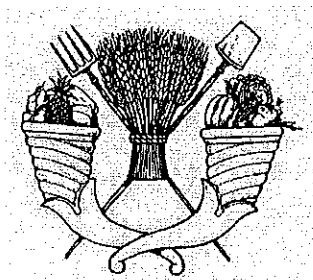


DR. RANGEL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia

**EFFECTO DE RAZA EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE
OVEJAS SUPEROVULADAS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

ALFREDO RODRÍGUEZ MORENO



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**



Octubre de 2004

Chapingo, Estado de México

EFFECTO DE RAZA EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE OVEJAS SUPEROVULADAS

Tesis realizada por **Alfredo Rodríguez Moreno** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

DIRECTOR: Raymundo Rangel S.

Ph. D. Raymundo Rangel Santos

ASESOR: Raymundo Rodríguez de Lara

Ph. D. Raymundo Rodríguez de Lara

ASESOR: Carlos Sánchez del Real

M. C. Carlos Sánchez del Real

DEDICATORIAS

La presente tesis la dedico principalmente a la persona quien me dio la vida, ese ser maravilloso quien me diera el cariño, su atención y sus conocimientos para iniciarme en el camino que actualmente me encuentro, con mucho cariño a mi madre Gloria Moreno R.

A quienes ahora forman mi familia y de quienes he recibido solo lo mejor:

Mi esposa, Maribel García Reyes, por su apoyo incondicional y por su comprensión para poder llevar a término esta etapa en mi vida.

Mis hijos Aarón Sebastián y Abigail Isela, gracias a ellos comprendí la frase “cunado un hijo sujeta con fuerza a su padre del dedo meñique ha comprendido que lo tiene atrapado para siempre”.

A mis hermanos Victor Manuel y Gabriela Lucia, quienes con el objetivo de cumplir sus ideales se encuentran lejos de la familia, sin embargo, siempre estuvieron presentes con su apoyo moral, así como a Mario y J. Rodolfo los menores, que no por ser los últimos dejan de ser importantes, ánimo carnales que tienen toda la vida por delante.

A mis colegas de generación Juan Noguez Estrada y Socorro Medina Lara, por compartir parte de su vida conmigo y por el mutuo apoyo que nos brindamos durante el tiempo que estuvimos juntos. Así como a los nuevos colegas que tuve oportunidad de conocer dentro del Posgrado, Constantino “Tino” y Dolores “Lolys” y a todos mis familiares y amigos que no mencioné pero que sin duda influyeron directa e indirectamente para que se concluyera la presente tesis.

Alfredo

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a *Dios* por permitirme llegar con bien hasta el día de hoy.

A la Universidad Autónoma Chapingo por su enorme generosidad y por todas las facilidades para realizar otra fase de preparación académica en mi vida y por ser para mí mi segunda casa.

Al Posgrado en Producción Animal del Departamento de Zootecnia por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Ph. D. Raymundo Rangel Santos por la dirección de la presente tesis y por permitirme compartir parte de su amplia visual del mundo de la reproducción animal.

Al Ph. D. Raymundo Rodríguez de Lara por su entusiasmo transmitido y por su actitud optimista para salir adelante con la presente tesis.

Al M. C. Carlos Sánchez del Real por las observaciones precisas que me realizó para concluir ésta tesis de la mejor manera.

Alfredo

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre: Alfredo Rodríguez Moreno
Fecha de nacimiento: 10 de mayo de 1974
Lugar de nacimiento: Coatzingo, Matamoros, Puebla.
Profesión: Ingeniero Agrónomo Zootecnista

FORMACIÓN ACADÉMICA

1979-1985	Escuela Primaria "Revolución" Chicoloapan, Estado de México.
1986-1988	Secundaria Oficial No. 397 "Lic. Jesús Reyes Heróles", Chicoloapan; Estado de México.
1989-1992	Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
1992-1996	Licenciatura en el Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México
2002-2003	Maestría en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.

EXPERIENCIA PROFESIONAL

1997-2001	Personal técnico del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), responsable del campo experimental y de transferencia de tecnología "Ex Hacienda San Miguel Ixtapan", Tejupilco, Edo. de Méx.
------------------	---

ÍNDICE

Contenido	Página
LISTA DE CUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
CAPÍTULO 2	6
REVISIÓN DE LITERATURA	7
1. CICLO ESTRAL	7
1.1. Fisiología del ciclo estral	8
1.2. Foliculogénesis.....	10
2. DINÁMICA FOLICULAR	11
2.1. Poblaciones de folículos	12
2.2. Ondas foliculares	12
2.3. Reclutamiento y Selección.....	14
2.4. Dominancia folicular	16
2.5. Dinámica folicular en anestro	17
3. SINCRONIZACIÓN ESTRAL	18
3.1. Utilización de acetato de fluorogestona (FGA)	19
3.2. Utilización de acetato de medroxiprogesterona (MAP)	20
3.3. Dispositivos intravaginales de liberación controlada internamente (CIDR)	20
3.4. Utilización de implantes subcutaneos	21
3.5. Utilización de prostaglandinas.....	22
4. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA	22
4.1. Raza	23
4.2. Edad	23
4.3. Gonadotropina utilizada	24
4.4. Época del año	26
5. ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN.....	28
5.1. Utilización de ácidos grasos polinsaturados (AGPI)	28
5.2. Presencia de Cuerpo Lúteo (CL).....	28
5.3. Remoción del folículo dominante	29
5.4. Superovulación al inicio de la primera onda folicular	29
5.5. Utilización de hormona del crecimiento (rGH).....	29
LITERATURA CITADA.....	31
CAPÍTULO 3	41
EFFECTO DE RAZA EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE OVEJAS SUPEROVULADAS.....	43
RESUMEN	43
ABSTRACT	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47

1. Animales, manejo y tratamiento	47
2. Variables evaluadas	48
3. Análisis estadístico	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1. Tasa de ovulación.....	49
2. Tasa de embriones recuperados	51
3. Embriones transferibles	53
CONCLUSIÓN	56
LITERATURA CITADA.....	57

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Tasa de ovulación (TO) en tres razas ovinas superovuladas.....	50
Cuadro 2. Tasa de recuperación embrionaria (TRE) en tres razas ovinas superovuladas.....	52
Cuadro 3. Embriones transferibles (ET) en tres razas ovinas superovuladas.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fisiología del ciclo estral ovino.....	9
Figura 2. Desarrollo folicular preovulatorio en ovejas.....	14

RESUMEN

EFFECTO DE RAZA EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE OVEJAS SUPEROVULADAS

Rodríguez M. A., Rangel S. R., Rodríguez de L. R. y Sánchez del R. C.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la raza de la donadora en la tasa de ovulación, la tasa de recuperación embrionaria y la cantidad de embriones transferibles en ovejas superovuladas. Se utilizaron un total de 51 ovejas donadoras de tres grupos raciales (24 Dorper, 18 Charollais y 9 East Friesian), las cuales fueron superovuladas de marzo a diciembre de 2002. Las ovejas se sincronizaron con esponjas intravaginales, conteniendo 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA; Chronogest, Intervet®), manteniéndose por 12 días junto con 75 µg de prostaglandina F2α (Prosolvin C, Intervet®) por donadora, aplicada el día 10, considerando como día 0 el día de la inserción de la esponja. La superovulación consistió de ocho dosis decrecientes (50, 50, 40, 40, 30, 30, 20 y 20 mg) de FSH (Folltropin, VetrepHarm®, dosis total = 280 mg), por donadora vía intramuscular, aplicadas a intervalos de 12 horas, iniciando el día 10, 60 h antes de retirar la esponja y terminando 24 h después de su retiro. Las ovejas fueron inseminadas intrauterinamente por laparoscopia utilizando semen fresco de sementales de la misma raza que las donadoras y de fertilidad conocida. La recolección embrionaria se realizó el día 7 después del celo, al mismo tiempo se determinó la tasa de ovulación por laparotomía media ventral. Los embriones fueron evaluados por características morfológicas. Se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre la raza Charollais y Dorper (18.16 ± 0.99 vs 10.70 ± 0.86 cuerpos lúteos) en la tasa de ovulación, sin diferencias ($P > 0.05$) en la tasa de ovulación entre las razas Charollais y East Friesian (18.16 ± 0.99 vs 14.44 ± 1.41), ni entre las razas East Friesian y Dorper (14.44 ± 1.41 vs 10.70 ± 0.86). La tasa de recuperación embrionaria no mostró diferencias significativas entre las tres razas evaluadas (Charollais, 75.76 ± 8.6 ; Dorper, 63.61 ± 7.5 ; East Friesian 56.09 ± 12.2). El número de embriones transferibles fue superior ($P < 0.05$) en ovejas Charollais (11.5 ± 0.70) comparativamente con ovejas Dorper (3.1 ± 0.67), sin embargo, no existió diferencia ($P > 0.05$) entre las razas Charollais y East Friesian (11.5 ± 0.70 vs 6.0 ± 0.79), así como entre las razas East Friesian y Dorper (6.0 ± 0.79 vs 3.1 ± 0.67). Los resultados muestran diferencias entre razas en su capacidad de respuesta al tratamiento de superovulación utilizado.

Palabras clave: razas ovinas, superovulación, embriones.

ABSTRACT

Alfredo Rodríguez Moreno

EFFECT OF BREED ON EMBRYO PRODUCTION IN SUPEROVULATED EWES

(SEPTEMBER 2004)

(Under the direction of Ph. D. Raymundo Rangel Santos).

The objective of the study was to evaluate the effect of donor breed on ovulation rate, embryo recovery rate, and number of transferable embryos in superovulated ewes. Fifty one ewes from three breeds (24 Dorper, 18 Charollais and 9 East Friesian) were superovulated from March to December of 2002. The ewes were synchronized with vaginal sponges containing 40 mg of fluorogestone acetate (FGA; Chronogest, Intervet) inserted for 12 days together with 75 µg of prostaglandins (Prosolvin, Intervet) per donor administered on day 10, considering as day 0 the day of sponge insertion. The FSH for superovulation was administered every 12 hours during 4 days through 8 intramuscular injections in a descending protocol (50,50,40,40,30,30,20, and 20 mg). The treatment started on day 10, 60 hours before sponge removal and finished 24 hours after. The ewes were inseminated by laparoscopy with fresh semen from a ram of the same breed of the donor with known fertility. Embryo recovery was attempted on day 7 after estrus and ovulation rate was determined through mid ventral laparotomy at the same time. The embryos were evaluated taking into consideration morphological characteristics. There were significant differences ($P<0.05$) in the ovulation rate between Charollais and Dorper ewes (18.16 vs 10.70), but the differences were not significant ($P>0.05$) between Charollais and East Friesian ewes (18.16 vs 14.44) or between East Friesian and Dorper (14.44 vs 10.70) ewes. There were no significant differences in embryo recovery rate between the three breeds considered (Charollais, 75%; Dorper, 63%; East Friesian 56%). The number of transferable embryos was higher ($P<0.05$) in Charollais (11.5) compared with Dorper ewes (3.1), however, there were no significant differences between Charollais and East Friesian ewes (11.5 vs 6.0), or between East Friesian and Dorper ewes (6.0 vs 3.1). The results showed differences between breeds in the response to the superovulatory treatment administered.

Key words: sheep breeds, superovulation, embryos.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las tecnologías de reproducción asistida tales como la inseminación artificial (IA) y la Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones (OMTE), han sido introducidas en la ganadería ovina para superar las ineficiencias reproductivas y acelerar la ganancia genética (Cognié *et al.*, 2003). El procedimiento de superovulación seguido por la recuperación de embriones y la transferencia a receptoras apropiadamente sincronizadas, ha demostrado ser un medio efectivo para incrementar la contribución de hembras superiores a la población de genes del resto de hato (Ishwar y Memon, 1996). Algunas de las ventajas de utilizar la transferencia de embriones son: obtener un gran número de progenie de hembras genéticamente superiores, facilitar la introducción de razas exóticas, rescatar especies en peligro de extinción, oportunidad para probar la progenie de hembras, minimizando el riesgo de introducir enfermedades exóticas, minimizando el costo y eliminando el estrés del transporte en animales.

El principal objetivo de la superovulación es producir un gran número de embriones viables por donadora de manera consistente (D'Alessandro *et al.*, 1996). Sin embargo, en la producción de embriones a nivel comercial, a pesar de mejorar el manejo animal así como el uso de gonadotropinas y los protocolos de utilización de las mismas, se presenta una alta variabilidad en la respuesta a los tratamientos de superovulación entre animales y a un mismo tratamiento, lo cual no ha podido ser evitado (Cognié, 1999). El alto grado de variabilidad ha sido asociado a diferentes factores entre los cuales se han reportado el efecto de la raza (Armstrong y Evans, 1983; Torres *et al.*, 1987; Boscos *et al.*, 1997; Vivanco, 1998), la edad de la donante (Armstrong y Evans, 1983; Rangel-Santos *et al.*, 1991; Forcada *et al.*, 2000), el tipo de gonadotropina utilizada (Moor *et al.*, 1985; D'Alessandro *et al.*, 1996; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002b) así como la época del año en que se administran los tratamientos de superovulación (Greaney *et al.*, 1991; Fucui *et al.*, 1994).

Algunos factores intrínsecos también han sido relacionado con la alta variabilidad, como es el caso del número de folículos en desarrollo (2-3 mm) presentes en el ovario al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000; 2002a), así como la presencia de un folículo grande (≥ 6 mm) al inicio del tratamiento. El ovario de una oveja adulta contiene entre 12,000 y 86,000 folículos primordiales y entre 100 y 400 folículos en crecimiento, de los cuales 10 a 40 son visibles en la superficie del ovario (Cahill *et al.*, 1979). Sin embargo, en la especie ovina, al final de cada ciclo estral ovulan de 1 a 3 folículos. El 99% de los folículos que potencialmente podrían ovular y llegar a formar una cría se están “desaprovechando” de manera natural, ya que mueren por atresia.

La implementación de un programa de OMTE puede rescatar y potencializar el recurso antes mencionado y con ello lograr una mayor descendencia de un animal donante, sobre todo si se desea multiplicar ovejas de razas exóticas, las cuales debido a que provienen del extranjero se incrementa considerablemente su valor, como es el caso de ovejas de las razas Dorper, East Friesian y Charollais. La demanda de dichas razas se ha incrementado considerablemente en la última década, sin embargo, su precio se ha conservado considerablemente alto. La puesta en marcha de un programa masivo para multiplicar el material genético requiere primeramente de generar información en relación a la respuesta ovulatoria, así como a la calidad embrionaria factible de obtener en cada raza, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la raza de la donadora en las variables tasa de ovulación, tasa de recuperación embrionaria y la producción de embriones transferibles en ovejas superovuladas.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

1. CICLO ESTRAL

El intervalo entre el inicio de un periodo de estro o “celo” hasta el inicio del siguiente se conoce como ciclo estral, considerando como estro al periodo de receptividad sexual de la hembra (Frandsen y Spurgeon, 1995). En la fase luteal, la prostaglandina F2 α secretada por el útero, induce en la hembra no gestante la regresión del cuerpo lúteo. El descenso en la concentración plasmática de la progesterona que refleja la luteolisis, provoca una disminución en la inhibición en el eje hipotálamo-hipofisiario activando el ciclo (Baril *et al.*, 1995).

La entrada a la pubertad significa el principio de la actividad reproductiva y está determinada en la hembra por la aparición de la primera ovulación y el primer incremento de progesterona plasmática (Foster *et al.*, 1995). A partir de la pubertad, las hembras desarrollan su capacidad para producir gametos funcionales de forma cíclica cada 17 días o en un rango de 16 a 18 días (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1999) durante su vida reproductiva. La oveja presenta una época reproductiva caracterizada por una sucesión de ciclos estrales, alternándose con una época de anestro, en la cual no hay ovulación (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1999). Durante un ciclo estral se producen de forma continua los procesos de crecimiento y desarrollo folicular, los cuales tienen como objetivo la formación y liberación de gametos maduros. Estos procesos están determinados por la diferenciación del ciclo sexual en dos fases, folicular y luteal. La fase folicular tiene una duración de 2 a 3 días y es caracterizada por la exhibición del comportamiento estral, precedido por el aumento en la concentración de estradiol-17 β secretados por los folículos en crecimiento (Baril *et al.*, 1995), el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) y la ovulación (Gordon, 1997), mientras que la fase luteínica dura de 14 a 15 días y se caracteriza por la producción de progesterona del cuerpo lúteo. En general, en ovejas de lana el comportamiento de la ciclicidad estral aparece a finales del verano o inicio de otoño y finaliza durante el invierno o al inicio de la primavera (Ortavant *et al.*, 1985).

En el momento de la ovulación, los ovocitos son capturados por el infundíbulo y se trasladan a la ampolla tubárica donde tiene lugar la fecundación. El huevo se divide después en dos blastómeros, cuya segmentación se produjo en el tránsito del embrión dentro del oviducto continuando después en el útero. El paso del embrión del oviducto al útero tiene lugar a los cuatro días de la aparición del estro, encontrando la mórula en el estadio de 16 células, denominado mórula joven. En los días quinto y sexto, los blastómeros más numerosos se acumulan dando un aspecto compacto al embrión, denominado “mórula compacta”. El diámetro del embrión es aproximadamente de 150 μm en ese momento. Del sexto al séptimo día aparece una cavidad (blastocelo), las células se diferencian, el embrión se convierte entonces en un blastocisto temprano. El tamaño del blastocelo aumenta, produciéndose la desaparición del espacio perivitelino y un aumento del diámetro del embrión que alcanza en ese momento el estadio de “blastocisto expandido”. En este estadio, las células del trofoblasto que producirán después las membranas fetales se sitúan en la periferia del blastocelo y una masa celular situada en uno de los polos del embrión constituirá el botón embrionario a partir del cual será formado el embrión. Al finalizar la fase de expansión (8º día), se producen contracciones periódicas en el blastocisto. La zona pelúcida muy debilitada se fisura y permite en ese momento la salida del embrión. Después de ser liberado de la zona pelúcida, el embrión aumenta de tamaño para llegar a un diámetro de 500 μm en el décimo día; posteriormente entra a una fase de elongación. En este estadio el trofoblasto produce numerosas proteínas, entre ellas la trofoblastina que se opone a la actividad luteolítica de la prostaglandina $\text{F2}\alpha$. El mantenimiento de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, permitirá la implantación del embrión a partir de los 14-16 días produciéndose la gestación (Baril *et al.*, 1995).

1.1. Fisiología del ciclo estral

El ciclo estral se caracteriza por una serie de eventos fisiológicos, netamente hormonales. El pico preovulatorio de GnRH/LH provoca la ovulación, inmediatamente después el cuerpo lúteo se desarrolla, liberando progresivamente progesterona. En la

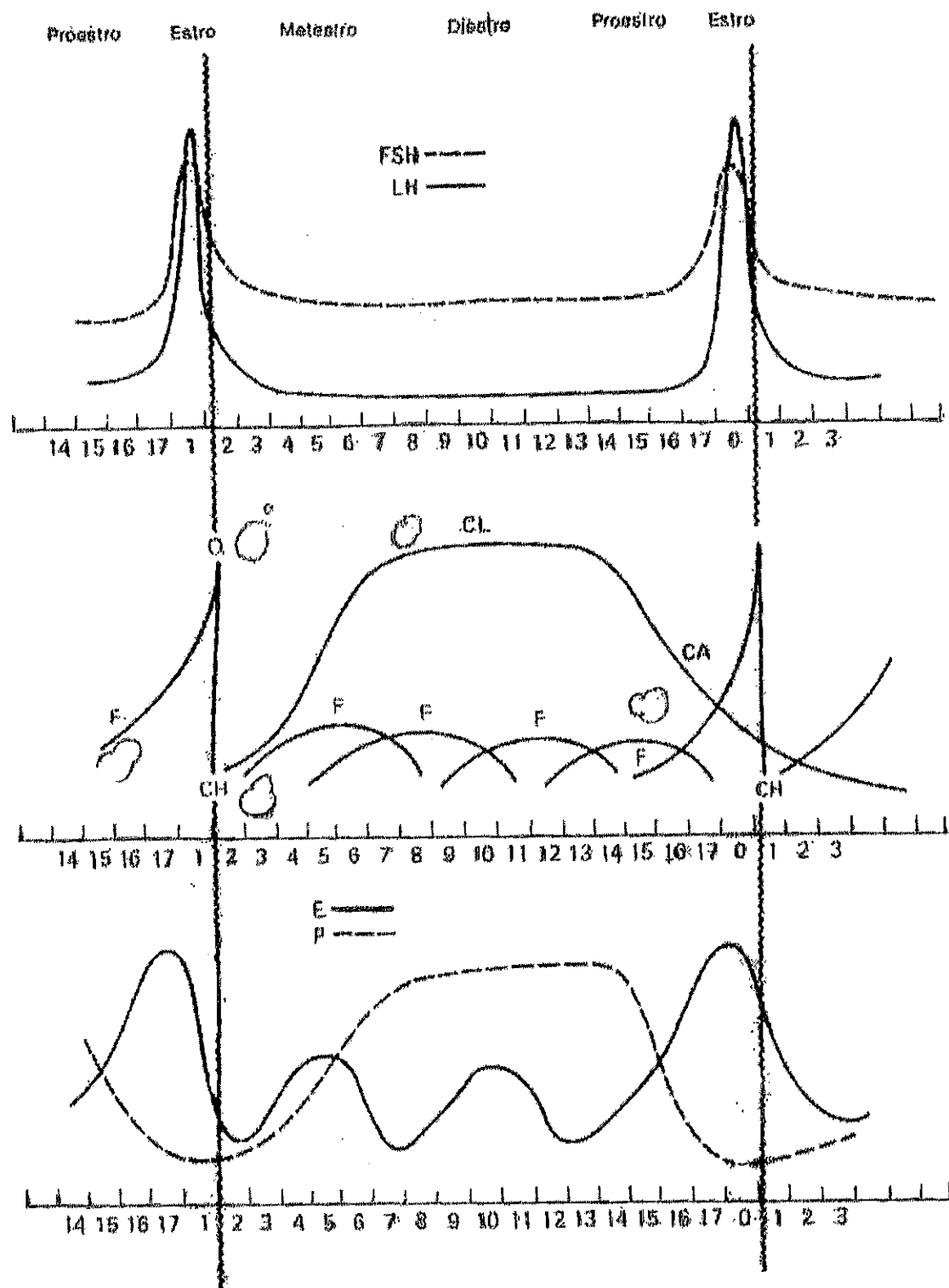


Figura 1. Fisiología del ciclo estral ovino (Pant *et al.*, 1972).

mitad de la fase lútea, la progesterona circulante inhibe la frecuencia de secreción de los pulsos de LH (secreción tónica 1-4 pulso/24h) mientras que al final de la fase lútea, cuando da inicio la luteólisis por efecto de la acción de la prostaglandina $F2\alpha$ liberada por el endometrio uterino, los niveles plasmáticos de progesterona descienden. Esta disminución de la progesterona circulante provoca la liberación de la secreción tónica de LH de tal forma que la frecuencia de sus pulsos aumenta progresivamente, hasta alcanzar un pulso por cada hora. Este aumento en la frecuencia de secreción de LH estimula la producción de estradiol ($E2$) en los folículos en proceso de maduración, incrementando su concentración en la circulación general. El incremento progresivo de los niveles de $E2$ ejercido por un mecanismo de retro alimentación (positivo y negativo a la vez) a nivel hipotalámico hipofisiario, ejerce un control en la secreción hormonal originando las descargas preovulatorias tanto de GnRH y LH (Baird y Scaramuzzi, 1976). La representación esquemática de la fisiología del ciclo estral se muestra en la Figura 1.

1.2. Foliculogénesis

El número total de ovocitos (oocitos) presentes en el ovario adulto son originados de un número definitivo de células germinales primordiales (PGCs), una vez formadas las PGCs migran a través del mesenterio intestinal hacia las gónadas del mesonefro del embrión temprano para poblar el ovario primitivo (Byskov y Hoyer, 1994). Una vez establecidos en el ovario en desarrollo, las PGCs comienzan a diferenciarse en ovogonias (oogonias). La población de ovogonias se expande mediante un determinado número de divisiones hasta que las células entran en meiosis y se transforman en ovocitos (Fortune, 1994; Gosden y Bownes, 1995). Después de iniciar la meiosis, los ovocitos primarios progresan a través del leptoteno, zygoteno y paquiteno de la primera profase meiotica, antes de detenerse en la fase de diploteno. Los ovocitos primarios permanecen en estado inactivo hasta la pubertad, cuando se realiza el reclutamiento y la selección folicular para finalmente ser destinados a ovular (Picton, 2001). Los folículos primordiales constituyen el almacén de células germinativas en el ovario postnatal y el número de éstos varía con la especie y la edad (Gosden y Telfer, 1987 a,b; Cecconi, 2002). Tan

pronto como la población de folículos primordiales es establecido, el reclutamiento folicular es iniciado y continúa sin detenerse por el resto de la vida. Una vez que el grupo de folículos ha sido establecido, los folículos gradual y continuamente abandonan el resto del grupo y continúan creciendo, sin embargo, no todos los folículos primordiales en el ovario postnatal inician el crecimiento al mismo tiempo. La naturaleza de las señales para iniciar el crecimiento y los mecanismos que garantizan que el folículo abandone el resto del grupo gradualmente, son desconocidos (Fortune, 1994). El crecimiento folicular es continuo, terminando en la ovulación de un ovocito maduro o en la degeneración del folículo (atresia) y su ovocito (Fortune, 1994; Picton, 2001). La aparente correlación inversa entre la proporción de folículos en crecimiento y el tamaño de los folículos primordiales almacenados (Gougeon y Chainey, 1987), permite sugerir que factores derivados de la interacción folículo/ovocito pueden producir una sustancia que inhibe el inicio del crecimiento, efecto que está directamente relacionado con el tamaño de la población de folículos primordiales.

2. DINÁMICA FOLICULAR

El crecimiento folicular es un proceso continuo que inicia desde su estado primordial (100 μm) hasta desarrollarse en un folículo de 5-8 mm capaz de ovular (Cahill y Mauléon, 1981), el cual se estima tiene una duración de 180 días. El crecimiento es también un proceso de desarrollo durante el cual el folículo adquiere progresivamente diferentes propiedades, cada una de las cuales es pre-requisito esencial para su posterior desarrollo. El fallo en adquirir estas propiedades en el tiempo correcto y en la secuencia correcta conducirá al fallo en el proceso de desarrollo y a la declinación del folículo por atresia. El resultado final es la regulación en el suministro de folículos desarrollados completamente, capaces de ovular y disponibles todo el tiempo a pesar del estado reproductivo (Scaramuzzi y Campbell, 1990).

La superficie de cada ovario a lo largo del ciclo estral ovino, cuentan con numerosos folículos antrales, sin embargo al final de ciclo, en la mayoría de las razas solamente uno o dos folículos ovulan. Dos procesos han sido considerados que dirigen el

desarrollo de los folículos preovulatorios, el reclutamiento, donde se establece un grupo de folículos capaces de ovular y posteriormente una selección entre ellos, de los cuales pocos completan su crecimiento preovulatorio, mientras otros degeneran por atresia (Driancourt y Cahill, 1984). En el curso de la ovogénesis, que inicia durante la vida fetal en la mayoría de las especies de animales domésticos, se constituye un depósito de folículos primordiales en la cordera al nacimiento, a partir del cual se realiza la foliculogénesis (Tassel *et al.*, 1983). El aumento en tamaño del folículo durante su crecimiento se divide en dos fases, una fase preantral donde el folículo es una estructura completa y por otra parte, una fase antral donde el folículo desarrolla una cavidad, el antro, que contiene volúmenes crecientes de líquido folicular (Driancourt, 1999). Los folículos en crecimiento, realizan dos funciones: por una parte son el soporte del crecimiento, maduración y expulsión del gameto femenino y por otra tienen una función clave en la regulación de la función reproductiva por los esteroides que producen.

2.1. Poblaciones de folículos

El ovario de una oveja adulta contiene entre 12,000 y 86,000 folículos primordiales y entre 100 y 400 folículos en crecimiento, de los cuales 10 a 40 son visibles en la superficie del ovario (Cahill *et al.*, 1979; McNatty *et al.*, 1982).

La población folicular ovárica ha mostrado diferencias entre razas en el número promedio de folículos pequeños ($30,501 \pm 5707$ y $56,236 \pm 5776$), así como para el caso de los folículos grandes (233 ± 24.1 y 150 ± 20.1) entre una raza prolífica y otra que no lo es, respectivamente (Cahill *et al.*, 1979). Los resultados muestran que existe una asociación muy estrecha entre la tasa de ovulación y la población de folículos en crecimiento.

2.2. Ondas foliculares

El interés por el entendimiento del patrón de crecimiento folicular en ovejas, ha resultado en un considerable debate en todos los resultados relacionados a este tema. Las investigaciones hechas por algunos autores no fueron capaces de mostrar ningún orden confiable en el patrón de crecimiento folicular (Turnbull *et al.*, 1977), mientras que otros

han sugerido que el crecimiento folicular se realiza de forma continua e independiente de la etapa del ciclo estral (Lahlou-Kassi y Mariana, 1984; Yenicoye *et al.*, 1989); aún en resultados más recientes se sostiene que el desarrollo folicular en ovejas con ovulaciones múltiples, aparentemente ocurre como un proceso continuo, sin evidencias firmes que sostuvieran que el desarrollo folicular se presenta en ondas (Schrack *et al.*, 1993; Lopez-Sebastian *et al.*, 1997). Aunque distintas ondas de crecimiento y regresión folicular no fueron evidentes en ovejas, existieron dos picos significativos en la emergencia de folículos alrededor de los días 2 y 11 del ciclo estral (Ravindra *et al.*, 1994).

Las fluctuaciones en el número de folículos de diferentes tamaños dentro de un ciclo estral en forma de onda folicular han sido reportados (Evans *et al.*, 2000; Duggavathi *et al.*, 2003), observándose que existen predominantemente 2 (Brand y Jong, 1973) o 3 ondas foliculares (Smeaton y Robertson, 1971; Mattner y Braden, 1972) durante un ciclo estral. Evans *et al.* (2000), observaron que en ovejas con dos ondas foliculares por ciclo, el número de folículos pequeños, medianos y grandes fue mayor en los días 4, 5 y 8 del ciclo y nuevamente los días 10, 12 y 16, respectivamente (Figura 2). La mayor cantidad de folículos emergidos por oveja se presentaron los días 1 y 9, mientras que los días 13 al 16 se presentó la menor cantidad de folículos. En ovejas con tres ondas foliculares por ciclo, el número de folículos pequeños, medianos y grandes fue mayor en los días 3, 5, 6 y nuevamente 5, 8 y 13, respectivamente. El número de folículos emergidos por oveja fue más alto los días 3, 7 y 12 y los más bajos los días 0, 4, 9 y 14 al 16 del ciclo (Evans *et al.*, 2000).

El crecimiento de folículos ováricos antrales ≥ 2 mm, crecen en 3 ondas (Noel *et al.*, 1993; Leyva *et al.*, 1999), la primera, segunda y tercera onda de foliculogénesis inician los días 1-2, 7-8 y 14 del ciclo estral, respectivamente. Del mismo modo, otros autores reportan resultados donde la mayoría de los intervalos interovulatorios (76.5%), fueron asociados con la emergencia de 4 ondas foliculares (Bartlewsky *et al.*, 1999; Viñoles *et al.*, 1999), en promedio, la emergencia de la onda fue los días 0, 5, 9 y 12 para una raza no prolífica y los días 1, 6, 10 y 13 para una raza prolífica.

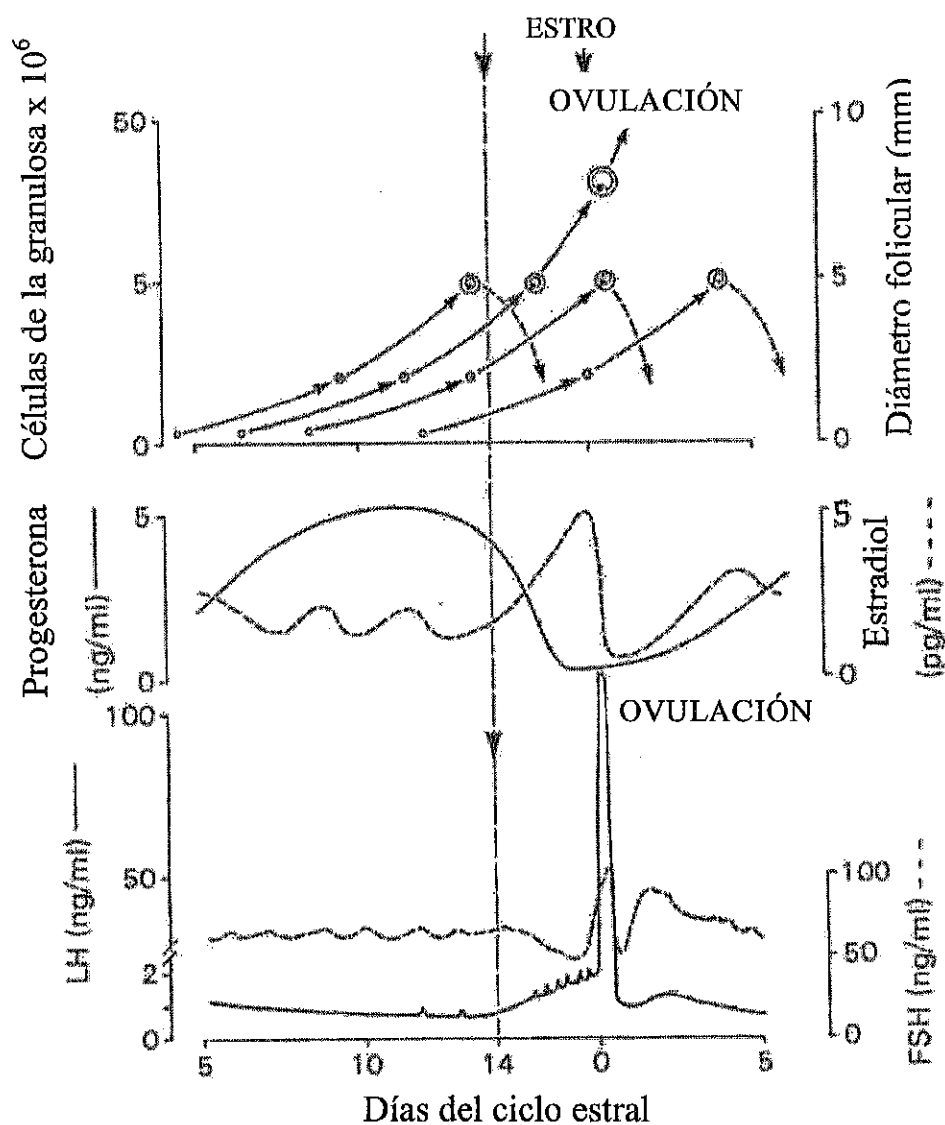


Figura 2. Desarrollo folicular preovulatorio en ovejas (Baird, 1983).

Así mismo resultados de otros autores (Ginther *et al.*, 1995) reportan una mayor cantidad de ondas foliculares, existiendo intervalos interovulatorios con varios números de ellas, variando de 3 ondas (8%), 4 ondas (58%) y hasta 5 a 6 ondas (34%).

Los análisis de patrones de desarrollo de folículos grandes en especies mamíferas ocurre solamente durante particulares estadios reproductivos y/o durante momentos particulares del ciclo estral.

El reclutamiento no es un fenómeno aleatorio o aislado, por el contrario, los folículos parecen ser reclutados en unidades o grupos, sugiriendo que ellos han recibido γ . El término de reclutamiento ha sido asignado a los folículos que crecen a un estadio de desarrollo más allá del cual la mayoría de los folículos experimentan atresia (Fortune, 1994), una señal que les permite continuar creciendo. La señal que estimula el reclutamiento parece ser una ligera elevación de FSH.

La selección puede ser debida a la habilidad para recibir una cantidad adecuada de gonadotropinas entre el folículo maduro más grande y el resto de folículos presentes en la superficie ovárica, lo cual puede ser logrado mediante dos caminos (Driancourt, 1991). En el camino "pasivo", el folículo maduro más grande inhibe indirectamente el crecimiento de los folículos menos maduros, mediante la reducción de la concentración de FSH por debajo del nivel mínimo necesario para mantener a éstos. En el camino "activo", la maduración folicular inhibe directamente el crecimiento de los folículos menos maduros por medio de la secreción en la sangre de sustancias que reducen su sensibilidad a FSH. Existen evidencias que sugieren que la selección "pasiva" es la que ocurre en ovejas (Driancourt, 1991).

Los resultados reportados por Driancourt *et al.* (1986), muestran que la raza tiene un efecto determinante en el mecanismo para lograr su tasa de ovulación, ya que existen razas prolíficas que cuentan con un potencial ovulatorio alto debido a su gran población de folículos reclutables, pero una intensidad de selección alta mediante atresia, en la última fase folicular. En contraste, una raza prolífica puede contar con una población de folículos reclutables menor y alcanzar una tasa de ovulación alta a través de una intensidad de selección marcadamente reducida a través de atresia, existiendo razas que tienen la capacidad de mantener un continuo reclutamiento durante la fase folicular y

una reducida cantidad de pérdidas a través de atresia. Existen autores que reportan una ligera o nula selección de los folículos reclutados en la onda folicular (Duggavathi *et al.*, 2003).

2.4. Dominancia folicular

El número de folículos reclutados usualmente es más grande que el típico número de folículos ovulatorios de una especie determinada. Sin embargo, solamente un número específico de folículos ovulatorios, dependiendo de la especie, continúan creciendo por un periodo más largo y alcanzan el tamaño ovulatorio. Estos son llamados folículos “dominantes” ya que se cree que una vez que ellos son seleccionados, de alguna manera previenen el crecimiento y diferenciación futura del resto de folículos subordinados, con lo cual previenen un futuro reclutamiento folicular (Fortune, 1994).

El fenómeno de la dominancia de un folículo sobre el resto de ellos se ha establecido en ovejas. Un folículo dominante tiene la habilidad de inhibir el crecimiento de otros folículos dentro de ambos ovarios, mientras continua prosperando el mismo (Evans *et al.*, 2000). La determinación de la dominancia se pudo realizar al observar que un folículo dentro de cada onda folicular, creció más de manera significativa, en relación al siguiente folículo más grande. Así mismo se pudo determinar que un folículo de la onda 1 y 3 contenía más estradiol y hubo una tendencia a tener una mayor relación estradiol:progesterona que otros folículos en la misma onda. Otra de las características del folículo dominante es la alta sensibilidad a la FSH en relación a los folículos subordinados, característica que le confiere una mayor acción y utilización de la FSH en el proceso de aromatización. Se ha sugerido que el candidato para tal acción autocrina positiva es el IGF1, el cual está presente en altas concentraciones en los folículos grandes (Driancourt, 1991). La presencia de receptores a LH en las células de la granulosa pueden contribuir a la dominancia del folículo más grande. Los resultados de Ginther *et al.* (1995) sugieren que la dominancia folicular podría ser ejercida durante algunas de las ondas observadas en el intervalo interovulatorio y podría ser menos prominente en comparación a como ha sido mostrada en bovinos.

La dominancia por folículos grandes no fue evidentemente clara en ovejas ciclando, basada en la definición de dominancia desarrollada para bovinos (Ravindra *et al.*, 1994; Duggavathi *et al.*, 2003) sugiriendo que la dominancia folicular en ovejas, es un fenómeno débil o tenue en contraste con la situación que ocurre en ganado bovino. El hecho de que la dominancia sea débil o ausente en ovejas puede ser lógica, ya que existen razas de ovejas de ovulación múltiple y entonces más de un folículo puede tener el potencial de ovular hasta el final del ciclo estral (Ravindra *et al.*, 1994).

2.5. Dinámica folicular en anestro

Los resultados de diferentes estudios han demostrado que los ovarios de ovejas en anestro no están inactivos (Smeaton y Robertson, 1971). El máximo diámetro folicular y el número promedio de folículos ováricos grandes no difirieron entre animales sacrificados durante anestro de aquellos que se sacrificaron a partir del día 5 del ciclo estral (Brand y de Jong, 1973). Durante el anestro, sucesivas ondas de foliculogénesis fueron observadas y el crecimiento folicular de un diámetro de 5 mm o más, concluyendo que los patrones cíclicos de crecimiento folicular y atresia que se presentan durante la estación reproductiva, están presentes también durante la época de anestro (Noel *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos por Bartlewski *et al.* (1998), sugieren que los incrementos generados rítmicamente en concentraciones séricas de FSH, pueden iniciar la emergencia de ondas foliculares en ovejas en anestro (folículos antrales creciendo de 3 a ≥ 5 mm antes de la regresión). Los folículos ováricos más grandes mostraron un patrón de crecimiento en forma de onda, registrando un promedio de 3 ondas de desarrollo folicular durante cuatro periodos de 17 días de observaciones con ultrasonido. Además, como la producción de LH es suprimida durante el periodo de anestro, es probable que la FSH sola, tenga el potencial de estimular el desarrollo de folículos antrales ováricos durante el periodo de anestro en la oveja.

3. SINCRONIZACIÓN ESTRAL

La sincronización estral es utilizada en la industria ovina para mejorar la eficiencia productiva, para facilitar el uso de la inseminación artificial y la técnica de transferencia de embriones (Beck *et al.*, 1993). La sincronización estral se ha convertido en un vital instrumento en el manejo de la reproducción en animales domésticos. Entre los beneficios que se obtienen se considera la planeación del programa de apareamiento y una reducción en costos por jornales en términos de detección de estro y cuidados de los corderos recién nacidos (Oyediji *et al.*, 1990). En las hembras donantes, la sincronización e inducción del celo, permiten obtener embriones con el mismo estado de desarrollo en todas las hembras tratadas, lo cual se logra mediante la administración de progestágenos o de prostaglandinas (Baril *et al.*, 1995).

La sincronización estral está basada en el control del ciclo estral de la hembra, lo cual se obtiene mediante diferentes dispositivos conteniendo progesterona o progestágenos. La liberación de progesterona puede implementarse en diferente formas, variando desde un periodo natural de progesterona elevada seguida del comportamiento estral y la ovulación, hasta la administración exógena de progesterona pura o un potente análogo de progesterona, usualmente dispositivos vía intravaginal (Scudamore *et al.*, 1993). El método ideal de sincronización estral debe alcanzar buena precisión y buena fertilidad (Mutiga y Mukasa-Mugerwa, 1992). Las esponjas intravaginales de poliuretano impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) o de 30 a 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA) son las fuentes de progestágenos más utilizados (Baril *et al.*, 1995), siendo las esponjas con 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA) el más recomendado para ovejas. El tratamiento de sincronización puede realizarse también por medio de implantes subcutáneos impregnados de 3 mg de Norgestomet, los cuales se colocan bajo la piel a nivel de la superficie externa de la oreja.

La sincronización del celo puede obtenerse también mediante dos inyecciones de un análogo de prostaglandina F2 α . La necesidad de proceder con dos inyecciones administradas con un intervalo de 10 a 14 días se debe a que, por una parte, las hembras

con fase folicular con una sola inyección no quedaran sincronizadas y, por otra parte, los cuerpos lúteos son sensibles a la prostaglandina solo a partir del quinto día de la fase luteal, quedando un número importante de hembras fuera de sincronización aplicando solo una inyección de prostaglandina (Baril *et al.*, 1995).

3.1. Utilización de acetato de fluorogestona (FGA)

Los resultados reportados por Scudamore *et al.* (1993), indican que el tiempo promedio de inicio del estro en relación al retiro del dispositivo no fue diferente significativamente entre 3 tratamientos utilizando esponjas impregnadas con FGA y el dispositivo CIDR para la sincronización estral en ovejas superovuladas. La manifestación estral se pudo observar entre las 18.0 h para el caso de ovejas tratadas con CIDR y las 20.8 h para ovejas tratadas con FGA después del retiro de la esponja. Sin embargo, existieron diferencias significativas cuando los resultados se compararon con los obtenidos al administrar prostaglandina F2 α . La manifestación estral ocurrió a las 31.0 h en ovejas tratadas durante la fase luteal. El tratamiento de sincronización estral que mostró mejores resultados en ovejas que fueron superovuladas, fue la esponja intravaginal con 30 mg de FGA, con la adición de 400 mg de progesterona, seguido por el tratamiento con prostaglandinas F2 α y finalmente el dispositivo CIDR (Scudamore *et al.*, 1993).

La incidencia de estro no fue diferente significativamente entre cuatro grupos de ovejas sincronizadas con esponjas impregnadas con 30 mg de FGA a las cuales se les superovuló con cuatro dosis de FSH-p, variando entre 87 y 93% la manifestación estral (D'Alessandro *et al.*, 1996). Sin embargo, el tiempo promedio del retiro de la esponja al inicio del estro fue influenciado por el tratamiento. En ovejas tratadas con 250 UI FSH-p, la manifestación estral fue atrasada en relación a ovejas tratadas con 1000 o 500 UI de FSH-p.

Scudamore *et al.* (1992) no encontraron diferencias en la tasa de ovulación entre ovejas sincronizadas utilizando un dispositivo con 30 o 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA), pero la proporción de embriones de alta calidad recolectados el día 6, utilizando inseminación artificial fue mayor para el nivel más alto de FGA.

3.2. Utilización de acetato de medroxiprogesterona (MAP)

Los resultados publicados por Fucui *et al.* (1989), mostraron un rango del 89.5 al 97.8% de ovejas que manifestaron celo cuando se les aplicó PMSG dos días antes o al momento de retirar la esponja impregnada con MAP, respectivamente. La manifestación del comportamiento estral fue a las 18-42 h y 24-48 h, respectivamente después de remover la esponja. La aplicación de PMSG dos días antes de la remoción de la esponja, ocasionó un significativo adelanto en la manifestación estral (31.4 y 39.7 h) comparativamente con ovejas que recibieron PMSG al momento de retirar el dispositivo. Por otro lado, el tiempo promedio de inicio de comportamiento estral fue de 27.3 ± 3.2 h en ovejas sincronizadas con esponjas impregnadas con MAP, mostrando conducta estral el 100% de las ovejas tratadas (Fucui *et al.*, 1999), lo anterior en animales que no recibieron ningún tipo de gonadotropina, siendo similares a los resultados reportados por Beck *et al.* (1993) quienes reportan el 100% de manifestación estral.

3.3. Dispositivos intravaginales de liberación controlada internamente (CIDR)

Los resultados reportados por Thompson *et al.* (1990), no muestran diferencias significativas en la manifestación estral entre los dispositivos CIDR y esponjas intravaginales utilizadas en la sincronización estral de ovejas superovuladas. La mayoría de las ovejas (76%) mostraron comportamiento estral entre las 14 y 22 h después de retirados los dispositivos. La evaluación de tres tratamientos de sincronización (1 CIDR, 2 CIDR y esponjas impregnadas con MAP), se observó un efecto significativo del tratamiento de sincronización en la tasa de ovulación y la recolección de embriones en ovejas superovuladas. La manifestación estral para las ovejas sincronizadas con 1 CIDR se presentó entre las 12 y 24 h, mientras que para ovejas tratadas con 2 CIDR y con

esponjas intravaginales, la manifestación estral se presentó entre las 22 y 30 h, sugiriendo que ovejas sincronizadas con un CIDR pueden producir una respuesta superovulatoria sub óptima y al mismo tiempo acortar el intervalo entre el retiro del dispositivo y la manifestación estral (Thompson *et al.*, 1990). El dispositivo CIDR produjo bajos porcentajes de ovulación y un número reducido de ovocitos de alta calidad, comparado con esponjas que contenían 60 mg de MAP.

La manifestación estral en ovejas tratadas utilizando CIDR y esponjas intravaginales impregnadas con progesterona, fue inducida significativamente más temprano que en ovejas tratadas con progestágenos FGA y MAP, manifestando comportamiento estral entre las 22.3 y 29.4 h después de remover el dispositivo vaginal, respectivamente (Fucui *et al.*, 1999). El porcentaje de ovejas que manifestaron comportamiento estral fue similar para los dos grupos evaluados siendo de 95.0 y 95.45%, respectivamente. Los resultados reportados por Fucui *et al.* (1999), mostraron que el tiempo de inicio del estro en ovejas tratadas con CIDR fue aproximadamente 5 y 10 h más temprano que en aquellas tratadas con esponjas impregnadas con MAP y FGA, respectivamente. Los resultados concuerdan con los reportados por otros autores (Rhodes y Nathanielsz, 1988; Smith *et al.*, 1989; Fucui *et al.*, 1993), quienes mostraron que tratamientos con progesterona natural inducen el estro 7-24 h más temprano que las esponjas intravaginales conteniendo MAP o FGA.

3.4. Utilización de implantes subcutaneos

Los resultados reportados en ovejas no superovuladas (Cardwell *et al.*, 1998), mostraron que el intervalo entre el retiro del implante y el inicio del comportamiento estral fue significativamente mayor en ovejas tratadas solamente con un implante de norgestomet (81%) comparativamente con las ovejas tratadas con el implante más 500 UI de PMSG (88%). La manifestación estral se observó a las 46.0 y 32.6 h, respectivamente. El intervalo de la remoción del implante a la ovulación fue mayor significativamente en ovejas tratadas con un implante (79.8 h) que en ovejas con implante más PMSG (68.6 h). Por otro lado, los resultados de Maxwell y Barnes (1986),

mostraron que la respuesta a la sincronización estral fue similar en ovejas tratadas con norgestomet más PMSG que en aquellas tratadas con CIDR más PMSG. En ambos grupos las ovejas manifestaron estro en las primeras 48 h después de retirado el progestágeno.

3.5. Utilización de prostaglandinas

Beck *et al.* (1993) reportan que el 100% de las ovejas mostraron estro sincronizado al ser tratadas con esponjas impregnadas con MAP más una dosis de PGF2 α o sincronizadas con doble dosis de PGF2 α administradas con un intervalo de 11 días, comparada con 53% de ovejas que mostraron estro cuando recibieron una sola dosis de PGF2 α , existiendo diferencia significativa. La manifestación estral fue en un periodo de 3 a 5 días. Por otra parte, en los reportes de ovejas sincronizadas con prostaglandina, la manifestación estral no fue diferente significativamente en relación con ovejas sincronizadas con esponjas impregnadas impregnadas con acetato de fluorogestona (Mutiga y Mukasa-Mugerwa, 1992), iniciando el comportamiento estral a las 44 y 55 h en ovejas sincronizadas con prostaglandinas y esponjas, respectivamente. En ovejas sincronizadas con prostaglandinas, que no fueron superovuladas, se pudo observar un rango de sincronización estral del 73 al 80% (Henderson *et al.*, 1984; Beck *et al.*, 1987).

4. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

El alto grado de variabilidad en la tasa de ovulación y número de embriones recuperados después de la superovulación, ha sido demostrado en la especie ovina de manera similar con ganado bovino, esta variabilidad en la respuesta es el principal factor limitante en los programas de transferencia embrionaria en pequeños rumiantes (Cognie, 1999). La interacción de múltiples factores pueden ocasionar que un 20% de ovejas no respondan al tratamiento superovulatorio (<5 ovulaciones) por lo cual no son consideradas para recuperación embrionaria. Es probable que algunos factores como son raza (Baril *et al.*, 1985), edad de la donadora, gonadotropina utilizada, estación de año (Gordon, 1997) así como la condición corporal contribuyen en la variabilidad. La

población folicular ovárica al inicio del tratamiento de superovulación, también ha sido asociada en recientes investigaciones (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000).

4.1. Raza

Los resultados del análisis de 9,000 superovulaciones realizadas durante seis años utilizando diferentes razas ovinas, mostraron que la raza de la donante en cada año evaluado, afectó en forma significativa la tasa de ovulación, la tasa de recuperación de embriones y el número de embriones transferibles (Vivanco, 1998). Diferencias significativas fueron observadas entre ovejas Suffolk, Merino y Romney Marsh superovuladas, para tasa de ovulación (11.3, 16.6, 8.2 cuerpos lúteos) y número de embriones producidos (5.2, 2.9, 3.8) (Armstrog y Evans, 1983). Tasas de ovulación diferentes también han sido reportadas al superovular ovejas Préalpes, Lacaune y Romanov x Préalpes (Torres *et al.*, 1987), reportando 19.5 ovulaciones para ovejas Romanov x Préalpes, 12.0 para ovejas Lacaune y de 9.0 para ovejas Préalpes. Resultados similares fueron reportados en ovejas Chios y East Friesian (Boscos *et al.*, 1997), observándose mayor respuesta en tasa de ovulación y número de embriones transferibles en ovejas de la raza Chios. La tasa de recuperación embrionaria fue similar entre las dos razas.

Los resultados para ovejas Churra, Merina y Manchega (Picazo *et al.*, 1996), no mostraron diferencias significativas entre razas en la tasa de ovulación (8.1, 7.0 y 5.0 cuerpos lúteos, respectivamente) y el número total de embriones transferibles (3.1, 3.3 y 1.6, respectivamente).

4.2. Edad

La ventaja potencial que podría tener la transferencia de embriones, es la habilidad de acortar el intervalo generacional mediante la obtención de embriones de donadoras prepúberes para su transferencia a receptoras adultas. Sin embargo, los resultados obtenidos (Rangel-Santos *et al.*, 1991) han mostrado una respuesta

superovulatoria y tasa de fertilización significativamente menor en corderas comparadas con ovejas adultas, aún cuando las corderas fueron seleccionadas cuando ya habían iniciado su ciclo reproductivo (Armstrong y Evans, 1983). Se ha sugerido que los reducidos logros con animales jóvenes pueden resultar de subóptimas concentraciones de progesterona, conduciendo a una inadecuada preparación del eje hipotálamo-pituitaria para la inducción de superovulación y/o del ambiente uterino para permitir la fertilización y la formación de embriones transferibles (Armstrong y Evans, 1983).

El efecto de la edad de la donadora fue observado en los resultados publicados por Torres *et al.* (1987), quienes encontraron una mejor respuesta a tratamientos de superovulación en ovejas $\geq$ a 6 años comparativamente con ovejas $\leq$ a 3 años. La tasa de ovulación (12.0 vs 8.8) y el número de embriones recuperados (9.2 vs 6.6) fue significativamente mayor en ovejas $\geq$ a 6 años. Forcada *et al.* (2000), indican una buena respuesta a tratamientos superovulatorios en ovejas Rasa Aragonesa mayores de ocho años de edad. Los autores reportaron un promedio de 11.0 cuerpos lúteos, 7.3 embriones recuperados y 4.9 embriones transferibles por oveja superovulada, después de tres años consecutivos de ser utilizadas como donadoras.

Las ovejas donadoras de edad avanzada tuvieron una respuesta superovulatoria significativamente mayor y debido a que el porcentaje de recuperación embrionaria se mantuvo constante, finalmente se recuperó un mayor número de embriones de ovejas de edad avanzada que de ovejas jóvenes (Bari *et al.*, 2001). *

4.3. Gonadotropina utilizada

El tiempo de vida biológico de las diferentes gonadotropinas ha determinado tradicionalmente los medios más eficientes de su administración para inducir una respuesta superovulatoria. El amplio tiempo de vida de la gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) (12 h en ovejas, McIntosh *et al.*, 1975) ha permitido el uso de una sola inyección, mientras que generalmente se ha pensado que el corto tiempo de vida de las preparaciones de FSH (2 h en ovejas, Akbar *et al.*, 1974), requiere de la administración

de una o dos aplicaciones diarias durante 3 a 4 días. El gran tiempo de vida media de PMSG causa efectos adversos cuando es utilizada para la superovulación. La incidencia de folículos grandes sin ovular se incrementa (Booth *et al.*, 1975). Es probable que los estrógenos incrementen la tasa de transporte de los embriones a través de los oviductos y así disminuya el porcentaje de recolección embrionaria. El uso de PMSG en ovejas ha sido asociado con la activación prematura de los ovocitos resultando en la liberación de ovocitos envejecidos o anormales al momento de la ovulación (Moor *et al.*, 1985).

Los resultados de estudios donde se compara la eficiencia de preparaciones de PMSG y FSH para inducir la superovulación, han generado resultados variables. Los resultados reportados por Critser *et al.* (1980), no mostraron diferencias significativas entre las dos gonadotropinas, mientras que Elsdén *et al.* (1978) y Monniaux *et al.* (1983) han reportado que las preparaciones purificadas de FSH superan los resultados obtenidos con PMSG. Las ventajas que se obtienen al utilizar FSH comparativamente con PMSG, incluye un mejor transporte de espermatozoides en la oveja (Evans y Armstrong, 1984), una mejora en la tasa de fertilización utilizando inseminación cervical (Evans *et al.*, 1984) y una mayor producción de embriones (Elsden *et al.*, 1978). La variación en tasa de ovulación tiende a ser mayor en respuesta a la aplicación de PMSG que con FSH y un bajo porcentaje de todas las donadoras tratadas con PMSG en relación con FSH, producen embriones transferibles (55% vs 100%, respectivamente). Otras diferencias observadas entre los dos tipos de gonadotropinas es la ocasional sobreestimulación de los ovarios, con presencia de múltiples quistes foliculares en ovejas tratadas con PMSG, lo cual no se ha observado en ovejas tratadas con FSH (Armstrong y Evans, 1983).

La administración conjunta de PMSG en combinación con FSH para superovular ovejas, ha eliminado las desventajas de utilizar a ambas hormonas de manera independiente (Ryan *et al.*, 1984). Una dosis moderada de PMSG (400-800 UI) en combinación con una dosis superovulatoria de FSH (12-20 mg) incrementa la producción de embriones, mediante el incremento de la proporción de ovejas que muestran una respuesta superovulatoria y debido a que no se incrementa el número de folículos persistentes.

En la actualidad existen disponibles comercialmente diferentes tipos de FSH, sin embargo, las que se utilizan con más frecuencia son las de origen ovino (Ovagen) y porcino (Folltropin-V). La administración de Ovagen induce un incremento significativo en el número de folículos ≥ 4 mm en tamaño, debido a un incremento del crecimiento de los folículos desde la primera inyección de FSH a la remoción de la esponja e incrementó el número de folículos nuevos detectados de las 12 a las 36 h de la primera dosis de FSH y una disminución en la tasa de regresión desde las 24 h (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002b). La factibilidad de utilizar FSH-p como gonadotropina exógena para inducir ovulaciones múltiples en ovejas ha sido demostrada por varios investigadores (Torres *et al.*, 1987; D'Alessandro *et al.*, 1996; Stenbak *et al.*, 2001).

4.4. Época del año

En regiones templadas, las ovejas responden a la disminución en la longitud del día a finales de la estación de otoño e inicio de la estación de invierno, mediante el incremento en la actividad del pulso generador de GnRH, mostrando comportamiento estral y logrando la ovulación durante los meses de invierno (Wheeler y Land, 1977). Debido a que la longitud del día se incrementa en primavera, se presenta una disminución gradual de GnRH pulsátil hasta que el pico preovulatorio de LH no puede ser generado y el comportamiento cíclico estral cesa (Bittman *et al.*, 1985). Sin embargo, el desarrollo folicular no cesa (Cahill y Mauleon, 1980) y sucesivas ondas de desarrollo folicular se continúan desarrollando durante la época de anestro (Bartlewski *et al.*, 1998), sugiriendo que estos folículos pueden ser estimulados para madurar y ovular mediante la administración de gonadotropinas exógenas (Mitchell *et al.*, 2002). Los resultados reportados por los mismos autores indican que la tasa de ovulación de ovejas superovuladas se mantuvo constante durante la época de anestro, de manera contraria a lo que ocurre en ovejas de ovulación natural donde existe una reducción en la tasa de ovulación. Sin embargo, una mayor proporción de ovocitos recuperados durante la época de anestro comparativamente con los de la época reproductiva fueron infertilizados o degenerados. La concentración de progesterona en el ciclo anterior a la

ovulación ha sido positivamente asociada con la viabilidad embrionaria (McEvoy *et al.*, 1995) y es sabido que la secreción de progesterona se reduce durante la parte final de la época reproductiva (Mitchell *et al.*, 1999).

El promedio de embriones viables (4.2 embriones/donadora) reportados por Lopez-Sebastian *et al.* (1990) en ovejas superovuladas, indican que no existió diferencia significativa entre época reproductiva y de anestro. Resultados similares encontraron Gonzalez-Bulnes *et al.* (2003) quienes reportaron que la tasa de ovulación (11.6 vs 11.6), la tasa de recuperación embrionaria (68.7 vs 82.7) y el número de embriones viables (5.8 vs 7.2), no fue significativamente diferente entre la época reproductiva y la época de anestro en ovejas superovuladas. Sin embargo, resultados contrarios reportaron Torres *et al.* (1987) en ovejas Lacaune. La tasa de ovulación (11.2 vs 8.4 cuerpos lúteos), el número de embriones recuperados (9.3 vs 7.1) y el número de embriones transferibles (6.3 vs 2.8) fue significativamente mayor durante la época reproductiva comparativamente con la época de anestro. Resultados similares fueron reportados por Fucui *et al.* (1994), obteniendo una menor tasa de ovulación durante la época de anestro que cuando se superovularon ovejas en la época reproductiva (8.4 vs 14.7). Sin embargo, resultados contrarios fueron reportados por Greaney *et al.* (1991), quienes al superovular ovejas de cinco razas durante la época reproductiva y de anestro, encontraron una tasa de ovulación mayor en la época de anestro comparativamente con la época reproductiva (7.8 vs 6.6 cuerpos lúteos). Resultados similares fueron reportados por Ridell *et al.* (1988), demostrando la viabilidad de alcanzar una respuesta superovulatoria en ovejas tratadas durante el periodo de anestro, obteniendo una tasa de ovulación promedio de 7.2 y un promedio de 5.2 ovocitos recuperados.

La presencia de un folículo grande al inicio del tratamiento superovulatorio en la época reproductiva, no ejerció efecto significativo en el número de cuerpos lúteos, sin embargo, la tasa de recuperación así como el número de embriones viables fueron menores en ovejas superovuladas con presencia de folículo grande, por el contrario, la influencia negativa que resulta de la presencia de un folículo grande en el número de

embriones transferibles, no fue detectada en ovejas en anestro (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2003).

5. ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN

5.1. Utilización de ácidos grasos polinsaturados (AGPI)

La utilización de ácidos grasos polinsaturados en la dieta de las donadoras puede ser una alternativa para mejorar la eficiencia en programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones. Zeron *et al.* (2002) observaron un mayor número de folículos totales por ovario en ovejas alimentadas con AGPI (17.5) comparado con la dieta control (14.5). Al incluir AGPI en la dieta se incrementó significativamente el número de ovocitos por ovario (14.7), comparados con ovejas alimentadas con la dieta control (10.08). Así mismo, la inclusión de AGPI en la dieta incrementó el número de ovocitos grado I comparativamente con ovejas del grupo control (74.3 vs 57.0%, respectivamente). Los autores concluyeron que la inclusión de AGPI en la dieta de ovejas cambia la composición de ácidos grasos en los componentes foliculares, influyendo en la calidad de los ovocitos.

5.2. Presencia de Cuerpo Lúteo (CL)

La presencia de al menos un CL al momento de aplicar la primera dosis de FSH en ovejas superovuladas, no ejerció efecto significativo en la tasa de ovulación (12.5 vs 10.2 cuerpos lúteos), sin embargo, el número total de embriones recolectados mostró una tendencia a incrementarse en ovejas que contaban con un CL (9.3 vs 5.1), dichos embriones mostraron una alta tasa de viabilidad, por lo que el número total de embriones transferibles en ovejas con CL fue mayor (7.2 vs 2.7) comparativamente con ovejas que no presentaron CL al inicio del tratamiento. Por otro lado, existió una correlación positiva entre el número de folículos pequeños (2-3 mm) y la tasa de ovulación en ovejas con presencia o ausencia de CL, sin embargo, existió una correlación

positiva entre el número total de embriones recolectados y el número de folículos pequeños así como el número de embriones viables en ovejas que contaban con un CL, condición que no fue observada en ovejas con ausencia de CL en el momento de aplicar la primera dosis de FSH (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002c). La respuesta ovulatoria, en tratamientos de superoovulación, puede incrementarse iniciando el tratamiento durante la fase luteal temprana del ciclo estral.

5.3. Remoción del folículo dominante

La presencia de un folículo grande (≥ 6 mm de diámetro) al iniciar la superovulación, ha sido asociado con una disminución significativa del número y la viabilidad de los embriones recuperados (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002a; 2002b), lo cual ha sido superado mediante la remoción de dicho folículo. Los investigadores reportaron un mayor número de folículos ($P < 0.05$) pequeños (2-3 mm de diámetro) durante los primeros tres días de la segunda onda de crecimiento folicular en las ovejas a las que se les removió tanto el folículo dominante como la totalidad de los folículos presentes al inicio del tratamiento de superovulación, comparativamente con ovejas testigo (Evans *et al.*, 2002).

5.4. Superovulación al inicio de la primera onda folicular

La administración del tratamiento de superovulación al momento de la emergencia de la primera onda folicular, provocó un mayor reclutamiento folicular y una mayor respuesta ovulatoria comparativamente con ovejas superovuladas en las cuales está presente un folículo grande al iniciar el tratamiento superovulatorio (Rubianes *et al.*, 1997).

5.5. Utilización de hormona del crecimiento (rGH)

El tratamiento de ovejas adultas con rGH puede incrementar el desarrollo de folículos ováricos dependientes de gonadotropinas, ya que la rGH es requerida para que el crecimiento folicular continúe más allá de los 2 mm de diámetro actuando mediante un

incremento en la secreción de IGF-I ovárico, así como un incremento en la concentración periférica de IGF-I e insulina. Los resultados publicados por Gong *et al.* (1996) mostraron que la población de folículos de 2.1-3.0 mm fue significativamente correlacionada con la concentración periférica de GH, IGF-I e insulina. Resultados similares se obtuvieron en ganado bovino (Gong *et al.*, 1993) donde el número de folículos antrales pequeños fueron duplicados. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que los IGF-I e insulina pueden estimular la proliferación y esteroidogénesis en las células de la granulosa ovinas (Webb y McBride, 1991; Monniaux y Pisselet, 1992). Los resultados muestran el potencial de utilizar la rGH en protocolos de superovulación en ovinos.

LITERATURA CITADA

- Akbar, A.M., T.M. Nett and G.D. Niswender. 1974. Metabolic clearance and secretion rates of gonadotrophins at different stages of the oestrous cycle in ewes. *Endocrinology*. 94:1318-1324.
- ✓ Armstrong, D.T. and G. Evans. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19:31-42.
- ✓ Bari, F., M. Khalid, B. Wolf, W. Haresign, A. Murray and B. Merrell. 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*. 56:147-155.
- Baril, G., P. Brebion y P. Chesné. 1995. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. Estudio FAO 115, Producción y Sanidad Animal. 175 p.
- Baird, D.T. 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J. Reprod. Fert.* 69:343-352.
- Bartlewski, P.M., A.P. Beard., S.J. Cook and N.C. Rawlings. 1998. Ovarian follicular dynamics during anoestrous in ewes. *J. Reprod. Fert.* 113:275-285.
- 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. Fert.* 115:111-124.
- Beck, N.F.G., B. Davis and S.P. Williams. 1993. Oestrous synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin analogue with a 5-day progestagen treatment. *Anim. Prod.* 56:207-210.
- Beck, N.F.G., M.C.G. Davis, B. Davis and J.L. Lees. 1987. Oestrous synchronization and fertility in ewes: a comparison of three methods. *Anim. Prod.* 44:251-254.
- Bittman, E.L., A.H. Olster, J.E. Robinson, S.M. Yellon and F.J. Karsh. 1985. Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology*. 40:409-418.

- Booth, W.D., R. Newcomb, H. Strange, L.E.A. Rowson and H.B. Sacher. 1975. Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. *Vet. Rec.* 97:366-369.
- Boscós, C., E. Vainas, T. Kouskoura, F. Samartzi, D. Vafiadis and S. Dellis. 1997. Superovulatory response of Chios and Friesian ewes to two FSH-p dose levels. *Reprod. Dom. Anim.* 32:195-198.
- Brand, A. and W.H. de Jong. 1973. Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrous cycle in sheep. *J. Reprod. Fert.* 33:431-439.
- Byskov, A. and P. Hoyer. 1994. Embryology of mammalian gonads. In: Knobil, E. and Neill, J. (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press Ltd. 487-540.
- Cahill, L. P., J.C. Mariana and P. Mauléon. 1979. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 55:27-36.
- Cahill, L.P. and P. Mauléon. 1980. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fert.* 58:321-328.
- Cahill, L.P. and P. Mauléon. 1981. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J. Reprod. Fert.* 61:201-206.
- Cardwell, B.E., G.Q. Fitch and R.D. Geisert. 1998. Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with Norgestomet and Norgestomet followed by Pregnant Mare's Serum Gonadotropin. *J. Anim. Sci.* 76:2235-2238.
- Cecconni, S. 2002. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. *J. Reprod. Develop.* 48:431-445.
- Cognié, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51:105-116.
- Cognié, Y., G. Baril, N. Poulin and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59:171-188.
- Critser, J.K., R.F. Rowe, M.R. Del Campo, and O.J. Ginther. 1980. Embryo transfer in cattle: Factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos, and length of post-treatment estrous cycles *Theriogenology*. 13:397-406.

- D'Alessandro, A., G. Martemucci, F. Toteda, M. Gambacorta and A. Manchisi. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a comercial p-FSH. *Small Rumin. Res.* 19:255-261.
- Driancourt, M.A. and L.P. Cahill. 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fert.* 71:205-211.
- Driancourt, M.A., I.K. Gauld, M. Terqui and R. Webb. 1986. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.* 78:565-575.
- Driancourt, M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 35:55-79.
- Driancourt, M.A. 1999. Crecimiento folicular en los animales domésticos: Mecanismos y manipulación. I Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción de Rumiantes, Montecillos; Estado de México. pp 78-94.
- Duggavathi, R. P.M. Bartlewski, D.M.W. Barrett and N.C. Rawlings. 2003. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogenology.* 60:495-510.
- Elsden, R.P., L.D. Nelson and G.E Seidel Jr. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology.* 9:17-26.
- Evans, G. and D.T. Armstrong. 1984. Redution of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fert.* 70:47-53.
- Evans, A.C.O., P. Duffy, N. Hynes and M.P. Boland. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology.* 53:699-715.
- Evans, A.C.O., J.D. Flynn, P. Duffy, P.G Knight and M.P Boland. 2002. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concetrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction.* 123:59-66.
- Forcada, F., J.A. Abecia, J.M. Lozano and O. Zuñiga. 2000. Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. *Livestock Prod. Sci.* 66:263-269.
- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50:225-232.

- Foster, D.L., S.M. Yellon and D.H. Olster. 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *J. Reprod. Fert.* 75:327-344.
- Frandsen, R.D. and T.L. Spurgeon. 1995. *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos*. Interamericana McGraw-Hill. Quinta edición. 423 p.
- Fucui, Y., M. Akaike, H. Anzai and H. Ono. 1989. Effect on timing of injection with pregnant mare' serum gonadotrophin on fixed time artificial insemination of seasonally anoestrous ewes. *J. Agri. Sci.* 113:361-364.
- Fucui, Y., H. Hirai, K. Honda and K. Hayashi. 1993. Lambing rates by fixed-time intrauterine insemination with frozen semen in seasonally anestrus ewes treated with a progestagen-impregnated sponge or CIDR device. *J. Reprod. Dev.* 39:1-5.
- Fucui, Y., Y. Tashiro, H. Kimura and A. Miyamoto. 1994. Effects of progestagen treatment and season on superovulatory responses of ewes and developmental capacity of early embryos recovered. *J. Reprod. Dev.* 40:251-257.
- Fucui, Y., D. Ishikawa, N. Ishida, M. Okada, R. Itagaki and T. Ogiso. 1999. Comparison of fertility of estrous synchronized ewes with four different intravaginal devices during the breeding season. *J. Reprod. Dev.* 45:337-343.
- Gallegos-Sanchez, J., H.P. Pérez y de la Ll. A. Albarrán. 1999. Neuroendocrinología del ciclo reproductivo de la oveja. I Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción de Rumiantes. Montecillos, Texcoco; México. 8, 9 y 10 de septiembre. pp 1-26.
- Ginther, O.J., K. Kot and M.C. Wiltbank. 1995. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the oestrous cycle in ewes. *Theriogenology*. 43:689-703.
- Gong, J.G., T.A. Bramley and R. Webb. 1993. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fert.* 97:247-254.
- Gong, J.G., B.K. Campbell, T.A. Bramley and R. Webb. 1996. Treatment with recombinant bovine somatotropin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin like growth factor I by ovarian follicles in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 41:13-26.

- Gonzalez-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero and A. Lopez-Sebastian. 2000. Effects of FSH comercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 54:1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero, C.J.H. Souza, N.P. Groome, R.M. Garcia-Garcia, A. Lopez-Sebastian and D.T. Baird. 2002a. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*. 57:1263-1272.
- Gonzalez-Bulnes, A., R.M. Garcia-Garcia, C.J.H. Souza, J. Santiago-Moreno, A. Lopez-Sebastian, M.J. Cocero and D.T. Baird. 2002b. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Dom. Anim.* 37:357-361.
- Gonzalez-Bulnes, A., R.M. Garcia-Garcia, J. Santiago-Moreno, A. Lopez-Sebastian and M.J. Cocero. 2002c. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*. 58:1607-1614.
- Gonzalez-Bulnes, A., R.M. Garcia-Garcia, J. Santiago-Moreno, V. Domínguez, A. Lopez-Sebastian and M.J. Cocero. 2003. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on the response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Theriogenology*. 60:281-288.
- Gordon, I. 1997. *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. CAB Internatioinal 450 p.
- Gosden, R.G. and M.Bownes. 1995. Celular and molecular aspects of oocyte development. Grudzinskas, J.G., Yovich, J.L. (eds), *Gametes - The oocyte*. Cambridge, Cambridge Reviws in Human Reproduction, CUP. 23-53 p.
- Gosden, R.G. and E. Telfer. 1987a. Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. *J. Zool.* 211:157-168.
- Gosden, R.G. and E. Telfer. 1987b. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zool.* 211:169-175.
- Gougeon, A. and G.B.N. Chainey. 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women of different ages. *J. Reprod. Fert.* 81:433-442.

- Greaney, K.B., M.F. McDonald, H.A. Vivanco and H.R. Tervit. 1991. Out-of-season embryo transfer in five breeds of imported sheep. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 51:129-131.
- Henderson, D.C., J.M. Downing, N.F.G. Beck and J.L. Lees. 1984. Oestrous synchronization in ewes: a comparison of prostaglandin F2 α -tham salt with a progestagen pessary. *Anim. Prod.* 39:229-233.
- ✓ Ishwar, A.K. and M.A. Memon. 1996 Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rumin. Res.* 19:35-43.
- Lahlou-Kassi, A. and J.C. Mariana. 1984. Ovarian follicular growth during oestrous cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate, the D' Man and the Timahdite. *J. Reprod. Fert.* 72:301-310.
- Leyva, V., B.C. Buckrell and J.S. Walton. 1999. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*. 50:395-416.
- Lopez-Sebastian, A., Y. Cognie, M.J. Cocero, J. De La Fuente and N. Poulin. 1990. Effect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. *Theriogenology*. 34:175-180.
- Lopez-Sebastian, A., D.B. Gonzalez, M.J. Santiago, A. Gomez-Brunet, E.C. Townsend and E.K. Inskeep. 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48:279-291.
- Mattner, P.E. and A.W. Braden. 1972. Secretion of oestradiol-17 by the ovine ovary during the luteal phase of the oestrous cycle in relation to ovulation. *J. Reprod. Fert.* 28:136-137.
- McEvoy, T.G., J.J. Robinson, R.P. Aitken, P.A. Findlay, R.M. Palmer and I.S. Robertson. 1995. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.* 39:89-107.
- McIntosh, J.E., R.M. Moor and W.R. Allen. 1975. Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Reprod. Fert.* 44:95-100.
- McNatty, K.P., M. Gibb, C. Dobson, K. Ball, J. Coster, D. Heath and D.C. Thurley. 1982. Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. *J. Reprod. Fert.* 65:111-123.

- Mitchell, L.M., M.E. King, R.P. Aitken, F.E. Gebbie and J.M. Wallace. 1999. Ovulation, fertilization and lambing rates, and peripheral progesterone concentrations in ewes inseminated at a natural oestrus during November or February. *J. Reprod. Fert.* 115:133-140.
- Mitchell, L.M., W.S. Dingwall, M.J.A. Mylne, J. Hunton, K. Matthews, F.E. Gebbie, G.J. McCallum and T.G. McEvoy. 2002. Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 74:163-174.
- Moor, R.M., J.C. Osborn and I.M. Crosby 1985. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fert.* 74:167-172.
- Monniaux, D., Chupin D. and J. Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19:55-81.
- Monniaux, D. and C. Pisselet. 1992. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor I and follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biol. Reprod.* 46:109-119.
- Mutiga, E.R. and E. Mukasa-Mugerwa. 1992. Effect of the method of estrus synchronization and PMSG dosage on estrus and twinning in Ethiopian Menze sheep. *Theriogenology*. 38:727-734.
- 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.
- Ortavant, R., J. Pelletier, J.P. Ravault, J. Thimonier and P. Volland-Nail. 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. 7:305-345.
- Oyediji, G.O., M.O. Akusu and G.N. Egbunike. 1990. Comparative studies on the effectiveness of Sil-estrus implants, Veramix sheep sponges and Prostaglandin F₂ α in synchronizing estrus in West African Dwarf sheep. *Theriogenology*. 34:613-618.
- Picazo, R.A., M.J. Cocero, M.L. Barragán and A. López Sebastián. 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology*. 45:1065-1073.

- Picton, H.M. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. 55:1193-1210.
- Rangel-Santos, R., M.F. McDonald and G.A. Wickham. 1991. Evaluation of the feasibility of a juvenile MOET scheme in sheep. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 51:139-142.
- Ravindra, J. P., N.C. Rawlings, A.C.O. Evans and G.P. Adams. 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 101:501-509.
- Rhodes, L. and P.W. Nathanielsz. 1988. Comparison of a controlled internal drug release device containing progesterone with intravaginal medroxyprogesterone sponges for estrus synchronization in ewes. *Theriogenology*. 30:831-836.
- Riddell, M.G., D.F. Wolfe and D.A. Stringfellow. 1988. Superovulation of sheep during the spring and summer in the southeastern United States. *Theriogenology*. 29:297 (Abstract).
- Rubianes, E., R. Ungerfeld, C. Viñoles, A. Rivero and G.P. Adams. 1997. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 47:1479-1488.
- Ryan, J.P., R.J. Bilton, J.R. Hunton. and W.M.C. Maxwell. 1984. Superovulation of ewes with a combination of PMSG and FSH-P. In: *Reproduction in Sheep*, pp 338-341. Eds. D.R. Lindsay and D.T. Pearce. Cambridge University Press.
- Scaramuzzi, R.J. and B.K. Campbell. 1990. Physiological regulation of ovulation rate in the ewe: a new look at an old problem. *School of Agriculture (Animal Science) Reproductive Physiology of Merino sheep-concepts and consequences* (The University of Western Australia, Perth 6009) 327 p.
- Schrick, F.N., R.A. Surfase, 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. 1992. A comparison of priming with two dosages of fluorogestone acetate in pessaries on the quality of embryos recovered from superovulated ewes. *Theriogenology*. 37:445-456.

- Scudamore, C.L., J.J. Robinson, R.P. Aitken and I.S. Robertson. 1993. The effect of method of oestrous synchronisation on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. *Animal Reprod. Sci.* 34:127-133.
- Smeaton, T.C. and H.A. Robertson. 1971. Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fert.* 25:243-252.
- Smith, J.F., J. Parr and B.J. Mortimer. 1989. Comparison of two intravaginal devices on the reproductive performance of ewes throughout the year. *Aust. Soc. Reprod. Biol.* pp 97 (Abstract).
- Tassel, R., J.P. Kennedy, B.M. Bindon and L.R. Piper. 1983. Ovarian follicles of new born Merino lambs from genetic lines which differ in fecundity. *Aust. J. Biol. Sci.* 36:351-356.
- 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 and G. Colas. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-p. *Theriogenology.* 27:407-419.
- Turnbull, K.E., A.W.H Braden. and P.E. Mattner. 1977. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.* 30:229-241.
- Víñoles, C., G. Banchemo and E. Rubianes. 1999. Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. *Theriogenology.* 51:437-442.
- Vivanco, H.W. 1998. Transferencia embrionaria en ovinos y caprinos. In: *Memorias del Seminario Internacional: Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos.* Chapingo, México 26 y 27 de Octubre, pp 43-92.
- Yenicoye, A., J.C. Mariana and G. Celeux. 1989. Follicular growth during the oestrous cycle in Peul sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 21:201-211.
- Webb, R. and D. McBride. 1991. Control of the proliferation of granulosa cells from small ovine follicles. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43:229-230.

- Wheeler, A.G. and R.B. Land. 1977. Seasonal variation in oestrous and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. *Anim. Prod.* 24:363-376.
- Zeron, Y., D. Sklan and A. Arav. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Molecular Reprod. Dev.* 61:271-278.

CAPÍTULO 3

EFFECTO DE RAZA EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE OVEJAS SUPEROVULADAS*

Effect of breed on embryo production in superovulated ewes

**Alfredo Rodríguez Moreno¹, Raymundo Rangel Santos^{2§}, Raymundo Rodríguez de
Lara² y Carlos Sánchez del Real²**

*Para ser sometido a la revista

¹Parte de la tesis de Maestría en Ciencias en Producción Animal del primer autor.

²Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Chapingo, México.

[§] Autor a quien se le deberá enviar correspondencia. E-mail: rangelsr@prodigy.net.mx

EFECTO DE RAZA EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE OVEJAS SUPEROVULADAS

RESUMEN

Rodríguez M. A., Rangel S. R., Rodríguez de L. R. y Sánchez del R. C.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la raza de la donadora en la tasa de ovulación, la tasa de recuperación embrionaria y la cantidad de embriones transferibles en ovejas superovuladas. Se utilizaron un total de 51 ovejas donadoras de tres grupos raciales (24 Dorper, 18 Charollais y 9 East Friesian), las cuales fueron superovuladas de marzo a diciembre de 2002. Las ovejas se sincronizaron con esponjas intravaginales, conteniendo 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA; Chronogest, Intervet®), manteniéndose por 12 días junto con 75 µg de prostaglandina F2α (Prosolvin C, Intervet®) por donadora, aplicada el día 10, considerando como día 0 el día de la inserción de la esponja. La superovulación consistió de ocho dosis decrecientes (50, 50, 40, 40, 30, 30, 20 y 20 mg) de FSH (Folltropin, VetrepHarm®, dosis total = 280 mg), por donadora vía intramuscular, aplicadas a intervalos de 12 horas, iniciando el día 10, 60 h antes de retirar la esponja y terminando 24 h después de su retiro. Las ovejas fueron inseminadas intrauterinamente por laparoscopia utilizando semen fresco de sementales de la misma raza que las donadoras y de fertilidad conocida. La recolección embrionaria se realizó el día 7 después del celo, al mismo tiempo se determinó la tasa de ovulación por laparotomía media ventral. Los embriones fueron evaluados por características morfológicas. Se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre la raza Charollais y Dorper (18.16 ± 0.99 vs 10.70 ± 0.86 cuerpos lúteos) en la tasa de ovulación, sin diferencias ($P > 0.05$) en la tasa de ovulación entre las razas Charollais y East Friesian (18.16 ± 0.99 vs 14.44 ± 1.41), ni entre las razas East Friesian y Dorper (14.44 ± 1.41 vs 10.70 ± 0.86). La tasa de recuperación embrionaria no mostró diferencias significativas entre las tres razas evaluadas (Charollais, 75.76 ± 8.6 ; Dorper, 63.61 ± 7.5 ; East Friesian 56.09 ± 12.2). El número de embriones transferibles fue superior ($P < 0.05$) en ovejas Charollais (11.5 ± 0.70) comparativamente con ovejas Dorper (3.1 ± 0.67), sin embargo, no existió diferencia ($P > 0.05$) entre las razas Charollais y East Friesian (11.5 ± 0.70 vs 6.0 ± 0.79), así como entre las razas East Friesian y Dorper (6.0 ± 0.79 vs 3.1 ± 0.67). Los resultados muestran diferencias entre razas en su capacidad de respuesta al tratamiento de superovulación utilizado.

Palabras clave: razas ovinas, superovulación, embriones.

ABSTRACT

Alfredo Rodríguez Moreno

EFFECT OF BREED ON EMBRYO PRODUCTION IN SUPEROVULATED EWES

(SEPTEMBER 2004)

(Under the direction of Ph.D. Raymundo Rangel Santos).

The objective of the study was to evaluate the effect of donor breed on ovulation rate, embryo recovery rate, and number of transferable embryos in superovulated ewes. Fifty one ewes from three breeds (24 Dorper, 18 Charollais and 9 East Friesian) were superovulated from March to December of 2002. The ewes were synchronized with vaginal sponges containing 40 mg of fluorogestone acetate (FGA; Chronogest, Intervet) inserted for 12 days together with 75 µg of prostaglandins (Prosolvin, Intervet) per donor administered on day 10, considering as day 0 the day of sponge insertion. The FSH for superovulation was administered every 12 hours during 4 days through 8 intramuscular injections in a descending protocol (50,50,40,40,30,30,20, and 20 mg). The treatment started on day 10, 60 hours before sponge removal and finished 24 hours after. The ewes were inseminated by laparoscopy with fresh semen from a ram of the same breed of the donor with known fertility. Embryo recovery was attempted on day 7 after estrus and ovulation rate was determined through mid ventral laparotomy at the same time. The embryos were evaluated taking into consideration morphological characteristics. There were significant differences ($P<0.05$) in the ovulation rate between Charollais and Dorper ewes (18.16 vs 10.70), but the differences were not significant ($P>0.05$) between Charollais and East Friesian ewes (18.16 vs 14.44) or between East Friesian and Dorper (14.44 vs 10.70) ewes. There were no significant differences in embryo recovery rate between the three breeds considered (Charollais, 75%; Dorper, 63%; East Friesian 56%). The number of transferable embryos was higher ($P<0.05$) in Charollais (11.5) compared with Dorper ewes (3.1), however, there were no significant differences between Charollais and East Friesian ewes (11.5 vs 6.0), or between East Friesian and Dorper ewes (6.0 vs 3.1). The results showed differences between breeds in the response to the superovulatory treatment administered.

Key words: sheep breeds, superovulation, embryos.

INTRODUCCIÓN

El interés por utilizar razas especializadas en la producción, con gran capacidad de adaptación a un determinado ritmo de producción o condición ambiental, ha venido incrementando la demanda por razas exóticas con dichas cualidades, como es el caso de las razas Dorper, East Friesian y en menor medida Charollais, lo cual se vio reflejado al iniciar la importación de estas razas en la década pasada.

La alternativa para cubrir esa demanda, de manera menos costosa y en un corto plazo, es mediante la implementación de programas de superovulación y transferencia de embriones, con lo cual se puede cubrir en gran medida la demanda interna, así como proporcionar a los ovinocultores nacionales alternativas para seleccionar la raza más idónea acorde a los objetivos de cada explotación. Sin embargo, el principal factor que limita el potencial de los programas que involucran la ovulación múltiple y la transferencia de embriones, es la dificultad para obtener suficientes embriones de buena calidad (Torres *et al.*, 1987; Cognie, 1999). A pesar de los esfuerzos realizados en el manejo animal, el uso de gonadotropinas así como los protocolos para su administración, se ha observado que existe una gran variabilidad en la respuesta a tratamientos de superovulación, convirtiéndose en la mayor limitante en la industria de la transferencia de embriones en ganado ovino (Cognie, 1999). La alta variabilidad ha sido asociada con diferentes factores, entre ellos la raza de la donadora, así como a factores intrínsecos tales como el número de folículos en desarrollo presentes en el ovario de la donadora al momento de iniciar el tratamiento de superovulación (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000, 2002a). Resultados de la literatura reportan respuestas entre 0 y 20 embriones por animal superovulado, con un promedio de 4 a 6 embriones por lavado (Torres *et al.*, 1987; Rangel, 1998) y de 2 a 3 gestaciones por tratamiento (Gutiérrez y Zarco, 1998). Los resultados de 9,000 ovejas superovuladas en Nueva Zelanda realizadas durante 6 años, mostraron que el efecto de la raza de las donadoras explicó el 30% de la variación en la respuesta superovulatoria (Vivanco, 1998), afectando la tasa de ovulación, la tasa de recolección embrionaria así como la tasa de embriones transferibles. Específicamente el porcentaje de embriones de buena calidad fue ampliamente influenciado por la raza (Vivanco *et al.*, 1994).

El efecto racial reflejado en la respuesta superovulatoria utilizando gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), fue observado en ovejas de diferente prolificidad, siendo mayor la tasa de ovulación en ovejas con alta prolificidad que en ovejas de baja prolificidad (Cahill y Dufour, 1979). Resultados similares fueron observados en ovejas Romney seleccionadas para alta prolificidad (Smith, 1976), presentando un mayor número de ovulaciones comparadas con ovejas de baja prolificidad. Así mismo, en los resultados reportados por Bindon *et al.* (1971) y Piper *et al.* (1982), la respuesta ovárica en ovejas Merino seleccionadas por alta incidencia de partos múltiples, fue tres veces mayor que en ovejas seleccionadas por baja incidencia de partos múltiples.

Respuestas diferentes en tasa de ovulación también han sido reportadas al superovular ovejas Préalpes, Lacaune y Romanov x Préalpes (Torres *et al.*, 1987), Chios y East Friesian (Boscos *et al.*, 1997) y ovejas Churra, Merina y Manchega (Picazo *et al.*, 1996). Las diferencias también han sido observadas en el número de embriones recolectados y el número de embriones transferibles. Por otro lado, diferencias entre razas prolíficas (Romanov) y no prolíficas (Il-de-France), ha sido asociado con mayor sensibilidad a gonadotropinas de los folículos en la fase temprana de crecimiento en ovejas prolíficas, permitiendo el crecimiento de dichos folículos a pesar de la disminución de los niveles de FSH circulante (Abdennebi *et al.*, 1999).

La incapacidad de obtener un gran número de embriones viables provenientes de hembras selectas, como resultado de la variabilidad en la respuesta ovárica a la administración de hormonas exógenas limita la capacidad para incrementar la eficiencia reproductiva y al mismo tiempo restringe el mejoramiento genético (Webb *et al.*, 1999). La disponibilidad de información relacionada a la cantidad y calidad de embriones que produce una raza de interés es de suma importancia, ya que de ello puede depender el éxito o fracaso de un programa de transferencia de embriones, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de raza en las variables tasa de ovulación, tasa de recolección embrionaria y la producción de embriones transferibles en ovejas superovuladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales, manejo y tratamiento

Se utilizaron un total de 51 hembras de raza pura, de tres grupos raciales: Dorper (n=24), Charollais (n=18) y East Friesian (n=9), de 3 a 4 partos, de 4 años de edad y peso vivo promedio de 90, 95 y 75 kg, respectivamente. El estudio se llevó a cabo de marzo a diciembre de 2002, en una explotación comercial del estado de Querétaro, México. Los animales permanecieron en confinamiento total, recibiendo una alimentación a base de alfalfa y paja de avena molidos, suplementados con sales minerales y 400 g diarios por animal de un concentrado comercial conteniendo 14% de proteína cruda. El estro se sincronizó con esponjas intravaginales conteniendo 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA; Chronogest, Intervet®), manteniéndose por un periodo de 12 días (Baríl *et al.*, 1995). Se aplicaron 75 µg de prostaglandina F2α (Prosolvín C, Intervet®) por donadora el día 10 después de colocada la esponja coincidiendo con la primera aplicación de FSH. La superovulación consistió de cuatro pares de dosis decrecientes (50, 50, 40, 40, 30, 30, 20 y 20 mg) de FSH (Folltropín, VetrepHarm®, dosis total = 280 mg), por donadora vía intramuscular, aplicadas en intervalos de 12 horas, iniciando el día 10, 60 h antes de retirar la esponja y terminando 24 h después de retirar la esponja. El retiro de la esponja coincidió con la sexta aplicación de FSH. La detección de estros se realizó a las 24, 30 y 36 horas después de retirar la esponja, en periodos de 30 minutos por observación con el apoyo de machos vasectomizados. Se utilizó semen fresco extraído mediante vagina artificial de sementales de la misma raza que las hembras y de fertilidad conocida. La inseminación se realizó aproximadamente 18 h después de la detección del estro, mediante inseminación intrauterina vía laparoscopia (Mckelvey *et al.*, 1985). Se utilizaron dos dosis de semen por donadora, una por cuerno uterino, la concentración por dosis fue 100×10^6 de espermatozoides contenida en 0.25 ml. La colección de embriones se realizó a los siete días, tomando como día cero el día del estro, de manera quirúrgica, por medio de una laparotomía media ventral y mediante el lavado de los cuernos uterinos (Mckelvey *et al.*, 1985). Los embriones se evaluaron en base a sus características morfológicas, utilizando un microscopio estereoscópico y se clasificaron

como embriones transferibles (de buena calidad) o embriones con anormalidades y óvulos, utilizando el criterio descrito por Lindner y Wright (1983).

2. Variables evaluadas

La incidencia y distribución de estros se determinó mediante el número de hembras que manifestaron comportamiento de estro en relación al número de animales que recibieron tratamiento, con observaciones a las 24, 30 y 36 horas después de retirada la esponja intravaginal.

La tasa de ovulación se determinó al momento de colectar los embriones, contando el número de cuerpos lúteos en los ovarios con apoyo de un laparoscopio (Quirke *et al.*, 1985).

La tasa de recuperación embrionaria se calculó dividiendo el número de estructuras embrionarias recuperadas entre el número de cuerpos lúteos observados, multiplicado por cien.

Los embriones obtenidos que fueron de buena calidad se clasificaron como transferibles, mientras que los no transferibles fueron aquellos que sus características morfológicas no eran las ideales y/o no cubrían los requisitos para ser transferidos.

3. Análisis estadístico

El diseño experimental fue un completamente al azar con diferente número de repeticiones y el modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

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

Donde Y_{ij} es la variable respuesta, μ es la media poblacional, T_i es el efecto fijo de la i -ésima raza y E_{ij} es el error experimental asociado con la j -ésima observación en la i -ésima raza, $E_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$

Se observó que los valores de las variables provenían de una distribución normal y presentaban homogeneidad de varianzas, después de ser analizados con la prueba de

Ostle (Said y Zárate, 1984) y de Bartlett (Steel y Torrie, 1988) respectivamente, por lo cual fueron analizados mediante el procedimiento GLM del paquete computacional SAS (2001). Los resultados de tasa de recuperación embrionaria fueron analizados utilizando la transformación angular, al no observar diferencias ($P < 0.05$) se analizaron utilizando los datos originales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 100% de las esponjas fueron retenidas, resultados similares a los reportados por otros investigadores en ovejas superovuladas (D'Alessandro *et al.*, 1996) y no superovuladas (Simonetti *et al.*, 2000; Avila, 2001; Hernández, 2003).

La incidencia de estros fue similar para las tres razas evaluadas, observándose que el 100% de las ovejas evaluadas manifestaron signos de estro. Los resultados son superiores a los encontrados por D'Alessandro *et al.* (1996) y Gonzalez-Bulnes *et al.* (2002c), quienes reportaron entre 87-93% y 88.8% de ovejas en celo, respectivamente. El total de las ovejas Charollais (18) y East Friesian (9) manifestaron estro 24 h después de retirada la esponja, lo que coincide con los resultados reportados por Torres *et al.* (1987). En donadoras de la raza Dorper se observó una manifestación estral del 90.9% (22/24) a las 24 h después de retirada la esponja y el restante 9.1% se observó a las 30 h, siendo semejantes a los reportados por Gonzalez-Bulnes *et al.* (2002b), observándose una distribución estral entre las 26 y 38 h después de retirado el progestágeno.

1. Tasa de ovulación

Los resultados del presente estudio muestran efecto significativo de raza sobre la tasa de ovulación, el número de embriones recuperados y el porcentaje de embriones transferibles. Los resultados de tasa de ovulación en las tres razas evaluadas se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tasa de ovulación (TO) en tres razas ovinas superovuladas

Raza	No. de ovejas	Cuerpos lúteos totales	Medias de TO $\pm$ E. E.
Charollais	18	327	18.16 $\pm$ 0.99 a
East Friesian	9	130	14.44 $\pm$ 1.41 ab
Dorper	24	257	10.70 $\pm$ 0.86 b

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La tasa de ovulación en ovejas Charollais (18.16 ± 0.99) y East Friesian (14.44 ± 1.41) no fue diferente ($P > 0.05$), posiblemente debido a que ambas razas presentan una prolificidad similar. En este respecto, Fhamy (1994; 1996), reporta una prolificidad de 1.8 a 2.2 en ovejas Charollais y en el caso de ovejas East Friesian Shrestha *et al.* (1982), Berger y Thomas, (1994) y Fhamy, (1996) indican una prolificidad de 2.1 a 2.3. La tasa de ovulación entre ovejas Charollais y Dorper fue diferente estadísticamente ($P < 0.05$), presentando valores de 18.16 ± 0.99 y 10.70 ± 0.86 , respectivamente. Las diferencias observadas pueden estar asociadas a diferencias en prolificidad entre las razas. La prolificidad en ovejas Dorper es de 1.4 a 1.5 (Elias *et al.*, 1985; Cloete *et al.*, 2000) comparativamente con una prolificidad de 1.8 a 2.2 en ovejas Charollais (Fhamy, 1994; 1996).

Los resultados obtenidos por Van Zyl *et al.* (1987), muestran contrariedad a los obtenidos en el presente, debido a que dichos autores obtuvieron 18.2 cuerpos lúteos en ovejas Dorper, superovuladas con 24 mg de FSH. Sin embargo, en dicho estudio solo cinco ovejas fueron superovuladas, limitando la interpretación de los resultados.

Driancourt *et al.* (1986; 1990), reportaron una tasa de ovulación dos a cuatro veces mayor en razas con prolificidad alta comparativamente con ovejas de prolificidad baja, lo cual fue asociado con diferente número total de folículos antrales (Lahlou-Kassi y Mariana, 1984), condición que pudo influir en el presente estudio debido a que las ovejas evaluadas cuentan con distinta prolificidad de manera natural, siendo las ovejas East Friesian y Charollais consideradas como razas prolíficas y la raza Dorper considerada de baja prolificidad, con lo cual los resultados pueden atribuirse a diferencias en prolificidad entre las razas consideradas. Dichos resultados han sido

reconfirmados en estudios más recientes (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002a), donde se ha podido constatar que la tasa de ovulación obtenida a la aplicación de FSH exógena y el número de embriones recuperados, fue correlacionada con el número total de folículos antrales pequeños (2 y 3 mm de diámetro) presentes en el ovario al inicio del tratamiento superovulatorio. Los mismos autores en otro estudio (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002b), reportan que los cambios en la población folicular pueden estar relacionados a un incremento en la tasa de reclutamiento folicular durante las primeras 36 h del tratamiento hormonal y a una tasa de regresión folicular menor durante las primeras 24 h. En general los resultados muestran que una oveja con mayor cantidad de folículos antrales podrá manifestar una mayor respuesta a la aplicación exógena de FSH.

Los resultados de tasa de ovulación del presente estudio pueden considerarse buenos ya que duplicaron los obtenidos por Boscos *et al.* (1997), quienes encontraron 7 cuerpos lúteos en ovejas East Friesian superovuladas. Por otro lado, diferencias en la respuesta ovulatoria entre ovejas prolíficas (Romanov) y no prolíficas (Il-de-France) ha sido asociada con diferencias en la cantidad de receptores a gonadotropinas a nivel ovárico, ocasionando diferencias en la sensibilidad de los folículos en la fase temprana de crecimiento a la acción de gonadotropinas, permitiendo el crecimiento de estos folículos a pesar de la disminución de los niveles de FSH circulante (Abdennebi *et al.*, 1999). La reducida disponibilidad de información en ovejas Charollais limita poder realizar comparaciones apropiadas. Sin embargo, la tasa de ovulación puede considerarse apropiada comparativamente con la tasa de ovulación obtenida en otras razas cárnicas de características similares tales como ovejas Texel (Tervit *et al.*, 1991), Ile de France (Torres *et al.*, 1987) y Merino (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000).

2. Tasa de embriones recuperados

La tasa de recuperación embrionaria no mostró diferencias ($P>0.05$) entre las tres razas evaluadas. Los resultados de la tasa de recuperación embrionaria se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tasa de recuperación embrionaria (TRE) en tres razas ovinas superovuladas

Raza	No. de ovejas	Cuerpos lúteos totales	Estructuras recuperadas	TRE (%) ± E. E.
Charollais	18	327	252	75.76 ± 8.6 a
Dorper	24	257	153	63.61 ± 7.5 a
East Friesian	9	130	75	56.09 ± 12.2 a

Líterales similares en la misma columna no indican diferencias significativas ($P>0.05$).

La ausencia de diferencias significativas entre razas puede estar relacionada a la cantidad de superovulaciones realizadas en el presente estudio. Resultados de 9000 superovulaciones (Vivanco *et al.*, 1998), reportaron efecto significativo de la raza de la donante dentro de cada año evaluado.

La tasa de recuperación de embriones en el presente estudio tiende a ser mayor en ovejas Charollais comparativamente con ovejas Dorper y East Friesian, sin embargo las diferencias no fueron significativas. Vivanco *et al.* (1998), también reportaron que la “calidad del cuerpo lúteo” fue el factor que más explicó la variabilidad total observada en tasa de recolección, siendo responsable del 34% de la variación total observada. La presencia de folículos de más de 5mm de diámetro al momento de la colección redujo significativamente la tasa de recolección de embriones. Similarmente Gonazalez-Bulnes *et al.* (2002a), observaron que la presencia de un folículo grande afectó negativamente el número y la viabilidad de embriones recuperados.

Los resultados publicados por Boscos *et al.* (1997), reportan un 60.8% de recuperación embrionaria para la raza East Friesian, el cual es similar al 56% obtenido en el presente estudio, sin embargo, son bajos si se comparan con los obtenidos en otros estudios utilizando ovejas lecheras, como es el caso de ovejas Chios con un 70% de recolección embrionaria (Boscos *et al.*, 1997), 74 y 83% en ovejas Manchega y Churra, respectivamente (Picazo *et al.*, 1996) y 86% en ovejas Lacaune (Torres *et al.*, 1987).

La reducida disponibilidad de resultados en ovejas Charollais y Dorper, limita realizar comparaciones apropiadas, sin embargo, la raza Charollais obtuvo una tasa de

recuperación embrionaria del 75.76% superior al 60% reportado por Tervit *et al.* (1991) en ovejas Texel, mientras que la raza Dorper presentó un 63.61% de recuperación embrionaria, la cual se puede considerar aceptable.

Las diferencias aritméticas en los tres grupos de ovejas evaluadas, pueden estar relacionados con alteraciones en desarrollo folicular y maduración de ovocitos como la presencia de folículos luteinizados sin ovular (Monniaux *et al.*, 1983) o a deficiencias en la liberación de ovocitos fertilizados (Stock *et al.*, 1996), así como en desarrollo embrionario temprano por deficiencias propias del embrión o en el ambiente oviducto-uterino (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002a).

3. Embriones transferibles

Los resultados del número de embriones transferibles se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Embriones transferibles (ET) en tres razas ovinas superovuladas

Raza	No. de ovejas	Embriones recuperados	Embriones transferibles (%)	Medias de ET ± E. E.
Charollais	18	252	231 (91.6)	11.5 ± 0.70 a
East Friesian	9	75	68 (90.6)	6.0 ± 0.79 ab
Dorper	24	153	110 (71.9)	3.1 ± 0.67 b

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

El número de embriones transferibles no fue diferente ($P > 0.05$) entre las razas Charollais y East Friesian, aún cuando prácticamente fue duplicada la cantidad de embriones transferibles en la raza Charollais (11.5 ± 0.70) comparativamente con la raza East Friesian (6.0 ± 0.79).

La diferencia numérica observada entre las razas Charollais y East Friesian puede estar relacionada principalmente a la menor tasa de recolección embrionaria que se observó para ovejas de esta última raza. Al respecto, existen resultados de autores que muestran que algunos de los folículos que fueron estimulados a crecer hasta la ovulación mediante la aplicación de FSH exógena, estaban probablemente en etapa temprana de

atresia, debido a que no existió relación entre ellos y el número final de embriones viables (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002a), existiendo resultados que mencionan que el rescate de folículos en inicio de atresia, está asociado con desarrollo folicular inadecuado y alteraciones en la ovulación (Rubianes *et al.*, 1997), siendo ésta probablemente la causa del menor número de embriones transferibles en ovejas East Friesian.

El 90.6% de embriones transferibles en ovejas East Friesian, es superior a los reportados por Boscos *et al.* (1997) quienes reportan un 82.0% de embriones transferibles. El promedio de 6.0 embriones transferibles del presente estudio no superó los resultados obtenidos por Mejía *et al.* (2001), quienes obtuvieron un promedio de 8.4 a 9.5 embriones transferibles en ovejas East Friesian superovuladas utilizando diferentes protocolos.

La raza Charollais presentó un 91.6% de embriones transferibles superando los resultados de Tervit *et al.* (1991) quienes reportaron un 75% de embriones transferibles en ovejas Texel. La alta tasa de ovulación y la mayor cantidad de embriones transferibles en ovejas Charollais es difícil explicarse, sin embargo, aunque en forma subjetiva, se pudo observar que dichos animales presentaban cuernos uterinos más grandes comparativamente con las otras dos razas, condición que pudo favorecer a la raza Charollais considerando que el número de corderos nacidos está en función de la tasa de ovulación, la tasa de fertilización y la tasa de sobrevivencia embrionaria (Schoenian y Burfening, 1990), lo que a su vez está determinado en gran medida por la capacidad física y fisiológica del útero.

La cantidad de embriones transferibles fue mayor ($P < 0.05$) entre ovejas Charollais comparativamente con ovejas Dorper. La baja cantidad de embriones transferibles en la raza Dorper pudo estar relacionada a factores asociados con la superovulación, como puede ser alteraciones en los perfiles hormonales que posteriormente afectaron el transporte de los ovocitos en el tracto genital (Holst y Braden, 1972; Evans y Armstrong, 1984; Wilmut *et al.*, 1985), lo que pudo ocasionar fallas en la ovulación (Kafi y McGowan, 1997), fallas en la fertilización o alteraciones en

*

el desarrollo embrionario temprano. Los embriones degenerados no siguen los patrones normales de transporte en el útero y frecuentemente son desintegrados rápidamente (Foote y Ellington, 1988), por lo cual al menos en parte, podría explicar la baja cantidad de embriones transferibles obtenidos. Resultados de ovulaciones múltiples realizadas en ovejas utilizando FSH, indican que esta hormona incrementa el número de folículos en desarrollo y el número de ovocitos saludables durante la época reproductiva y de anestro (Torres *et al.*, 1987; Stenbak *et al.*, 2001), por lo cual se pudiera descartar la posibilidad de que los embriones producidos en ovejas Dorper fueran de mala calidad.

*

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que las ovejas donadoras de la raza Charollais presentaron la mayor tasa de ovulación y la mayor cantidad de embriones transferibles, seguida por la raza East Friesian y Dorper. No existió diferencia significativa para la tasa de recuperación embrionaria entre las tres razas evaluadas. Las diferencias raciales en tasa de ovulación y cantidad de embriones transferibles conllevan a una respuesta diferencial a la administración de gonadotropinas exógenas.

LITERATURA CITADA

- Abdennebi, L., P. Monget, C. Pisselet, J.J. Remy, R. Salesse and D. Monniaux. 1999. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biol. Reprod.* 60:845-854.
- Avila, O.J.G. 2001. Comparación de dos progestágenos en la sincronización de celos en ovejas Pelibuey. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo. 67 p.
- Baril, G., P. Brebion y P. Chesne. 1995. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Estudio FAO 115. Producción y Sanidad Animal. 175 p.
- Berger, M.Y. and L.D. Tomas. 1994. Survival, growth and feed efficiency of $\frac{1}{4}$ East Friesian lambs. *The Shepherd.* 39:36-37.
- Bindon, B.M., T.S. Ch'ang and H.N. Turner. 1971. Ovarian response to gonadotrophin by Merino ewes selected for fecundity. *Aust. J. Agric. Res.* 22:809-820.
- Boscos, C., E. Vainas, T. Kouskoura, F. Samartzi, D. Vafiadis and S. Dellis. 1997. Superovulatory response of Chios and Friesian ewes to two FSH-p dose levels. *Reprod. Dom. Anim.* 32:195-198.
- Cahill, L.P. and J. Dufour. 1979. Follicular populations in the ewe under different gonadotrophin levels. *Annales de Biologie Animale Biochime Biophysique.* 19:1475-1481.
- Cloete, S.W.P., M.A. Snyman and M.J. Herselman. 2000. Productive performance of Dorper sheep. *Small Rumin. Res.* 36:119-135.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology.* 51:105-116.
- D'Alessandro, A., G. Martemucci, F. Totoda, M. Gambacorta. and A. Manchisi. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a comercial p-FSH. *Small Rumin. Res.* 19:255-261.
- Driancourt, M.A., I.K. Gauld, M. Terqui and R. Webb. 1986. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.* 78:565-575.

- Driancourt, M.A., F. Castonguay, B.M. Bindon, L.R. Piper, J.F. Quirke and J.P. Hanrahan. 1990. Ovarian follicular dynamics in lines of sheep (Finn, Merinos) selected on ovulation rate. *J. Anim. Sci.* 68:2034-2041.
- Elias, E., Cohen D. and P. Daynoff. 1985. Characteristics and indices of reproduction in Dorper sheep. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 56:127-130.
- Evans, G. and D.T. Armstrong. 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fert.* 70:47-53.
- Fahmy, M.H. 1994. The Charollais breed lands in North America. *The Shepherd.* 39:10-13.
- Fahmy, M.H. 1996. Prolific sheep. Research Branch Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville Dairy and Swine Research and Development Centre, Quebec, Canada. CAB International. 542 p.
- Foote, R.H. and J.E. Ellington. 1988. Is a superovulated oocyte normal?. *Theriogenology.* 29:111-123.
- Gonzalez-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero and A. Lopez-Sebastian. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology.* 54:1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero, C.J.H. Souza, N.P. Groome, R.M. Garcia-Garcia, A. Lopez-Sebastian and D.T. Baird. 2002a. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology* 57:1263-1272.
- Gonzalez-Bulnes, A., R.M. Garcia-Garcia, C.J.H. Souza, J. Santiago-Moreno, A. Lopez-Sebastian, M.J. Cocero and D.T. Baird. 2002b. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Dom. Anim.* 37:357-361.
- Gonzalez-Bulnes, A., R.M. Garcia-Garcia, J. Santiago-Moreno, A. Lopez-Sebastian and M.J. Cocero. 2002c. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology.* 58:1607-1614.

- Gutiérrez, A.C.G. y Q.L.A. Zarco. 1998. Clonación: la nueva frontera en biotecnología de la reproducción. In: Memorias del Seminario Internacional, Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Producción de Ovinos y Caprinos. Chapingo, México 26 y 27 de octubre, pp 111-134.
- Hernández, L.G. 2003. Comportamiento reproductivo de ovejas Pelibuey con diferente tasa de ovulación. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo. 70 p.
- Holst, P.J. and A.W.H. Braden. 1972. Ovum transport in the ewe. *Aust. J. Biol. Sci.* 25:167-173.
- Kafi, M. and M.R. McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48:137-157.
- Lahlou-Kassi, A. and J.C. Mariana. 1984. Ovarian follicular growth during the oestrus cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate, the D'man and the Timahdite. *J. Reprod. Fert.* 72:301-310.
- Lindner, M.G. and W.R. Wright Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20:407-416.
- McKelvey, W.A.C., J.J. Robinson and R.P. Aitken. 1985. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*. 24:519-535.
- Mejía, V.O., T.M. Cornejo, G.M. García, G.S. Arellano, M.J. Cervantes, M.R. Angulo, H.A. Ortiz, F.J. Dávalos y I.J. Hernández. 2001. Protocolos de superovulación en ovejas lecheras East Friesian. 2º Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Ovinocultura. 22 al 25 de mayo, Mérida Yuc.; México.
- Monniaux, D., D. Chupin and J. Saumande. 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*. 19:55-81.
- Pant, H.C., C. Hopkinson and R.J. Fitzpatrick. 1972. Plasma oestradiol, progesterone and luteinizing hormone concentrations during the ovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 31:501-509.
- Picazo, R.A., M.J. Cocero, M.L. Barragán and A. López Sebastián. 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology*. 45:1065-1073.

- Piper, L.R., B.M. Bindom, Y.M. Curtis, M.A. Cheers and R.D Nethery. 1982. Response to PMSG in Merino and Booroola Merino crosses. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 14:82-89.
- Quirke, J.F., G.E. Bradford, T.R. Famula, and D.T. Torrell. 1985. Ovulation rate in sheep selected for weaning weight or litter size. *J. Anim. Sci.* 61:1421-1430.
- Rangel, S.R. 1998. División de embriones en ovinos. In: *Memorias del Seminario Internacional: Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Producción de Ovinos y Caprinos*. Chapingo, México 26 y 27 de octubre, pp 23-42.
- Rubianes, E., R. Ungerfeld, C. Viñoles, A. Rivero and G.P Adams. 1997. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 47:1479-1488.
- Scudamore, C.L., J.J. Robinson, R.P Aitken. and I.S. Robertson. 1992. A comparison of two dosages of fluorogestone acetate in pessaries on the quality of embryos recovered from superovulated ewes. *Theriogenology*. 37:445-456.
- Simonetti, L., M.R Blanco. and J.C. Gardon. 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small Rumin. Res.* 38:243-247.
- Schoenian, G.S. and P.J. Burfening. 1990. Ovulation rate, lambing rate, litter size and embryo survival of Rambouillet sheep for high and low reproductive rate. *J. Anim. Sci.* 68:2263-2270.
- Shrestha, J.N.B., H.F. Peters and D.P. Heaney. 1982. Growth performance of lambs sired by rams of the East Friesian, Finnish Landrace, Ile de France and Suffolk breeds. *Can. J. Anim. Sci.* 62:689-697.
- Smith, J.F. 1976. Selection for fertility and response to PMSG in Romney ewes. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 36:247-251.
- Stenbak, T.K., D.A. Redmer, H.R. Berginski, A.S. Erickson, C. Navanukraw, M.J. Toutges, J.J. Bilski, J.D. Kirsch, K.C. Kraft, L.P Reynolds. and A.T. Grazul-Bilska. 2001. Effects of follicle stimulating hormone (FSH) on follicular development, oocyte retrieval, and in vitro fertilization (IVF) in ewes during breeding season and seasonal anestrus. *Theriogenology*. 56:51-64.

- Stock, A.E., J.E. Ellington and J.E. Fortune. 1996. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*. 45:1091-1102.
- Tervit, H.R., J.G. Thompson, W.H. McMillan and N.C. Amyes. 1991. Repeated surgical embryo recovery from Texel donor ewes. *Theriogenology*. 35:282 (Abstract).
- Torres, S., Y. Cognie and G. Colas 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-p. *Theriogenology*. 27:407-419.
- Van Zyl, J.G.E., D.F. Stein, W.A. Van Nickerk, R.J. Coertze. and H.T. Groenewald. 1987. Some aspects of superovulation and fertilization of Dorper sheep. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 58:3-4.
- Vivanco, H.W., K.B. Greaney and H. Varela. 1994. Explaining the variability in superovulation responses and yield of transferable embryos in sheep embryo transfers. *Theriogenology*. 41:329 (Abstract).
- Vivanco, H.W. 1998. Transferencia embrionaria en ovinos y caprinos. In: *Memorias del Seminario Internacional: Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. Chapingo, México 26 y 27 de Octubre, pp 63-65.
- Webb, R., R.G. Gosden, E.E. Telfer. and R.M. Moor. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science* 68:257-284.
- Wilmut, I., D.I. Sales and C.J. Ashworth. 1985. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology*. 23:107-119.