 5), pero tuvieron una baja respuesta superovulatoria, un bajo número de oocitos de buena calidad y un porcentaje mayor de desarrollo embrionario (Lozano *et al.*, 2003). Estos datos y los del presente experimento indican que la disminución o incremento en la condición corporal puede ser asociada con la disminución en la calidad del oocito medido por la tasa de fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario temprano en ovejas. En el presente estudio no se observaron diferencias en la tasa de gestación entre grupos, lo cual indica que la nutrición no tuvo un efecto negativo en las estructuras recuperadas en ovejas superovuladas en diferentes condiciones nutricionales. Lo anterior concuerda con lo reportado por Abecia *et al.* (1997), quienes no observaron diferencias en la tasa de gestación como resultado de una sub-nutrición o sobrenutrición en ovejas que fueron superovuladas. Por otra parte altas tasas de gestación han sido asociadas a un incremento en las concentraciones de progesterona en plasma durante la fase lútea antes y después de la inseminación (Maurer y Etchernkamp, 1982; Butler *et al.*, 1996) y algunos estudios indican que la nutrición ejerce sus efectos directos sobre las funciones reproductivas mediante la alteración en la producción de hormonas claves para la fisiología reproductiva (O'Callaghan y Boland, 1999; Lucy, 2003; Hunter *et al.*, 2004).

2.5. Conclusiones

En conclusión en las presentes condiciones experimentales la condición corporal afectó la respuesta a la tasa ovulatoria y concentración de insulina en ovejas alimentadas con heno de avena, mientras que la concentración de P_4 fue mayor en ovejas alimentadas con concentrado, sin embargo no afectó la tasa de gestación entre grupos.

2.6. Literatura Citada

- Abecia, J.A., J.M. Lozano, F. Forcada, L. Zarazaga. 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 209-218.
- Abecia, J.A., F. Forcada, and J.M. Lozano. 1999. A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F₂ α production *in vitro*, interferon-tau synthesis by the concepts, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryos wastages in ewes. *Theriogenology* 52: 1203-1213.
- Arana, A., J.A. Mendizabal, M. Alzón, P. Eguinoa, M.J. Berian, A. Purroy. 2006. Effect of feeding lambs oleic acid calcium soaps on growth adipose tissue development and composition. *Small Rum. Res.* 63: 75-83.
- Armstrong, D.G., J.G. Gong, and R. Webb. 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanism. *Reproduction Suppl.* 61: 403-414.
- Beam, S.W. and W.R. Butler. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56:133-142.
- Boland, M. P., P. Lonergan, and D. O'Callaghan. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology.* 55: 1323-1340.
- Boland, M.P. and P. Lonergan. 2005. Effects of nutrition on fertility in dairy cows. *Adv. Dairy Techn.* 15: 19-33.
- Burke, J.M., D.J. Carroll, K.E. Rowe, W.W. Thatcher, and F. Stormshak. 1996. Intravascular Infusion of lipid into ewes stimulates production of progesterone and prostaglandin. *Biol. Reprod.* 55: 169-175.
- Buttler, W.R., J.J. Calaman, and S.W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lacting dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74: 858-865.
- Caldeira, R.M., A.T. Belo, C.C. Santos, M.I. Vazques, A.V. Portugal. 2007. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rum. Res.* 68: 233-241.

- Cordeiro, M.F., J.B. Lima-Verde, E.S. Lopes-Junior, D.I.A. Texeira, L.N. Farias, H.O. Salles, A.A. Simplício, D. Rondina, V.J.F. Freitas. 2003. Embryo recovery rate in Santa Ines ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Rum. Res.* 49: 19-23.
- Daniel, J.A. B.K. Whitlock, J.A. Baker, B. Steele, C.D. Morrison, D.H. Keisler, and J.L. Sartin. 2002. Effect of body fat mass and nutritional status on 24 hour leptin profiles in ewes. *J. Anim. Sci.* 80: 1083-1089.
- Downing, J.A., J. Joss, P. Connell and R.J. Scaramuzzi. 1995. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J. Reprod. Fertil.* 103: 137-145.
- Dunn, T., and G. Moss. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70:1580-1593.
- Espinoza, J.L., J.A. Ramirez-Godinez, S.S. Simental, J. Jimenez, R. Ramirez, A. Palacios and R. De Lun. 1997. Effects of calcium soaps of fatty acids on serum hormones and lipid metabolites in Pelibuey ewes. *Small Rum. Res.* 26: 61-68.
- Espinoza, J.L., A. Palacios, R. Ortega y A. Guillen. 2008. Efecto de la suplementación de grasas sobre las concentraciones séricas de progesterona, insulina, somatotropina y algunos metabolitos de los lípidos en ovejas Pelibuey. *Arch. Med. Vet.* 40: 135-140.
- Gonzalez, B.A, R.M. Garcia G., J., Santiago M., A. López S., 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.
- Hawkins D.E., D. Niswender K., M. Oss G. L. Moeller C., G. Odde K, R. Sawyer H. and D. Niswender G. 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J. Anim. Sci.* 73: 541-545.
- 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.* 82-93: 461-477.
- Lammoglia, M.A., S.T. Williard, D.M. Hallford and R.D. Randel. 1997. Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol 17 β , 13-14-dihydro-15-ketoprostaglandin F_{2 α} and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 75:1591-1600.

- Littell, R.C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216–1231.
- Littell, R. C., J. Pendergast and R. Natarajan. 2000. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat. Med.* 19:1793-1819.
- Lozano, J.M., P. Loenrgan, M.P. Boland, and D.O'Callaghan. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programs in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproductio* 125: 543-553.
- Lucy, MC, R.L. De la Sota, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 1993. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *Journal of Dairy Science* 76: 1014-1027.
- Lucy, M.C. 2003. Mechanism linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Suppl.* 61: 415-427.
- Martin, G.B. and G. Banchemo H. 1999. Nutrición y reproducción en ruminates. I Curso Internacional de fisiología de la reproducción de Rumiantes. Memoria. XX Aniversario de Ganadería Colegio de Postgraduados, Montecillo, Pag 27-58.
- Maurer, R.R., and S.E. Echternkamp. 1982. Hormonal asynchrony and embryonic-development. *Theriogenology.* 17: 11-22.
- O'Callaghan D., H. Yaakub, P. Hyttel, L.J. Spicer and M.P. Boland. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fert.* 118: 303-313.
- O'Callaghan, D., and M.P. Boland. 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim. Sci.* 68: 299-314.
- Oldick, B.S., C.R. Staples, W.W. Thatcher and P. Gyawu. 1997. Abomasal infusion of glucose and fat-effects on digestion, production and ovarian and uterine functions of cows. *J. Dairy Sci.* 80: 1315-1328.
- Overström, E.W. 1996. *In vitro* assessment of embryo viability. *Theriogenology.* 45: 3-16.
- Parr, R.A., 1992. Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep. *Reproduction Fertility and Development* 4. 297-300.

- Recabarren, S.E., A. Lobos, P. Muñoz, M. Calvillan, and J. Parilo. 2005. Sensibilidad a la insulina en ovejas prepúberes con alimentación normal y con restricción alimenticia. *Arch. Med. Vet.* 37: 111-116.
- SAS, 1982. SAS. User's Guide: Statistics (Version 5 Ed.). Cary, N.C. U.S.A. Inst. Inc. 584 p.
- Schwartz M.W., D.P. Figlewicz, D.G. Baskin, S.C. Woods, and D. Porte Jr. 1992. Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* 13: 387-414.
- Silva, S.R., J.J. Afonso, V.A. Santos, A. Monteiro, C.M. Guedes, J.M.T. Azevedo, and A. Dias-da-Silva. 2006. *In vivo* estimation of sheep carcass composition using real-time ultrasound with two probes of 5 and 7.5 Mhz and image analysis. *J. Anim. Sci.* 84: 3433-3439.
- Viñoles, C., M. Forsberg, G.B. G. Banchemo, E. Rubianes. 2002. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Science* 74: 539-545.
- Viñoles, C., M. Forsberg, G.B. Martin, C. Cajarville, J. Repetto, A. Meikle. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction.* 129: 299-309.
- Viñoles, C., B.L. Paganoni, K.M.M. Glover, J.T.B. Milton y G.B. Martin. 2007. Alimentación focalizada para aumentar la eficiencia reproductiva en ovinos: Modelo de una oleada folicular para estudiar su efecto en el desarrollo folicular y los perfiles hormonales. *Reproducción en Rumiantes "Nuevas Alternativas de Manejo para mejorar la eficiencia reproductiva"*. Memoria. Montecillo. Pag 152-172.

CONCLUSIONES GENERALES

En términos generales y de acuerdo con las condiciones experimentales descritas se concluye que la nutrición en el caso del programa de sincronización solamente retrasó el inicio de la presentación del estro, e inicio de la elevación de LH, no influyendo en las demás variables evaluadas (exp. 1), mientras la combinación de P₄ endógena y exógena (FGA), aumentó las concentraciones de P₄, afectando la duración del estro, pero no influyó en las demás variables, lo cual indica que estas variables pueden repercutir negativamente en un programa de sincronización de estros alterando el inicio y duración de este, y con ello comprometiendo el éxito del programa.

En el caso del programa de sincronización y superovulación, la desnutrición previa a estos programas y su posterior restauración afectó la respuesta a la tasa ovulatoria y concentraciones de insulina en ovejas alimentadas con heno de avena, mientras que las concentraciones de P₄ fueron mayores en ovejas que no estuvieron bajo una previa desnutrición, estos resultados muestran que el efecto de la grasa de sobrepeso en un programa de superovulación, puede estar condicionado al nivel corporal al momento de iniciar el programa de suplementación.