



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE α -TOCOFEROL EN EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE OVEJAS CRIOLLAS SINCRONIZADAS

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

BLANCA ESTELA FUENTES ROMERO

Bajo la supervisión de: **RAYMUNDO RANGEL SANTOS, Ph.D.**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



Junio 2015

Chapingo, estado de México

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE α -TOCOFEROL EN EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE OVEJAS CRIOLLAS SINCRONIZADAS

Tesis realizada por **Blanca Estela Fuentes Romero** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: RAYMUNDO RANGEL S.
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: Dr. CARLOS ANTONIO APODACA SARABIA
Dr. CARLOS ANTONIO APODACA SARABIA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
DEDICATORIA.....	VIII
DATOS BIOGRÁFICOS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Antioxidantes	4
2.2 Vitamina E	4
2.2.1 Estructura química del α -tocoferol.....	5
2.2.2 Actividad biológica.....	5
2.2.3 Vía de aplicación	7
2.2.4 Requerimientos de vitamina E en ovinos.....	8
2.3 Estrés oxidativo	9
2.4 Radicales libres	9
2.5 Vitaminas y ERO en la reproducción	12
2.6 Envejecimiento celular	13
2.7 Nutrición para la concepción y gestación	14
2.8 Literatura citada	15

3. COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE OVEJAS CRIOLLAS TRATADAS CON α -TOCOFEROL DURANTE LA SINCRONIZACIÓN	18
3.1 Resumen	18
3.2 Abstract	19
3.3 Introducción	20
3.4 Materiales y Métodos.....	22
3.4.1 Localización	22
3.4.2 Animales	22
3.4.3 Tratamientos y diseño experimental	22
3.4.4 Manejo alimenticio.....	23
3.4.5 Sincronización de celos.....	23
3.4.6 Detección de celos	23
3.4.7 Inseminación artificial	24
3.4.8 Diagnóstico de gestación	25
3.4.9 Variables respuesta.....	25
3.4.10 Análisis estadístico.....	26
3.5 Resultados.....	27
3.5.1 Incidencia de celos.....	27
3.5.2 Inicio de celo	28
3.5.3 Distribución del celo	28
3.5.4 Población folicular	29
3.5.5 Diámetro folicular	30
3.5.6 Tasa de concepción	30

3.5.7	Tipo de gestación	31
3.5.8	Tasa ovulatoria.....	31
3.5.9	Prolificidad.....	32
3.6	Discusión	32
3.7	Conclusión.....	37
3.8	Literatura citada	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Dosis de α -Tocoferol (UI) y día de aplicación por tratamiento.....	23
Cuadro 2. Incidencia de celos en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.	27
Cuadro 3. Inicio de celo en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.....	28
Cuadro 4. Población folicular promedio en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.....	29
Cuadro 5. Diámetro folicular promedio en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.....	30
Cuadro 6. Tasa de concepción para ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.....	30
Cuadro 7. Tasa ovulatoria en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol durante la sincronización.....	32
Cuadro 8. Prolificidad de ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del D- α -tocoferol.....	5
Figura 2. Representación metabólica de las especies reactivas de oxígeno.....	11
Figura 3. Distribución de celos (■ 24 h, ■ 30 h, ■ 39 h, ■ 53 h y ■ 60 h) en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.....	29
Figura 4. Tipo de gestación (■ simple, ■ múltiple) en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.	31

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Zootecnia y al Posgrado en Producción Animal por ser parte de mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por el apoyo económico brindado para la realización de la presente investigación.

Al Ph.D. Raymundo Rangel Santos por su asesoría y apoyo para la realización de la presente tesis, por todas las enseñanzas brindadas.

Al Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara, al Dr. Carlos Antonio Apodaca Sarabia por su colaboración, asesoría y apoyo para la realización de la presente tesis.

A la Dra. Citlalli C. González Ariceaga por su apoyo en el laboratorio.

Al M.C. Eliseo Romero responsable del Módulo de Ovinos y Caprinos de la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia por las facilidades prestadas para la elaboración del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros del Posgrado en Producción Animal que fueron una parte importante en la fase de campo Erick, Lino, Oswaldo, Juan y David, así como a los compañeros de licenciatura Alfredo y Ricardo, muchas gracias por su apoyo.

Blanca Estela Fuentes Romero

DEDICATORIA

A mi papá:

Juan Fuentes Valle (q.e.p.d.)

...Porque me impulso a ser mejor cada día, por permitirme tomar mis propias decisiones y por darme las alas para volar.

A mi mamá

Pudenciana Georgina Romero Anides

...Por ser mi amiga, el motor que impulsa mi vida y sobre todo por la paciencia en estos dos años.

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre:	Blanca Estela Fuentes Romero
Fecha de nacimiento:	11 de mayo de 1974
Lugar de Nacimiento:	Texcoco, México
Profesión:	Médico Veterinario Zootecnista
Cédula profesional:	3276969
Profesión:	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula profesional:	7986137



FORMACIÓN ACADÉMICA

1989 – 1992	Escuela Preparatoria “Texcoco”, Texcoco, México.
1992 – 1998	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán de Romero Rubio, México.
2006 – 2012	Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
2013 – 2014	Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.

1. INTRODUCCIÓN

La Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (2015) mencionó que aunque las importaciones de carne de ovino han descendido en los últimos 10 años a un ritmo de 15% anual, para el 2014 el consumo de carne ovina en México aun se ve abastecida por importaciones hasta en 19%, indicando una baja competitividad de la producción ovina mexicana. Sus causas son multifactoriales, entre ellas el mal manejo nutricional, sanitario, reproductivo, la escasa aplicación de nuevas tecnologías y la falta de especialización por parte de los profesionales (Martínez *et al.*, 2010).

La sincronización de estros tiene como objetivo agrupar a las ovejas para la manifestación de signos de estro en un tiempo dado, facilitando, las actividades reproductivas. En hembras con aplicación a largo plazo, la inflamación de la mucosa vaginal es un efecto secundario demostrado, inflamación que incrementa las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ERO) y por consiguiente generando un estrés oxidativo, asociado a menor fertilidad (Sönmez *et al.*, 2009).

El oxígeno es esencial para la vida y a su vez dañino a nivel celular, sus efectos negativos se anulan cuando se reduce a través de reacciones enzimáticas, sin embargo del 2 al 5% se transforma en radicales libres de oxígeno (RLO); el desbalance en la producción de ERO y la defensa antioxidante provoca un daño conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos como peroxidación lipídica, daño en la membrana celular, ruptura del ADN y degradación proteica (Pérez y Pérez, 2000).

Las vitaminas antioxidantes junto con el glutatión conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando su potencial oxidativo destructivo (Benítez, 2006). El α -tocoferol neutraliza al radical hidroxilo por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante (Pérez y Pérez, 2000).

El comportamiento reproductivo de las hembras se puede mejorar a lo largo del año si se aplica vitamina E y selenio en ovejas reproductoras (Mendoza, 2010). Sönmez *et al.* (2009) mencionaron que la vitamina E es esencial para la reproducción de los mamíferos, ya que funciona como antioxidante celular y modulador de muchos procesos bioquímicos intracelulares y extracelulares, por lo que es importante en el mantenimiento y restauración del equilibrio oxidante y antioxidante en el cuerpo.

La producción de especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo (OH), el anión superóxido (O_2^-) y las moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se producen de forma normal en el organismo, su función es la regulación de múltiples procesos reproductivos como la maduración de los ovocitos, la esteroidogénesis y la fertilización; sin embargo, su exceso produce estrés oxidativo pudiendo desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la infertilidad y fertilidad asistida (Sönmez *et al.*, 2009).

Las vitaminas en conjunto con los minerales afectan el control de las vías metabólicas o la expresión génica, así como la actividad de ERO, por lo tanto su deficiencia puede inducir altas tasas de ERO dando como resultado diferentes trastornos reproductivos (Aurousseau *et al.*, 2006).

Los efectos antes mencionados de la vitamina E en la reproducción originaron interés en su estudio. Njeru *et al.* (1994b) estudiaron el efecto de la aplicación de DL-alfa-acetato de tocoferol a diferentes dosis, 28 días antes y después del parto, en la placenta y la glándula mamaria. Determinando que aumentaba la concentración sérica de tocoferol en los corderos a través de la transferencia de la glándula mamaria, pero la transferencia vía placentaria fue ineficiente.

Sönmez *et al.* (2009) realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de la vitamina E durante el periodo preovulatorio en el comportamiento reproductivo de cabras después de la sincronización de estros usando esponjas intravaginales. En este estudio aplicaron 200 mg de vitamina E vía intramuscular al momento de remover la esponja y al momento de la segunda

inseminación. Estos autores mencionaron que el uso de vitamina E durante el periodo preovulatorio puede evitar el exceso de producción de ERO mejorando la tasa de nacimientos múltiples (70%) y el número de crías nacidas (2.4 ± 0.37).

Los resultados preliminares de algunas investigaciones en el módulo de ovinos y caprinos indicaron mayor sobrevivencia embrionaria en ovejas tratadas con vitamina E (R. Rangel, comunicación personal). La importancia de la vitamina E en la reproducción de los rumiantes nos condujo a su evaluación en ovejas Criollas sincronizadas.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de vitamina E en los parámetros reproductivos de ovejas Criollas sincronizadas.

La hipótesis es que los parámetros reproductivos de las ovejas Criollas son afectados por un incremento de las ERO, por lo que la aplicación de α -tocoferol durante la sincronización de celos puede tener un efecto positivo en estos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que en concentraciones normales poseen una afinidad mayor que cualquier molécula para interaccionar con un radical libre (Pérez y Pérez, 2000), los cuales conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando su potencial oxidativo destructivo (Benítez, 2006); como la vitamina E que reduce al radical hidroxilo (OH) y la vitamina C que reduce al radical superóxido (O_2^-) y al OH (Pérez y Pérez, 2000).

Algunos antioxidantes no actúan como agentes reductores, las enzimas citocromo oxidasa, la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RLO (Pérez y Pérez, 2000).

Otros eliminadores de radicales son la transferrina y la ceruloplasmina que transportan metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO (Pérez y Pérez, 2000).

2.2 Vitamina E

La vitamina E es un término que abarca un grupo de potentes antioxidantes liposolubles. Análisis estructurales han revelado que las moléculas que tienen actividad antioxidante de la vitamina E incluyen cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles, ambos clasificados como α , β , γ , δ . La forma α -tocoferol es el isómero más abundante en la naturaleza, la más disponible en los alimentos, encontrándose en un 80% de estos y tiene la mayor actividad biológica determinada mediante ensayos de reabsorción fetal (Brigelius-Flohe y Traber, 1999; Márquez *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002).

2.2.1 Estructura química del α -tocoferol

La vitamina E químicamente consiste de un anillo de cromano con un grupo alcohol en la posición 6. Los miembros de ambas familias (tocoferoles y tocotrienoles) son designados α , β , γ ó δ dependiendo de la posición que ocupe el grupo metilo del anillo citado. La diferencia entre ambas familias radica en que los tocoferoles poseen una cadena lateral saturada y los tocotrienoles insaturada (Torres *et al.*, 2002).

La vitamina E es un lípido isoprenoide sustituido, su forma biológicamente activa es el D- α -tocoferol (Figura 1), cuyo hidroxilo fenólico en el anillo de cromano es responsable de la reducción antioxidante (Benítez, 2006).

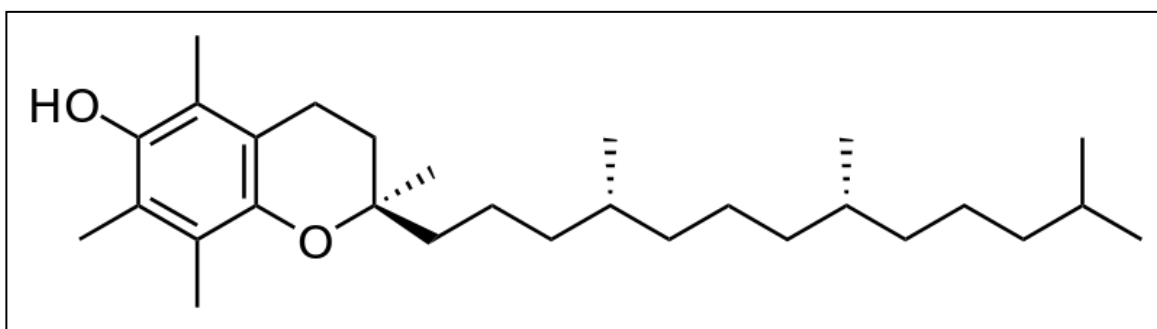


Figura 1. Estructura molecular del D- α -tocoferol.

2.2.2 Actividad biológica

La vitamina E es un antioxidante biológico presente en muchos tejidos corporales y es más abundante en la membrana celular (Gibert, 2008). Torres *et al.* (2002), mencionaron que la vitamina E es un antioxidante liposoluble capaz de proteger a la membrana celular y subcelular. Dichas membranas poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a peroxidarse y originar radicales con capacidad oxidativa.

La función básica de la vitamina E es prevenir el daño de la membrana por efecto de los radicales libres, realizando la protección intraorgánica (Gibert,

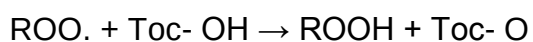
2008). La vitamina E opera en las membranas de los lípidos, para evitar daño oxidativo y disfunción celular (Robinson *et al.*, 2002).

La vitamina E es una de las primeras barreras de la peroxidación por lo que previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las proteínas ricas en radicales con azufre. Dicho efecto deriva de su estructura molecular, ya que se comporta como una molécula liposoluble capaz de fijar radicales libres del tipo $O^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ y OH debido a su grupo fenólico (Márquez *et al.*, 2002; Benítez, 2006); así entonces el α -tocoferol actúa como un secuestrante de radicales libres, interrumpiendo su formación. Los radicales libres pueden causar daño a la membrana de los organelos subcelulares (Torres *et al.*, 2002).

Rodríguez *et al.* (2001) clasificaron a la vitamina E dentro de los sistemas de defensa biológicos considerados de cuarto nivel. La vitamina E por ser hidrofóbica se localiza en las membranas celulares donde su protección es particularmente importante, neutralizando al radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss.

Los fosfolípidos de las membranas mitocondriales, del retículo endoplasmático y de la membrana plasmática poseen afinidad para el α -tocoferol, por lo que se encuentra en altas concentraciones en estos sitios (Márquez *et al.*, 2002).

Los tocoferoles (Toc-OH) actúan interrumpiendo reacciones de cadena con radicales libres (ROO) como resultado de su capacidad de transferir el hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre, quedando a la vez, en la forma de radical libre fenoxi o fenoxilo (Toc-O), en reacciones intermedias no reversibles que presuponen la transformación de la vitamina hasta su producto final inocuo como se puede ver a continuación:



La inhibición de la peroxidación lipídica en las membranas por el tocoferol evita la acumulación de hidroperóxidos, porque el tocoferol funciona como un “canal molecular” a través del cual los radicales abandonan la zona hidrocarbonada de las membranas. El tocoferol al ser oxidado forma radicales hidroquinona estables que no perturban la química celular, y que posteriormente son regenerados a vitamina E mediante la aceptación de un electrón proveniente de agentes reductores como la vitamina C (Márquez *et al.*, 2002).

La vitamina E ha sido involucrada en la regulación de la síntesis de ADN, la expresión genética, el metabolismo mitocondrial y en la proliferación y diferenciación celular (Márquez *et al.*, 2002).

El tejido adiposo es el principal sitio de almacenamiento de la vitamina E, pero ésta no se almacena en el cuerpo en concentraciones apreciables (Hatfield *et al.*, 2000). Piñeiro (2007) mencionó que por ser una vitamina liposoluble, la vitamina E se deposita en algunos tejidos entre los que se encuentran los órganos sexuales femeninos y masculinos, motivo por el cual se investiga el papel de la vitamina E en la fertilidad.

La vitamina E está presente en el folículo preovulatorio, por lo que un aumento en su concentración causa una reducción de las concentraciones de las ERO en el fluido folicular. La vitamina E es importante para la calidad de los ovocitos y su maduración, así como para la implantación y crecimiento fetal. También se ha demostrado que protege a los ovocitos desnudos de la degeneración y facilita la maduración meiótica del complejo cúmulo-ovocito. El tratamiento con vitamina E aumenta la tasa de nacimientos múltiples y el promedio de crías nacidas por hembra, lo cual puede estar relacionado con un aumento en la tasa de fertilización de ovocitos viables (Sönmez *et al.*, 2009).

2.2.3 Vía de aplicación

Las vías de aplicación de la vitamina E son intramuscular, intravenosa y oral, las dos primeras permiten una mayor biodisponibilidad, siendo las inyecciones

de vitamina E en dispersión acuosa las que tienen más disponibilidad que a base de aceite, y se alcanzan mayores concentraciones en suero, aunque tiene un mayor lapso de tiempo en el organismo cuando se aplica por vía oral (Hatfield *et al.*, 2000).

La aplicación intramuscular de DL- α -acetato de tocoferol (en solución acuosa) en ovinos tiene mayor efectividad en el incremento sérico de tocoferol que la suplementación oral (Njeru *et al.*, 1994a). Por otro lado, Hatfiel *et al.* (2000) mencionaron que la forma α -tocoferol da como resultado mayores concentraciones séricas de vitamina E que cualquier otra forma o combinación de la misma.

2.2.4 Requerimientos de vitamina E en ovinos

Los requerimientos nutricionales diarios para animales en crecimiento y ovejas gestantes fueron de 10.0 a 15.0 mg/kg de materia seca, pero serian insuficientes hasta 30.0 mg de vitamina E/kg de materia seca si el selenio es deficiente en la dieta (ARC, 1980). La NRC (1985) recomienda 15 UI de vitamina E/kg de materia seca en ovejas en cualquier periodo, asumiendo que la cantidad de selenio es la adecuada en la dieta. Gimenez (1994) menciona que la dosis por animal de vitamina E para su mantenimiento es de 15 UI, incrementándose a 18 UI para hembras no lactantes o durante las primeras 15 semanas de gestación. Al realizar la dosificación de vitamina E se debe considerar que 1 mg de la forma sintética de acetato de alfa-tocoferol es equivalente a 1 Unidad Internacional (UI) de vitamina E y 1 mg de la forma natural de alfa-tocoferol equivale a 1.49 UI (Márquez *et al.*, 2002).

La aplicación intramuscular de 500 UI de DL-alfa-tocoferol mostró un aumento rápido de tocoferol en suero entre el día 1 y 3, seguido de un rápido descenso de las concentraciones (Njeru *et al.*, 1994a).

2.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo son los efectos anormales que se presentan cuando existe un desequilibrio entre la acción de agentes oxidantes sobre las células y la respuesta antioxidante de estas. Tal circunstancia se presenta después de la introducción de ciertos fármacos o cuando la concentración de antioxidantes disminuye, ya sea debido a una malnutrición como la hipovitaminosis E o debido a un fallo funcional de alguna enzima involucrada en la respuesta antioxidante del organismo (Benítez, 2006).

El estrés oxidativo ocurre cuando el aumento de las concentraciones de ERO interrumpen los circuitos celulares de pérdida o ganancia de electrones, resultando en alteraciones en los procesos celulares de regulación oxido-reducción (REDOX) y/o en daño celular oxidativo de macromoléculas (Devine et al., 2012).

El estrés oxidativo puede provenir de una deficiencia del sistema de defensa antioxidante o por un incremento de la formación de ERO lo que puede provocar peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, ruptura del ADN y degradación proteica (Pérez y Pérez, 2000).

2.4 Radicales libres

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2 al 5% escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno o ERO. Las ERO son moléculas que en su órbita más externa poseen un número impar de electrones por lo que son muy inestables; son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo mediante reacciones bioquímicas de oxidación y reducción (Pérez y Pérez, 2000).

Las ERO se forman a través de la fuga de electrones de la membrana interna de la mitocondria durante la fosforilación oxidativa y la generación de ATP. Las

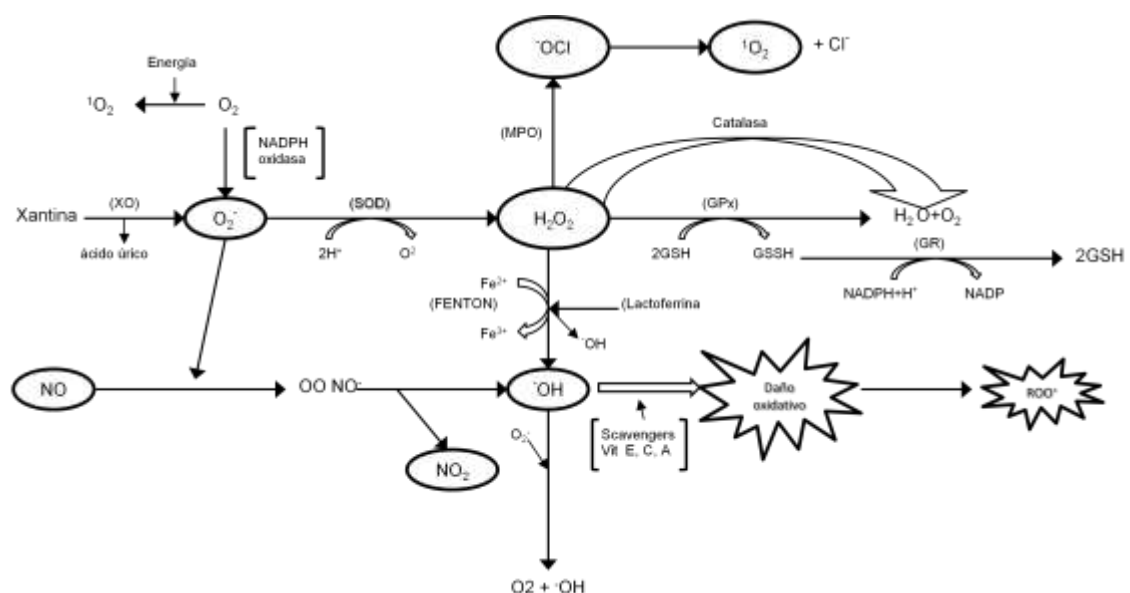
enzimas esteriodogénicas citocromo P450 presentes en el tejido esteroidogénico del ovario también son fuentes de ERO (Devine *et al.*, 2012).

Rodríguez *et al.* (2002) observaron que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos celulares. En una situación patológica la producción de RL se incrementa sustancialmente, ingresándose al estado de estrés oxidativo.

Las ERO se forman como parte normal del metabolismo celular (

Figura 2) o por la exposición a factores ambientales de la siguiente manera: la reducción univalente del O_2 produce el radical superóxido (O_2^-) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente genera H_2O_2 a través de la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 no es un radical libre de oxígeno, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical OH que es varios miles de veces más reactivo que el radical O_2^- y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres (Pérez y Pérez, 2000).

Los ERO pueden inducir la propagación en cascada de reacciones de oxidación entre las moléculas, la formación de nuevos radicales y eventualmente una amplificación exponencial de la tasa de producción de ERO. Esta cadena de reacciones se interrumpe cuando el desequilibrio electrónico de los radicales se corrige (Aurousseau *et al.*, 2006).



La GPx también reduce a los lipoperóxidos (agente tóxico y productor de radicales peróxido) (RO-O)

XO: xantino oxidasa.

SOD: superóxido dismutasa.

GPx: glutatión peroxidasa.

Gr: glutatión reductasa.

MPO: mieloperoxidasa.

ROO: peroxil.

$O_2^{\cdot -}$: radical superóxido.

H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

OCl: ion hipoclorito.

1O_2 : oxígeno singlete.

GSH: glutatión reducido.

GSSH: glutatión oxidado.

OONO: anión peroxinitrito.

NO: óxido nítrico.

$\cdot OH$: radical hidroxilo.

$NO^{\cdot}$: radical nítrico.

Figura 2. Representación metabólica de las especies reactivas del oxígeno (Fuente: Pérez y Pérez, 2000).

Entre los radicales libres se encuentran los lipoperóxidos o peróxidos lipídicos ($R-COO^{\cdot}$), los cuales son moléculas de ácidos grasos en las que el grupo hidroxilo de la formación carboxilo presenta un electrón impar, confiriéndole propiedades de radical libre. Los lipoperóxidos se originan a partir del ataque de radicales libres de ERO a las biomembranas, proceso anormal conocido como peroxidación lipídica (Benítez, 2006).

Los efectos deletéreos se inician por los radicales libres ($ROO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$) producidos durante la formación de peróxidos a partir de ácidos grasos (radicales peroxilo) que contienen enlaces dobles interrumpidos entre grupos metilenos, es decir, los enlaces presentes en los ácidos grasos poliinsaturados

que se encuentran tanto en membranas biológicas como en los alimentos (Benítez, 2006).

La agresión de estas especies reactivas tanto de oxígeno como los lipoperóxidos en las biomembranas constituye la esencia del daño en el estrés oxidativo. El efecto se debe a que se desestabiliza la estructura y función de la célula, y la función de sus organelos. Lo anterior puede constituir la causa en unos casos, y en otros la consecuencia de la activación de señalizaciones para la autodestrucción de membranas y muerte celular o apoptosis (Benítez, 2006).

2.5 Vitaminas y ERO en la reproducción

Las especies reactivas de oxígeno en mujeres son factores esenciales en la replicación celular, la diferenciación y el crecimiento (señal oxidativa); durante la gestación, juegan un papel en la remodelación de los tejidos uterinos, implantación del embrión, arreglo de las vellosidades y el desarrollo de los vasos sanguíneos propios de la gestación. También son agentes potencialmente dañinos si se incrementan de forma descontrolada, produciendo un desequilibrio electrónico en el organismo lo que origina un incremento en la tasa de alteraciones oxidativas de lípidos, proteínas y ADN (Aurousseau *et al.*, 2006).

El cuerpo de las hembras gestantes almacena vitaminas y minerales, utilizados para mantener un equilibrio en la producción de ERO a concentraciones de señal oxidativa y evitar que se produzca un estrés oxidativo que sería perjudicial para la madre y el feto. Algunas evidencias basadas en diferentes mecanismos de regulación indican que la mayoría de los efectos de las ERO que se producen en seres humanos también se producen en hembras gestantes de rumiantes (Aurousseau *et al.*, 2006).

La vitamina E es importante para la eficiencia reproductiva, pues juega un papel importante en el control del estrés oxidativo, el cual puede comprometer el desarrollo folicular y la actividad ovárica (Liu *et al.*, 2014).

Los folículos antrales, las células de la granulosa y los ovocitos son sensibles al estrés oxidativo (Devine *et al.*, 2012), el cual aumenta la atresia de los folículos antrales y apoptosis de estos y de las células de la granulosa, siendo la acumulación de ERO señales claves de esta patología. Los autores también mencionan que el estrés oxidativo disminuye la concentración de glutatión, lo que provoca que no se lleve a cabo de forma eficiente la fecundación y el posterior desarrollo del embrión.

2.6 Envejecimiento celular

Las teorías que han tratado de explicar el envejecimiento como resultado de un proceso defectuoso intracelular, por lo general se basan en la suposición de que existe una frecuencia finita de errores en las operaciones bioquímicas de todas las células. A lo largo de cierto tiempo, estos errores podrían acumularse y producir una célula con una función defectuosa o podría dar como resultado la muerte de dicha célula. Los errores bioquímicos o el daño pueden tener lugar en numerosos sitios y manifestarse de diferentes maneras. En la teoría del envejecimiento se propone que el daño es el resultado de la formación de radicales libres altamente reactivos, en particular con oxígeno (Karp, 1990).

En las células aeróbicas, algunas reacciones enzimáticas son las causantes de la generación de radicales superóxido (O_2^-) como intermediarios libres. En presencia de agua, estos tipos de radicales se convierten en radicales hidropéroxidos (HO_2^-). Por otro lado, la enzima superóxido dismutasa presente en las células, cataliza la degradación del radical superóxido convirtiéndolo en un peróxido de hidrógeno que es destruido subsecuentemente. Hay muchas especulaciones originadas en los últimos años respecto a la incorporación de antioxidantes como la vitamina E y C como agentes benéficos para reducir el daño producido en las células por los radicales libres (Karp, 1990).

2.7 Nutrición para la concepción y gestación

El conocimiento actual sobre la nutrición para la concepción y la gestación en ovejas, se basa en resultados de ensayos que tienen como objetivo generar información sobre cómo diversos nutrientes facilitan la programación y expresión de diferentes vías metabólicas. Las cuales permiten a los animales acercarse a su potencial genético reproductivo, y determinar cómo actúan indirectamente al modificarse en la expresión de las funciones hormonales, lo que a su vez tiene influencia en la maduración de ovocitos, la ovulación, el desarrollo embrionario, el crecimiento fetal y la viabilidad, y el vigor del cordero recién nacido (Robinson *et al.*, 2002).

Njeru *et al.* (1994b) mencionan que la suplementación con 15 a 60 UI de vitamina E por vía oral genera altas concentraciones en suero rápidamente, pero no tiene efecto en el feto 28 días antes de nacer, debido a que la transferencia de vitamina E por placenta es muy limitada.

Robinson *et al.* (2002) refieren la importancia de identificar el punto crítico en el desarrollo, en donde el suministro de nutrientes juega un papel fundamental en la expresión de las respuestas inmediatas y posteriores que afectan los procesos reproductivos; así mismo que los oligoelementos y las vitaminas juegan un papel importante en la supervivencia del embrión a través de sus efectos sobre la síntesis de hormonas esteroidales, la expresión de crecimiento y factores de transcripción de genes, todos los cuales influyen en la proliferación y diferenciación celular.

Los desequilibrios nutricionales, tales como las deficiencias en vitamina E y selenio conducen a muerte embrionaria durante la implantación, disminuyen el crecimiento fetal posterior y el peso al nacer de los sobrevivientes debido al restrictivo tamaño de la placenta.

2.8 Literatura citada

ARC. 1980. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Slough: Commonwealth Agric. Bureaux. Surrey: The Gresham Press.

Aurousseau, B, D. Gruffat, and D. Durand. 2006. Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reproduction Nutrition Development* 46(6): 601-620.

Benítez Z., D. E. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 25(2): 8 p.

Brigelius-Flohe, R., and M. G. Traber. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(6): 1145-1155.

Devine, P. J., S. D. Perreault, and U. Luderer. 2012. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. Minireview. *Biology of Reproduction* 86(2): 1-10.

Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. 2015. Panorama de la carne y lana de Ovinos. 3 p. [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Ovino%20\(feb%202015\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Ovino%20(feb%202015).pdf). Consultada el 3 de abril de 2015.

Gibert, P. M. 2008. Selenio y vitamina E. *Suplemento Rural*. Uruguay. 12 p.

Gimenez, D. M. 1994. Nutrient Requirements of Sheep and Goats. Extension *Animal Scientist*. U.S. 8 p.

Hatfield, P. G., J. T. Daniels, R. W. Kott, D. E. Burgess, and T. J. Evans. 2000. Role of supplemental vitamin E in lamb survival and production: A review. *Journal Animal Science* 77(E suppl.): 1-9. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/77/e->

suppl/JAN0770ES01aa?search-result=1. Consultada el 7 de febrero de 2014.

Karp, G. 1990. Biología Celular. Editorial McGraw-Hill. México. p 854.

Liu, S., D. Masters, M. Ferguson, and A. Thompson. 2014. Vitamin E status and reproduction in sheep: potential implications for Australian sheep production. *Animal Production Science* 54(6): 694-714.

Márquez, M., C. E. Yépez, R. Sútil-Naranjo, y M. Rincón. 2002. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Investigación Clínica* 43 (3): 21 p.

Martínez G, S., J. Aguirre, A. A. Gómez, M. Ruíz, C. Lemus, H. Macías, L. A. Moreno, S. Salgado, y M. H. Ramírez. 2010. Tecnologías para mejorar la producción ovina en México. *Revista Fuente* 2(5): 41-51.

Mendoza A., E. A. 2008. Suplementación de selenio y vitamina E en borregas primerizas y sus efectos en variables reproductivas en periodo de anestro estacional. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. México. 78 p.

Njeru, C. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, S. B. Linda, L. X. Rojas, and S. N. Williams. 1994a. Serum and tissue tocopherol in sheep after intramuscular injection and (or) dietary vitamin E supplementation. *Journal of Animal Science* 72(3): 739-745.

Njeru, C. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, S. B. Linda, and S. N. Williams. 1994b. Pre- and postpartum supplemental DL- α -tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *Journal of Animal Science* 72(6): 1636-1640.

NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep 6th rev. ed. Natl. Acad. Press. Washington, D.C.

NRC. 1987. Vitamin Tolerance of Animals. Natl. Acad. Press. Washington, D.C.

- Pérez, P. L., y J. L. Pérez. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médico Militar* 29(3): 192-198.
- Piñeiro, E. 2007. Vitamina E y fertilidad. 3 p. http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/embarazo_y_lactancia/2007/11/08/171554.php. Consultada el 24 de noviembre de 2013.
- Robinson, J. J., J. A. Rooke, and T. G. McEvoy. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. *In*: Sheep Nutrition. Freer M and Dove H. (Eds). CAB International. Australia. pp: 189-211.
- Rodríguez P., J. M., J. R. Menéndez L., y Y. Trujillo L. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* 30(1): 15-20.
- Sönmez, M., T. Bozkurt, G. Türk, S. Gür, M. Kızıl, and A. Yüce. 2009. The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive performance of goats following estrous synchronization using intravaginal sponges. *Animal Reproduction Science* 114(8): 183-192.
- Torres, M., M. Márquez, R. Sutil, C. de Yépez, M. Leal, M. Muñoz, y M. E. Gómez. 2002. Aspectos farmacológicos relevantes de las vitaminas antioxidantes (E, A y C). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* (online) 21(1): 22-27. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000100005&lng=es&nrm=iso. ISSN 0798-0264. Consultada el 23 de abril de 2014.

3. COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE OVEJAS CRIOLLAS TRATADAS CON α -TOCOFEROL DURANTE LA SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO

3.1 Resumen

La vitamina E juega un papel importante en la reproducción. Disminuyendo la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden reducir la fertilidad en hembras. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la aplicación de α -tocoferol durante el protocolo de sincronización de estros en los parámetros reproductivos de ovejas. Sesenta ovejas fueron asignadas al azar a tres tratamientos: 1) sin α -tocoferol o testigo; 2) 250 UI de α -tocoferol; 3) 500 UI de α -tocoferol. El diseño experimental fue completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue una oveja. Para la sincronización de estros las ovejas fueron provistas con dispositivos intravaginales CIDR (por sus siglas en inglés **controlled internal drug release**) durante 12 días e inseminadas 24 h después de presentar celos. El diagnóstico de gestación se realizó los días 35 y 50 post-inseminación y el número de corderos nacidos se registro al momento del parto. Las variables evaluadas fueron distribución del celo, incidencia de celos, inicio del celo, población folicular, tasa de concepción, tipo de gestación y prolificidad. La información registrada se analizó utilizando procedimientos para datos categóricos, GLM y pruebas de Chi cuadrada como fue requerido. La distribución de celos presentó diferencias (**p=0.02**), con un incremento del número de ovejas que muestran celo en las primeras 30 h después del retiro del CIDR cuando fueron tratadas con 250 UI de α -tocoferol (78.95%), en comparación con las ovejas que recibieron 0 (52.94%) o 500 UI (66.67). La población folicular fue mayor (**p=0.09**) en ovejas tratadas con 250 UI de α -tocoferol (2.9 ± 0.26) en comparación con los animales tratados con 0 (2.3 ± 0.28) y 500 UI (2.5 ± 0.39). No se detectaron diferencias entre tratamientos (**p>0.05**) para el resto de las variables estudiadas. En conclusión la aplicación de 250 UI α -tocoferol mejoró la presentación del estro de ovejas Criollas.

Palabras clave: especies reactivas de oxígeno, población folicular, gestación, prolificidad.¹

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Blanca Estela Fuentes Romero
Director de Tesis: Raymundo Rangel Santos, Ph.D.

REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF CREOLE EWES TREATED WITH α - TOCOPHEROL DURING ESTRUS SYNCHRONIZATION

3.2 Abstract

Vitamin E plays an important role in reproduction. It decreases the presence of oxygen reactive species (ERO) that could reduce the fertility of females. The aim of the present study was to determine the effect of α -tocopherol administration during an estrus synchronization protocol on reproductive parameters of ewes. Sixty Creole ewes were randomly assigned to one of three treatments: 1) without treatment with α - tocopherol or control group; 2) treatment with 250 IU α - tocopherol; 3) 500 IU α - tocopherol. The experimental design was completely randomized with 20 replicates per treatment and the experimental unit was a ewe. For estrus synchronization, the ewes were provided with a controlled internal drug release (CIDR) device during 12 days and artificially inseminated 24 h after estrus detection. Pregnancy diagnoses were performed on days 35 and 50 post-insemination, and the number of lambs born was registered at lambing. The response variables were incidence of estrus, estrus distribution, onset of estrus, follicular population, conception rate, type of gestation and prolificacy. The information recorded was analyzed using procedures for categorical data, GLM and Chi square tests as required. Distribution of estrus showed differences (**p=0.02**), with an increased number of ewes showing estrus in the first 30 h after CIDR removal when treated with 250 IU of α -tocopherol (78.95%) compared to the control group (52.94%) or 500 IU treatment (66.67%). The follicular population was higher (**p=0.09**) in ewes treated with 250 IU of α -tocopherol (2.9 ± 0.26) compared to animals treated with 0 (2.3 ± 0.28) and 500 IU (2.5 ± 0.39). There were not detected differences (**p>0.05**) among treatments for the rest of the studied variables. In conclusion the administration of 250 IU of α -tocopherol improved the estrus presentation of Creole ewes.

Key words: α -tocopherol, reactive oxygen species, follicular population, pregnancy, prolificacy.

3.3 Introducción

La vitamina E es un potente antioxidante liposoluble, donde la forma α -tocoferol es el más disponible y de mayor actividad biológica (Brigelius-Flohe y Traber, 1999; Márquez *et al.*, 2002, Torres *et al.*, 2002); se encuentra en muchos tejidos corporales y es la más abundante en la membrana celular (Gibert, 2008), lo cual se debe a que es una molécula hidrofóbica (Rodríguez *et al.*, 2001).

La principal función de la vitamina E es prevenir el daño de la membrana por efecto de los radicales libres (Gibert, 2008). Por consiguiente el requisito de la vitamina E puede ser definida como la cantidad requerida para la prevención de la peroxidación de la membrana subcelular (Koyuncu y Yerlikaya, 2007).

La NRC (1985) recomienda 15 UI de vitamina E/kg de materia seca en ovejas en cualquier periodo, asumiendo que la cantidad de selenio es la adecuada en la dieta. Considerando hasta 75 UI/kg de peso corporal al día como una dosis presuntamente segura (NRC, 1987).

La vitamina E se almacena en el tejido adiposo principalmente, aunque no en concentraciones apreciables (Hatfield *et al.*, 2000). También se encuentra en órganos sexuales (Piñeiro, 2007).

Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones en cadena de radicales libres (Márquez *et al.*, 2002). Representa una de las primeras barreras de la peroxidación, ya que previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (Márquez *et al.*, 2002; Benítez, 2006), y neutraliza principalmente al radical hidroxilo (Rodríguez *et al.*, 2001).

Los radicales libres se forman como parte normal del metabolismo celular (Pérez y Pérez, 2000), en proporciones controlables en condiciones normales (Rodríguez *et al.*, 2002). Cuando se presenta un desequilibrio entre la acción de los agentes oxidantes y la respuesta antioxidante se produce el estrés oxidativo (Benítez, 2006). La vitamina E demostró ser eficaz en la prevención de la

peroxidación lipídica y en el manejo de otros eventos oxidativos (Brigelius *et al.*, 1999).

La vitamina E se puede encontrar en el folículo preovulatorio por lo que un aumento en la concentración de vitamina E reduce las especies reactivas de oxígeno (ERO) evitando el estrés oxidativo (Sönmez *et al.*, 2009), ya que el incremento de ERO puede comprometer el desarrollo folicular y la actividad ovárica (Liu *et al.*, 2014).

La acumulación de ERO generada en el estrés oxidativo produce apoptosis de los folículos antrales, las células de la granulosa y los ovocitos (Devine *et al.*, 2012). Además disminuye la concentración de glutatión, lo que provoca una ineficiente fecundación y posterior desarrollo embrionario.

La nutrición enfocada a la reproducción ovina es resultado de diversos ensayos que tienen como objetivo acercar a los animales a su potencial genético (Robinson *et al.*, 2002). Los autores hacen referencia a la importancia de identificar el punto crítico donde el suministro de nutrientes juega un papel fundamental, conocer los nutrientes y las respuestas inmediatas o posteriores que pudieran modificarse en los procesos reproductivos.

La importancia de la vitamina E en la reproducción de pequeños rumiantes nos condujo a su evaluación en ovejas Criollas sincronizadas.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de vitamina E en los parámetros reproductivos de ovejas Criollas sincronizadas.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Localización

El trabajo se realizó en el módulo de ovinos y caprinos de la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo. Localizada a 19° 32' de Latitud Norte y 98° 53' de Longitud Oeste, respecto del meridiano de Greenwich, la altitud promedio es de 2250 msnm. La fórmula climática es C(w)b(i')g correspondiente a un clima templado, el más seco de los subhúmedos con lluvias en verano, poca oscilación térmica y temperatura media anual de 15 °C, con una distribución tipo Ganges y precipitación promedio anual de 664.8 mm (García, 1988).

3.4.2 Animales

Se utilizaron 60 ovejas Criollas con un peso promedio de 48.9 (± 0.09) kg y una condición corporal de entre 3.0 y 3.5 en escala de 1 a 5, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a tres tratamientos.

3.4.3 Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos consistieron en la aplicación de tres dosis de α -Tocoferol vía intramuscular dos días antes de la remoción del CIDR. Las dosis fueron 0, 250 y 500 UI de α -tocoferol representando tres tratamientos (Cuadro 1). El producto empleado es α -tocoferol $\geq 95.5\%$ (equivalente a acetato de DL- α -tocoferol, PISA), utilizando como vehículo aceite de oliva extra virgen.

Cuadro 1. Dosis de α -Tocoferol (UI) y día de aplicación por tratamiento.

Tratamiento	Dosis de α -Tocoferol (UI)	Día de aplicación
1	0	Dos antes de retirar el CIDR
2	250	
3	500	

El diseño experimental fue un completamente al azar con 20 repeticiones en donde la unidad experimental fue la oveja.

3.4.4 Manejo alimenticio

La alimentación estuvo compuesta de una dieta base diaria por animal de 3 kg de alfalfa fresca y ensilado de maíz en una proporción 50:50, suplementada con 0.35 kg por animal de concentrado para ovejas en etapa reproductiva (ALBA, UACH®) con 16% de proteína, un mínimo de 4% de grasa un máximo de 8% de fibra y un máximo de 12% de humedad.

3.4.5 Sincronización de celos

La sincronización del celo en las ovejas se realizó colocando dispositivos intravaginales (CIDR por sus siglas en inglés **controlled internal drug release**, Pfizer) con 0.3 g de progesterona insertadas durante 12 días. En el día 10 (asignando el día cero al día de inserción del CIDR), se aplicaron 333 UI de gonadotropina coriónica equina (Folligon, Intervet) vía intramuscular más la dosis correspondiente, según el tratamiento de vitamina E, α -Tocoferol, vía intramuscular.

3.4.6 Detección de celos

La detección de celos se inició 24 h después del retiro de los dispositivos intravaginales, utilizando dos machos celadores provistos de mandil, cada 6 h

durante dos días. Con la finalidad de evitar error en la detección de celo por cansancio de los machos, estos se rotaron cada 20 animales.

3.4.7 Inseminación artificial

La inseminación artificial se realizó mediante laparoscopia 24 h después de detectado el celo; previo dietado por 12 h y se rasuró la región abdominal. Las ovejas se anestesiaron vía intravenosa con una mezcla de hidrocloreto de Xilacina al 2% (Procin, Pisa) y Ketamina (Anesket, Pisa) a una concentración de 0.02 mg/kg y 0.55 mg/kg, respectivamente. Posteriormente se colocó la oveja en la camilla en posición decúbito dorsal inclinada cranealmente.

La cavidad abdominal se insufló con CO₂, se realizó una primer punción con un trocar de 6 mm delante de la ubre y 3 a 4 cm laterales a la línea alba, por donde se introdujo un laparoscopio de 5 mm (Karl Storz, India). Se realizó una segunda punción del lado contrario por donde se introdujo mediante otra cánula una pistola de inseminación con el semen.

El semen se obtuvo de un semental Criollo con fertilidad comprobada, utilizando para la colecta una vagina artificial. La colección se realizó previa limpieza del prepucio para evitar la contaminación del semen. Una vez colectado el semen se evaluó al microscopio la motilidad y densidad del semen, se realizó la dilución del mismo, y se colocó a baño maría a 32 °C donde se hizo una segunda evaluación de la motilidad y densidad del semen.

La inseminación artificial se llevo a cabo utilizando pajillas de 0.25 mL de semen fresco diluido, cada dosis con una concentración espermática de 100 millones, aplicando media dosis a cada cuerno uterino (aproximadamente 50 millones de espermatozoides por cuerno). Al término de la inseminación se aplicó cicatrizante y antibiótico de amplio espectro (Pendiben, PISA) para prevenir infecciones.

3.4.8 Diagnóstico de gestación

El primer diagnóstico de gestación se realizó a los 35 días posteriores a la inseminación, para llevarlo a cabo se pusieron las ovejas en ayuno por 12 h. El diagnóstico se realizó con el animal en posición cuadrúpeda y se utilizó un ultrasonido rectal en tiempo real con un transductor lineal de 5 MHz (Prosound 2, Aloka Japón).

El segundo diagnóstico se llevó a cabo 15 días después. Los animales se pusieron en ayuno por 12 h, se colocaron las ovejas en posición sentada y se usó un transductor convexo de 3.5 MHz (Prosound 2, Aloka Japón).

3.4.9 Variables respuesta

- Incidencia de celos: número de ovejas que entraron en celo por tratamiento expresado en porcentaje.
- Inicio de celo: tiempo promedio transcurrido entre la remoción de los CIDR's y el inicio del estro.
- Distribución del estro: número de ovejas que entraron en estro a las 24, 30, 39, 53 y 60 h después de retirar los dispositivos, expresado en porcentaje.
- Población folicular: número de folículos entre 3 y 6.5 mm presentes en la superficie de los ovarios de cada oveja, contados mediante ultrasonografía antes de realizar la inseminación.
- Diámetro folicular: diámetro folicular promedio por tratamiento.
- Tasa de concepción: número de ovejas gestantes entre número de ovejas inseminadas, expresado en porcentaje.
- Tipo de gestación: número de ovejas que presentan gestaciones simples o múltiples expresado en porcentaje.

- Tasa ovulatoria: número de cuerpos lúteos promedio por tratamiento presentes en la superficie de los ovarios observados mediante laparoscopia dos días después del segundo diagnóstico de gestación.
- Prolificidad: número de corderos por oveja parida en cada tratamiento.

3.4.10 Análisis estadístico

En todas las variables respuesta se realizó la prueba de normalidad utilizando el procedimiento UNIVARIATE (SAS, 2013). Únicamente el diámetro folicular se analizó bajo el supuesto de que cuenta con distribución normal mediante GLM (SAS, 2013).

Las variables incidencia de celos, inicio de celos, población folicular, tasa de concepción y prolificidad se analizaron mediante modelos de datos categóricos (PROC CATMOD, SAS 2013).

En el caso de distribución de celo se utilizó una tabla de contingencia 3X5 y para tasa ovulatoria la tabla de contingencia fue de 3X3, y se evaluaron mediante pruebas de Chi cuadrada (SAS, 2013).

El modelo estadístico utilizado para las variables analizadas mediante modelos de datos categóricos (incidencia de celos, inicio de celos, población folicular, tasa de concepción y prolificidad) fue el siguiente:

$$\gamma_i = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 TRAT}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 TRAT}}$$

Donde:

γ_i = Variable respuesta registrada en la i-ésima oveja del i-ésimo tratamiento.

e = Base del logaritmo natural.

β_i = Coeficiente de regresión parcial: $i=0$ ordenada al origen, $i=1$ coeficiente asociado a tratamiento.

El modelo estadístico para el diámetro folicular fue:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = diámetro folicular de la i-ésima oveja en el i-ésimo tratamiento

μ = Media general.

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (i= 0 UI de α -Tocoferol, 250 UI de α -Tocoferol, 500 UI de α -Tocoferol).

ε_{ij} = Error experimental $\sim(0, \sigma_\varepsilon^2)$.

3.5 Resultados

3.5.1 Incidencia de celos

La incidencia de celos fue similar ($p=0.59$) entre las ovejas Criollas tratadas con 0, 250 y 500 UI de α -tocoferol al día 10 de iniciada la sincronización (Cuadro 2).

Cuadro 2. Incidencia de celos en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Número de ovejas		Ovejas en celo %
	Total	En celo	
0	20	17	85±0.08 ^a
250	20	19	95±0.05 ^a
500	20	18	90±0.07 ^a

Tratamientos con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p<0.05$).

3.5.2 Inicio de celo

Las ovejas Criollas tratadas con 0, 250 y 500 UI de α -tocoferol durante la sincronización no presentaron diferencia ($p=0.92$) en el tiempo promedio de inicio de celo después de remover el dispositivo intravaginal (Cuadro 3).

Las ovejas que recibieron 250 y 500 UI de α -tocoferol presentaron celo en promedio 1.5 h antes comparativamente con las ovejas que no recibieron α -tocoferol.

Cuadro 3. Inicio de celo en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Número de ovejas	Inicio de celo Horas ($\pm$ EE)
0	17	33.41 $\pm$ 0.30 ^a
250	19	32.37 $\pm$ 0.33 ^a
500	18	32.11 $\pm$ 0.24 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p<0.05$).

3.5.3 Distribución del celo

La distribución del celo fue diferente ($p=0.02$) entre tratamientos. El porcentaje de ovejas que mostraron celo en las primeras 30 h después de remover el CIDR fue mayor (78.95%) en las ovejas tratadas con 250 UI de α -tocoferol comparado con las ovejas que no recibieron α -tocoferol o que recibieron 500 UI (66.64% y 52.94%, respectivamente) (Figura 3).

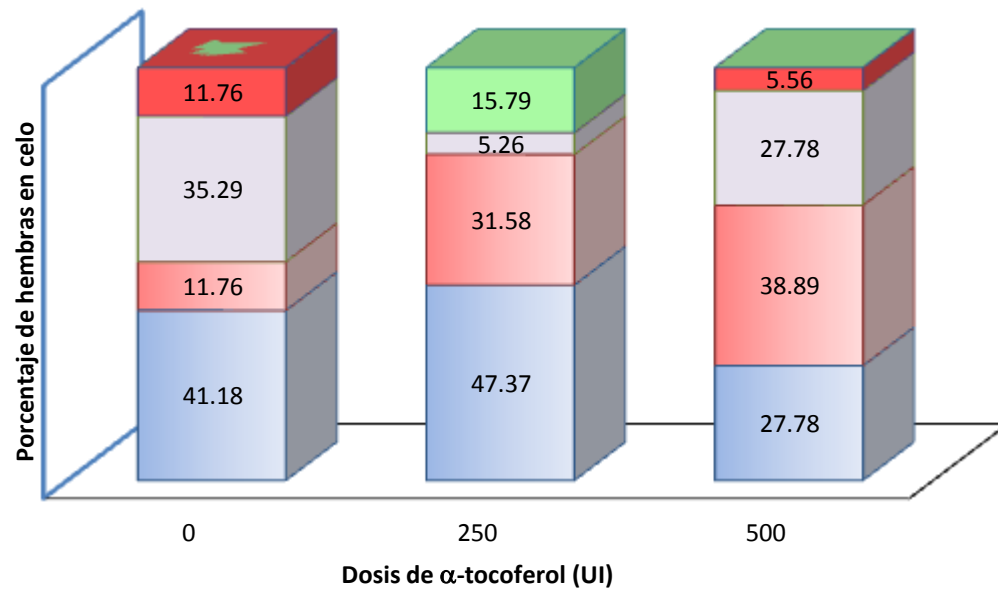


Figura 3. Distribución de celos (■ 24 h, ■ 30 h, ■ 39 h, ■ 53 h y ■ 60 h) en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

3.5.4 Población folicular

El número de folículos con diámetro entre 3 y 6.5 mm presentes en la superficie ovárica tiende ($p=0.09$) a ser mayor en las ovejas tratadas con 250 UI de α -tocoferol en comparación con el grupo control y las ovejas tratadas con 500 UI de α -tocoferol (Cuadro 4).

Cuadro 4. Población folicular promedio en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Número de ovejas	Número de Folículos Media ($\pm$ EE)
0	15	2.3 $\pm$ 0.28 ^a
250	15	2.9 $\pm$ 0.26 ^a
500	15	2.5 $\pm$ 0.39 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p<0.05$).

3.5.5 Diámetro folicular

El diámetro folicular no fue diferente ($p=0.41$) para los tres tratamientos (Cuadro 1), observando una media general en el estudio de 4.63 ± 0.04 mm.

Cuadro 5. Diámetro folicular promedio en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Número de ovejas	Diámetro de Folículos Media ($\pm$ EE)
0	15	4.83 ± 0.19^a
250	15	4.55 ± 0.24^a
500	15	4.51 ± 0.25^a

Medias con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p<0.05$).

3.5.6 Tasa de concepción

La tasa de concepción no fue diferente ($p=0.73$) entre tratamientos (Cuadro 6), aun cuando las ovejas que recibieron 500 UI de α -tocoferol presentaron una tasa de concepción en las ovejas Criollas 4.2 y 13.3 unidades porcentuales superior a la tasa de concepción de las ovejas tratadas con 0 y 250 UI α -tocoferol, respectivamente.

Cuadro 6. Tasa de concepción para ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Número de ovejas		Ovejas gestantes
	Inseminadas	Gestantes	%
0	13	9	69.2 ± 0.13^a
250	15	9	60.0 ± 0.13^a
500	15	11	73.3 ± 0.11^a

Tratamientos con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p<0.05$).

3.5.7 Tipo de gestación

El tipo de gestación de las ovejas Criollas gestantes fue similar ($p=0.87$) entre los tres tratamientos con α -tocoferol. Se observó una diferencia de 6.6 y 17.17 puntos porcentuales en las gestaciones múltiples de las hembras que recibieron 500 UI de vitamina E en comparación con las hembras tratadas con 0 y 250 UI de la vitamina E, respectivamente (Figura 4).

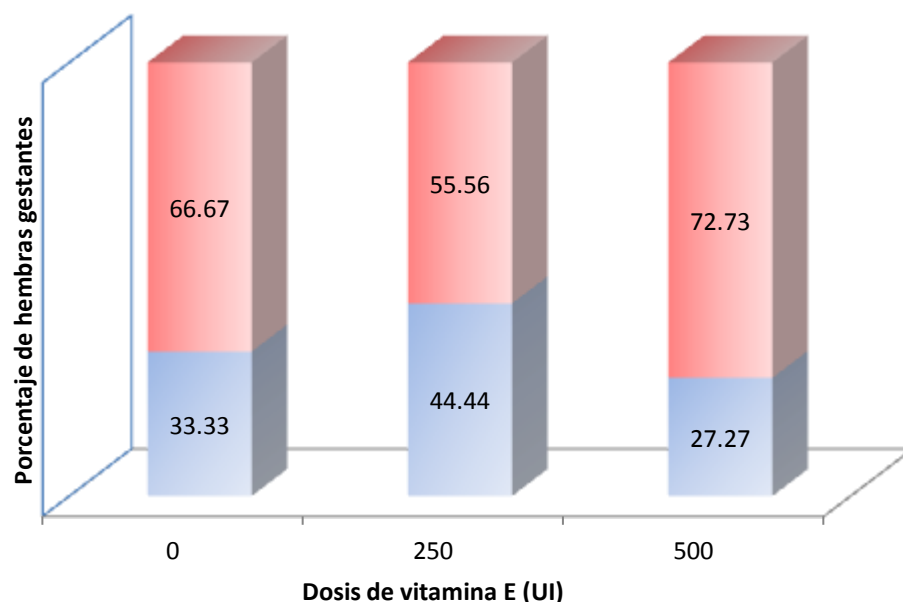


Figura 4. Tipo de gestación (■ simple, ■ múltiple) en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

3.5.8 Tasa ovulatoria

La tasa ovulatoria no presentó diferencias entre tratamientos ($p=0.97$), observando que el promedio de cuerpos lúteos presentes en la superficie de ambos ovarios fue similar en las ovejas tratadas con 0, 250 y 500 UI de α -tocoferol (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tasa ovulatoria en ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol durante la sincronización.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Número de ovejas	Número de CI Media ($\pm$ EE)
0	9	1.67 $\pm$ 0.30 ^a
250	9	1.78 $\pm$ 0.38 ^a
500	11	1.73 $\pm$ 0.46 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p < 0.05$).

3.5.9 Prolificidad

Los grupos de ovejas Criollas tratadas con diferentes dosis de α -tocoferol al día 10 de iniciada la sincronización fue similar ($p=0.59$) entre tratamientos. El número de corderos nacidos se presenta en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Prolificidad de ovejas Criollas tratadas con α -tocoferol.

Dosis de α -tocoferol (UI)	Ovejas gestantes	Número de corderos Media ($\pm$ EE)
0	9	1.56 $\pm$ 0.34 ^a
250	9	1.56 $\pm$ 0.34 ^a
500	11	1.44 $\pm$ 0.49 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna difieren significativamente ($p < 0.05$).

3.6 Discusión

El estrés oxidativo juega un papel importante en los procesos reproductivos (Aurousseau *et al.*, 2006), se presenta después de la introducción de ciertos fármacos o cuando la concentración de antioxidantes disminuye, lo que provoca un desequilibrio entre la acción de agentes oxidantes sobre las células y la

respuesta antioxidante de estas (Benítez, 2006), lo que origina el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Aurousseau *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo puede iniciar desde el momento de la sincronización del celo, debido a que esta técnica produce inflamación de la mucosa vaginal produciendo como efecto secundario la formación de radicales libres (Sönmez *et al.*, 2009); los cuales pueden producir peroxidación lipídica de las biomembranas, lo que constituye la esencia del daño en el estrés oxidativo (Benítez, 2006).

La producción de las ERO se incrementan sustancialmente de forma patológica (Rodríguez *et al.*, 2002), provocando reacciones en cadena (Márquez *et al.*, 2002). Por lo que se puede suponer que el estrés oxidativo se mantiene presente todo el tiempo que el dispositivo intravaginal que se usa para la sincronización de celos permanece dentro de la oveja.

En un estudio realizado en cabras tratadas con 200 UI de vitamina E vía intramuscular (Sönmez *et al.*, 2009), como en otro llevado a cabo en ovejas tratadas con 400 UI de vitamina E por vía oral (Mendoza, 2008), reportaron que el 100% de los animales entro en celo siendo mayor que en el presente estudio. Los autores mencionaron que la incidencia de celos estuvo más relacionada a la uniformidad en el protocolo de sincronización que a la aplicación de la vitamina.

El promedio del inicio del celo en el presente estudio es comparable al obtenido por Sönmez *et al.* (2009), quienes mencionaron que los resultados (31.0 ± 1.83) pudieron estar afectados por muchos factores externos como la nutrición o el uso de eCG. Los autores indicaron que la aplicación de vitamina E no representó ninguna ventaja significativa en adelantar el tiempo promedio de inicio del celo. Por otro lado, Mendoza (2008) reportó que todas las ovejas en su estudio presentaron signos de celo en las primeras 48 h después de retirar el progestágeno, lo cual fue atribuido al manejo reproductivo.

La distribución del celo en el presente estudio fue variable entre tratamientos. Se obtuvo un 78.95 % de ovejas en celo en las primeras 30 h, en comparación con un estudio realizado en ovejas Pelibuey que recibieron 0.77 mL de MuSe (equivalente a 3.8 mg de selenio y 52.3 UI vitamina E) dos días antes de retirar el CIDR, donde se obtuvo que la combinación del tratamiento más la aplicación de eCG fue donde se concentró el mayor número de ovejas en celo a las 36 h con un promedio de 81.1%, lo cual corresponde a 21.5% más que en los animales que sólo recibieron selenio y vitamina E (Fraire, 2010). El autor atribuyó la respuesta al efecto de la eCG la cual produce un incremento en la concentración de estrógenos, que al tratamiento de selenio y vitamina E.

Si se considera que los estrógenos son hormonas esteroideas hidrofóbicas de naturaleza lipídica (García, 2009) y que los radicales libres pueden generar oxidación de estas, se puede considerar que al aplicar α -tocoferol puede reducir la oxidación de estos compuestos lipídicos secuestrando los radicales libres o interrumpiendo su formación (Márquez *et al.*, 2002; Benítez, 2006), permitiendo que los niveles de estrógenos se mantengan en concentraciones altas lo que produciría que el celo se presenta en un menor tiempo.

El incremento de las ERO pueden comprometer el desarrollo folicular y la actividad ovárica (Liu *et al.*, 20014), siendo los folículos antrales, las células de la granulosa y los ovocitos los más sensibles al estrés oxidativo provocando la apoptosis de estos (Devine *et al.*, 2012).

El daño celular se da en parte porque los radicales libres provocan envejecimiento de las células lo que origina una secuencia de errores a nivel intracelular que al acumularse producen una célula defectuosa o muerte de la misma (Karp, 1990).

Otra causa puede ser que el incremento de especies reactivas de oxígeno desestabilizan la estructura y función de la célula y de sus organélos, lo que activa la señalización de estas células defectuosas provocando su autodestrucción (Benítez, 2006).

El estrés oxidativo también disminuye la concentración de glutatión, lo que provoca que no se lleve a cabo de forma eficiente la fecundación y el posterior desarrollo del embrión. (Devine *et al.*, 2012).

Al aplicar α -tocoferol se considera que su función básica a nivel folicular es prevenir el daño de la membrana por efecto de los radicales libres, realizando la protección intrainorgánica (Gibert, 2008) al interrumpir las reacciones en cadena de los ERO (Márquez *et al.*, 2002), lo que es importante para mejorar la calidad de los ovocitos y facilitar la maduración meiótica del cúmulo-ovocito (Sönmez *et al.*, 2009).

También puede ser de cierta importancia como factor estimulante o inhibitorio para el reclutamiento y la selección del folículo dominante (Schweigert y Zucker, 1988). El efecto que se obtiene de la aplicación de α -tocoferol es influenciado por varios aspectos tanto de la vitamina como de la oveja.

En el caso de la vitamina se tiene que si bien la aplicación de vitamina E vía intramuscular permite alcanzar concentraciones sistémicas más altas en un menor tiempo, su duración en el organismo es más corta (Hatfield *et al.*, 2000); además la concentración de vitamina E en sangre (2mg/mL), cuando se aplican 200 mg de vitamina E (Sönmez *et al.*, 2009), es mayor a la que se encuentra en el líquido folicular (0.09-1 μ g/mL), lo cual se atribuye a la transferencia pasiva de estas sustancias a través de la membrana celular (Schweigert and Zucker, 1988).

El diámetro folicular encontrado puede ser resultado de la sincronización del estro utilizando CIDR y eCG ya que esta combinación incrementa la cantidad de folículos reclutados, aumentan el diámetro folicular y la tasa de crecimiento de los folículos grandes (Uribe-Velázquez *et al.*, 2008).

Dentro de los aspectos de la ovejas que pueden influir en la efectividad de la aplicación de la vitamina E, son los patrones en el desarrollo folicular que presentan las ovejas, ya que tienen una alta variabilidad en el número de

folículos que se desarrollan en cada onda y en cada ciclo, considerando que el folículo dominante y el subordinado, los cuales pueden alcanzar un diámetro de 5-7 mm y de 3-5 mm, se pueden desarrollar en la última o en la penúltima onda (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

De aquí la importancia de identificar el punto crítico en el desarrollo, en donde el suministro de nutrientes juega un papel fundamental en la expresión de las respuestas inmediatas y posteriores que afectan los procesos reproductivos (Robinson *et al.*, 2002), pero también la dosis de α -tocoferol ya que la cantidad requerida es aquella necesaria para prevenir de la peroxidación de la membrana subcelular (Koyuncu y Yerlikaya, 2007).

Por lo que se puede suponer que el efecto de la aplicación de α -tocoferol no fue el esperado debido no se ha encontrado el punto exacto de aplicación que permita al organismo responder de la forma más óptima deseada.

Los resultados del presente estudio en cuanto a tasa de concepción son mayores en las ovejas tratadas con 500 UI de vitamina E a los reportados por Sönmez *et al.* (2009) en un estudio realizado en cabras donde se obtuvo una tasa de concepción de 66.7% en el grupo tratado con vitamina E. Resultados similares reportó Mendoza (2008) en ovejas primerizas tratadas con 400 UI de vitamina E vía oral, donde obtuvo un 62% de hembras gestantes sin obtener diferencias con los tratamientos con selenio ($0.2 \text{ ppm kg}^{-1} \text{ alimento día}^{-1}$) o con una mezcla de selenio y vitamina E a la misma dosis.

El porcentaje de gestaciones múltiples es similar al realizado por Sönmez *et al.* (2009) donde encontraron que la aplicación de 200 UI de vitamina E durante el periodo preovulatorio en cabras mejora la tasa de nacimientos múltiples (70%), lo cual fue asociado a una disminución en la concentración de especies reactivas de oxígeno durante el periodo preovulatorio por efecto de la vitamina E.

Márquez *et al.* (2001) mencionaron que los radicales libres producidos en el cuerpo lúteo durante la síntesis de progesterona pueden estimular los procesos de peroxidación lipídica de las membranas celulares lo que contribuye al inicio de la regresión luteal.

La tasa de ovulación también se puede ver afectada por una nutrición inadecuada, la cual puede causar ciclos irregulares, reducción de la ovulación y crías débiles (Petrovic *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Raasch *et al.* (1997) se comparó la respuesta reproductiva en ovejas Hampshire y Suffolk aplicando vía parenteral vitamina E, A y su combinación por 14 días, no observando diferencias en la tasa ovulatoria.

De acuerdo a los autores, influir en rasgos reproductivos con inyecciones de vitamina E y A cuando se tiene a los animales en pastoreo es difícil, ya que las concentraciones de vitamina E principalmente, no se pueden mantener constantes.

Sönmez *et al.* (2009) en cabras obtuvieron una prolificidad de 2.4 ± 0.37 para las hembras tratadas con dos dosis de 500 UI de vitamina E y 1.63 ± 0.26 para el grupo control sin obtener diferencias significativas.

Fraire (2010) plantea que como la vitamina E y el selenio actúan a nivel de membrana celular protegiéndola del daño oxidativo, se tiene óvulos de mejor calidad para ser fecundados, pero no se incrementa la prolificidad. En presente estudio se obtuvo una media general en la prolificidad de 1.61 ± 0.07 , sin encontrarse diferencias significativas.

3.7 Conclusión

La aplicación de α -tocoferol durante la sincronización de celos de ovejas Criollas sólo afectó la incidencia de celos en las primeras 30 h en las ovejas tratadas con 250 UI de α -tocoferol.

3.8 Literatura citada

- Aurousseau, B, D. Gruffat, and D. Durand. 2006. Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reproduction Nutrition Development* 46(6): 601-620.
- Benítez Z., D. E. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 25(2): 8 p.
- Brigelius-Flohe, R., and M. G. Traber. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(6): 1145-1155.
- Devine, P. J., S. D. Perreault, and U. Luderer. 2012. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. Minireview. *Biology of Reproduction* 86(2): 1-10.
- Fraire C., Silvia. 2010. Selenio y vitamina E en la fertilidad de ovejas pelibuey sincronizadas con progesterona. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. México. 82 p
- García, E. 1998. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 217 p.
- García, Y. C. 2009. Receptores de estrógeno: estructura, mecanismo de acción y su relación con en el desarrollo de embriones de mamíferos en la etapa de preimplantación. *Boletín Médico de Postgrado*. Vol. XXV Edición Especial. Venezuela. 18 p.
- Gibert, P. M. 2008. Selenio y vitamina E. *Suplemento Rural*. Uruguay. 12 p.
- Gimenez, D. M. 1994. Nutrient Requirements of Sheep and Goats. Extension Animal Scientist. U.S. 8 p.

- Hatfield, P. G., J. T. Daniels, R. W. Kott, D. E. Burgess, and T. J. Evans. 2000. Role of supplemental vitamin E in lamb survival and production: A review. *Journal Animal Science* 77(E suppl.): 1-9. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/77/e-suppl/JAN0770ES01aa?search-result=1>. Consultada el 7 de febrero de 2014.
- Karp, G. 1990. *Biología Celular*. Editorial McGraw-Hill. México. p 854.
- Koyuncu M., and H. Yerlikaya. 2007. Effect of selenium-vitamin E injections of ewes on reproduction and growth of their lambs. *South African Journal of Animal Science* 37(3): 233-236.
- Liu, S., D. Masters, M. Ferguson, and A. Thompson. 2014. Vitamin E status and reproduction in sheep: potential implications for Australian sheep production. *Animal Production Science* 54(6): 694-714
- Márquez, M., C. E. Yépez, R. Sutil-Naranjo, y M. Rincón. 2002. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Investigación Clínica* 43 (3): 21 p.
- Márquez, Y.C., S. Ferraro, y A. López-Ortega. 2001. Concentración de malondialdehído en cuerpo lúteo bovino. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*. Volumen especial: 79-85.
- Mendoza A., E. A. 2008. Suplementación de selenio y vitamina E en borregas primerizas y sus efectos en variables reproductivas en periodo de anestro estacional. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. México. 78 p.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep* 6th rev. ed. Natl. Acad. Press. Washington, D.C.
- NRC. 1987. *Vitamin Tolerance of Animals*. Natl. Acad. Press. Washington, D.C.

- Pérez, P. L., y J. L. Pérez. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médico Militar* 29(3): 192-198.
- Petrovic, M. P., V. Caro Petrovic, D. Ruzic Muslic, N. Maksimovic, Z. Ilic, B. Milosevic, and J. Stojkovic. 2012. Some important factors affecting fertility in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry* 28(3): 517-528.
- Piñeiro, E. 2007. Vitamina E y fertilidad. 3 p. http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/embarazo_y_lactancia/2007/11/08/171554.php. Consultada el 24 de noviembre de 2013.
- Raasch, G. A., D. G. Morrical, and C. R. Youngs. 1997. Effect of supplemental Vitamin E and A on reproductive performance and serological profiles of ewes managed in drylot. *Sheep Research Report*. 9 p. http://lib.dr.iastate.edu/sheepreports_1997/9. Consultada el 2 de abril de 2015.
- Robinson, J. J., J. A. Rooke, and T. G. McEvoy. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. *In: Sheep Nutrition*. Freer M and Dove H. (Eds). CAB International. Australia. pp: 189-211.
- Rodríguez P., J. M., J. R. Menéndez L., y Y. Trujillo L. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* 30(1): 15-20.
- SAS Institute Inc. 2013. *SAS/SAT 9.3 User's Guide*. SAS Institute. Cary, N. C. USA. 5180 p.
- Schweigert, F. H., and H. Zucker. 1988. Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *Journal of Reproduction and Fertility* 82(2): 575-579.
- Sönmez, M., T. Bozkurt, G. Türk, S. Gür, M. Kızıl, and A. Yüce. 2009. The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive

performance of goats following estrous synchronization using intravaginal sponges. *Animal Reproduction Science* 114(8): 183-192.

Torres, M., M. Márquez, R. Sutil, C. de Yépez, M. Leal, M. Muñoz, y M. E. Gómez. 2002. Aspectos farmacológicos relevantes de las vitaminas antioxidantes (E, A y C). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* (online) 21(1): 22-27. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000100005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0798-0264. Consultada el 23 de abril de 2014.

Uribe-Velásquez, L. F., E. Oba, M.I.L. Souza. 2008. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivo Médico Veterinario* 40(1): 83-88.

Uribe-Velásquez, L. F., A. Correa-Orozco, y Osorio J. H. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud* 8(1): 117-131.