



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

SUPLEMENTACIÓN DE α -TOCOFEROL EN DOS GRUPOS RACIALES DE OVEJAS: EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA



Presenta:

Yesenia López Del Valle

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: **Raymundo Rangel Santos, Ph.D.**



Junio 2016

Chapingo, Estado de México

SUPLEMENTACIÓN DE α -TOCOFEROL EN DOS GRUPOS RACIALES DE OVEJAS: EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*

Tesis realizada por **YESENIA LÓPEZ DEL VALLE** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

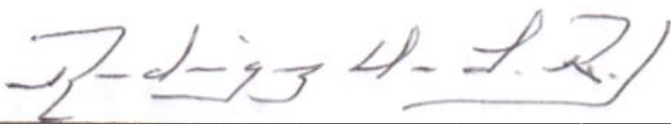
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: Raymundo Rangel S.

Ph. D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 

Dr. CARLOS ANTONIO APODACA SARABIA

ASESOR: 

Ph. D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: 

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Radicales libres	3
2.2 Radicales libres y su impacto en la reproducción.....	4
2.2.1 Los radicales libres y su importancia en el folículo	4
2.2.2 Radicales libres durante el desarrollo embrionario	6
2.3 Importancia de los antioxidantes	7
2.3.1 Los antioxidantes en el desarrollo embrionario.....	8
2.3.2 Importancia de la vitamina E en la reproducción	9
2.4 Importancia del α -tocoferol.....	10
2.5 Superovulación en ovejas.....	11
3. LITERATURA CITADA.....	13
4. SUPLEMENTACIÓN DE α -TOCOFEROL EN DOS GRUPOS RACIALES DE OVEJAS: EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VIVO</i>	21
4.1 Resumen	21
5. α -TOCOPHEROL SUPPLEMENTATION IN TWO RACIAL GROUPS OF EWES: EFFECT ON <i>IN VIVO</i> EMBRYOS PRODUCTION.....	22
5.1 Abstract	22
5.2 Introducción.....	23
5.3 Materiales y métodos	24
5.3.1 Localización	24
5.3.2 Animales	24

5.3.3	Diseño del estudio	24
5.3.4	Manejo alimenticio	24
5.3.5	Protocolo de sincronización y superovulación	24
5.3.6	Inseminación artificial.....	25
5.3.7	Recuperación embrionaria	25
5.3.8	Evaluación embrionaria.....	26
5.3.9	Análisis estadístico	26
5.4	Resultados.....	27
5.4.1	Tasa de ovulación.....	27
5.4.2	Tasa de recuperación embrionaria	28
5.4.3	Tasa de fertilización	29
5.4.4	Calidad embrionaria.....	31
5.5	Discusión.....	32
5.5.1	Tasa de ovulación.....	32
5.5.2	Tasa de recuperación embrionaria	33
5.5.3	Tasa de fertilización embrionaria	33
5.5.4	Calidad embrionaria.....	35
5.6	Conclusiones.....	36
5.7	Literatura citada.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de daño celular inducido por estrés oxidativo (Agarwal y Allamaneni, 2004).....	4
Figura 2. Estructura molecular del α - tocoferol (Azzi, 2007).	10

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Influencia de la raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción en la tasa de ovulación de ovejas superovuladas.	27
Cuadro 2. Efecto de la raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción en el número promedio de estructuras totales recuperadas (EST) y el porcentaje de recuperación embrionaria (% REC) de ovejas superovuladas.	28
Cuadro 3. Efecto de la raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción sobre la tasa de fertilización embrionaria.	30
Cuadro 4. Efecto de raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción sobre la calidad embrionaria.....	31

ABREVIATURAS USADAS

Abreviatura	Significado
ADN	Acido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
°C	Grados centigrados
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cubicos
CO ₂	Dióxido de carbono
CLOD	Cuerpos luteos ovario derecho
CLOI	Cuerpos luteos ovario izquierdo
CLT	Cuerpos luteos totales
ecG	Gonadotropina coriónica equina
EST	Estructuras totales
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHp	Hormona folículo estimulante porcina
g	Gramos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HOCL	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hMG	Gonadotropina menopausal humana
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Kilogramos
MOET	Ovulación múltiple y la transferencia de embriones

μm	Micras
μM	Micromoles
mL	Mililitros
MS	Materia seca
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-k-B	Factores de transcripción
LH	Hormona luteinizante
OD	Ovario derecho
OI	Ovario izquierdo
O_2	Anión superóxido
PV	Peso vivo
% REC	Porcentaje de recuperación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa
Se GPx	Glutación peroxidasa dependiente de selenio
$\text{TNF}\alpha$	Factor de necrosis tumoral
UI	Unidades internacionales

DEDICATORIA

*Dedico esta tesis a mi mamá Rosa María, a mis hermanos Claudia, Omar
Efraín y Emmanuel, y a mis sobrinos Aylín Zoé, Iván Carlos y Karla Sayuri.
Gracias por su apoyo incondicional, porque por ustedes he llegado hasta donde
estoy. Muchas gracias, hermosa familia, los amo...*

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis a:

- Universidad Autónoma Chapingo
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Posgrado en Producción Animal

Al Ph. D. Raymundo Rangel Santos por sus grandes enseñanzas y constancia durante todos estos años de mi formación profesional y por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo de tesis. Muchas gracias.

A los profesores: Dr. Carlos Antonio Apodaca Sarabia, Ph. D. Raymundo Rodríguez De Lara y al Dr. Demetrio Alonso Ambriz García, por sus observaciones y aportes al documento de tesis. Muchas gracias.

A Oswaldo García Peña por su gran amistad y compañía durante todos los años de mi carrera profesional, por ser un gran hombre del que estoy muy orgullosa y que además admiro mucho, porque siempre me brindó su apoyo en los momentos difíciles. Muchas gracias Baldo.

A la M.V.Z. Diana, M.V.Z. Gabriel, I.A.Z. Daniela y I.A.Z. Alfredo por su valiosa amistad y apoyo brindado durante la fase de campo. Muchas gracias.

A los profesores y compañeros del Posgrado en Producción Animal. Gracias por todo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre Yesenia López Del Valle

Fecha de nacimiento 18 de febrero de 1990

Lugar de nacimiento Chignahuapan, Puebla.

CURP LOVY900218MPLPLS05



Profesión Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia

Cédula profesional 08764290

Desarrollo académico

Bachillerato Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Puebla

Licenciatura Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo

Maestría Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

1. INTRODUCCIÓN

La producción ovina en México se ha incrementado en los últimos años, para 2008 se mencionaba que había una población de 8.5 millones de cabezas (FAO, 2008). Actualmente los criadores de razas ovinas se han esforzado en mejorar el potencial productivo de sus animales, y en ese afán se ha visto la oportunidad de multiplicar el material genético utilizando diversas técnicas de biotecnologías reproductivas, tales como: sincronización del celo, inseminación artificial, ovulación múltiple y transferencia de embriones, entre otras (Baldassarre, 2007). Sin embargo, la respuesta a los programas de ovulación múltiple ha sido considerablemente variable, principalmente en la tasa de recuperación y calidad de las estructuras (ovocitos y embriones) recuperadas (Baldassarre, 2007; Sánchez *et al.*, 2013).

Las técnicas de reproducción asistida se han utilizado durante muchas décadas en animales de granja. En ovejas, el uso de técnicas reproductivas ha permitido incrementar la eficiencia reproductiva (Grazul-Bilska *et al.*, 2007). La ovulación múltiple y la transferencia de embriones (MOET; por sus siglas en inglés), son importantes para la mejora genética y la conservación de animales con características productivas y reproductivas superiores en el rebaño, así como en programas de rescate de especies en peligro de extinción. No obstante, la eficiencia de una MOET depende en gran medida del número de embriones transferibles en respuesta al tratamiento de superovulación (Mayorga *et al.*, 2011).

En los últimos años se han realizado estudios con relación al efecto del daño oxidativo a nivel celular, los cuales han sugerido que la participación de los antioxidantes es fundamental para impedir el daño ocasionado por los radicales libres en la célula. Desde 1922 la vitamina E se ha utilizado como un nutriente esencial en la reproducción de los mamíferos (Brigelius-Flohé y Traber, 1999), siendo uno de los antioxidantes naturales más importantes en el organismo. La vitamina E funciona como antioxidante a nivel celular y modula varios procesos intracelulares y extracelulares, además de ser importante en el mantenimiento y

restauración del equilibrio oxidante y antioxidante en el organismo (Sönmez *et al.*, 2009; Church *et al.*, 2013). De ahí la importancia de evaluar su efecto en la calidad de embriones producidos en un programa de ovulación múltiple en ovejas Charollais y Dorper.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas altamente reactivas que consisten en electrones desapareados. Los RL son especies iónicas transitorias, altamente reactivas, que se producen durante la oxidación de moléculas orgánicas (Agarwal *et al.*, 2003). Los RL adquieren electrones de los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono y algunas otras moléculas cercanas para estabilizarse, no obstante, esta unión y estabilización provocan una reacción que conduce al daño celular (Agarwal *et al.*, 2006). Existen distintos tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales se derivan del metabolismo del oxígeno, entre los que se encuentran: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH) (Agarwal *et al.*, 2003), estos ocasionan muchos daños en órganos, tejidos y células. Cuando el balance entre ROS y antioxidantes se rompe y hay sobreabundancia de ROS, ocurre el estrés oxidativo, siendo el metabolismo celular una importante fuente de radicales libres (Halliwell, 1989).

Las macromoléculas en las células (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) son el blanco de las ROS, causando daño peroxidativo, el cual dependerá del grado de susceptibilidad de las macromoléculas y la capacidad de las ROS para circundar el ambiente. Los mecanismos de daño celular inducido por el estrés oxidativo se muestran en la Figura 1. Los lípidos son peroxidados causando disturbios en la actividad enzimática de la membrana lipídica, y los canales de iones de las células (Agarwal y Saleh, 2002).

El estrés oxidativo es dañino y benéfico para los organismos ya que algunas moléculas de ROS cumplen un importante papel en la comunicación intracelular, regulación redox, así como la modulación y proliferación celular, apoptosis y expresión de genes. Por otra parte, cantidades moderadas de superóxido y peróxido de hidrógeno mitocondrial participan en procesos de comunicación que promueven la sobrevivencia celular y resistencia a enfermedades (Poljsak *et al.*, 2013). Además de que la producción de O_2^- ,

HOCL, H₂O₂ por los fagocitos es importante para la defensa o protección de agentes bacterianos y hongos.

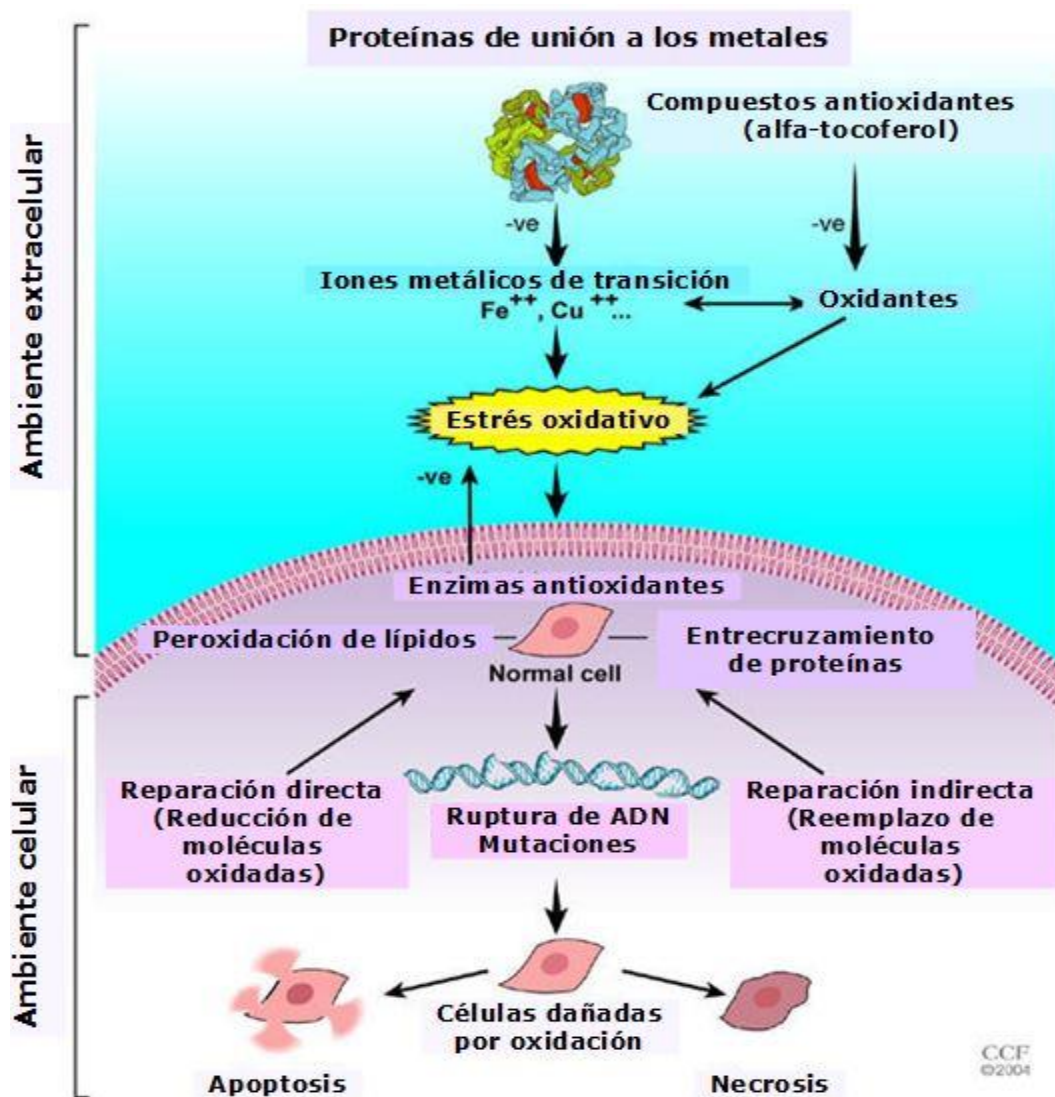


Figura 1. Mecanismo de daño celular inducido por estrés oxidativo (Agarwal y Allamaneni, 2004).

2.2 Radicales libres y su impacto en la reproducción

2.2.1 Los radicales libres y su importancia en el folículo

Al asociarse con fertilidad, las ROS juegan un papel importante en la reproducción animal, se encuentran presentes en el líquido folicular y salpingeal. Las ROS forman parte del microambiente reproductivo, son sumamente importantes para los gametos, cigotos y durante la segmentación

embrionaria, ya que al presentar anomalías en su composición química se pueden deteriorar y causar efectos adversos en los procesos reproductivos (Agarwal *et al.*, 2003). Sin embargo, pequeñas cantidades de ROS son importantes para cumplir funciones vitales en los gametos (Agarwal *et al.*, 2014). Durante el proceso de ovulación, la muerte de células de la granulosa y destrucción de las paredes foliculares induce estrés oxidativo y reducción en las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) 1 y 2 (Miyamoto *et al.*, 2010), ocasionando en consecuencia que la calidad del ovocito sea baja (Tamura *et al.*, 2008). Algunos estudios reportan que existe baja oxigenación intrafolicular, lo cual está relacionado con un aumento en la probabilidad de daños citoplasmáticos, tales como alteración en la segmentación y una segregación cromosómica anormal (Gupta *et al.*, 2010).

Pasqualatto *et al.* (2004) señalaron que altos niveles de peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante total, pueden mediar una amplia gama de condiciones patológicas que afectan la fertilidad, por tanto, debe reducirse el estrés oxidativo manteniendo niveles de oxidantes y antioxidantes en el balance necesario para garantizar la integridad celular. Por su parte, Agarwal *et al.* (2014) mencionan la importancia de mantener el equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes, pero además sugieren que el estrés oxidativo es fundamental para mantener la función reproductiva normal, y que tanto en machos como hembras, existen mecanismos de defensa antioxidante que facilitan la regulación de las ROS, manteniendo su equilibrio, y confieren protección a las células gonadales y gametos contra el daño oxidativo.

En el folículo hay muchas fuentes potenciales de ROS, incluidos macrófagos y neutrófilos, así como la actividad metabólica de las células de la granulosa. No obstante, aunque se ha demostrado la presencia de ROS en el líquido folicular, de igual manera se encuentran presentes antioxidantes como la SOD y la glutatión peroxidasa dependiente de Se (SeGPx) que protegen al ovocito del daño inducido por las ROS (Revelli *et al.*, 2009), pues de no estar presentes ocurriría un desarrollo anormal del ovocito, como consecuencia del daño inducido al ADN, al citoesqueleto y a la membrana (Oyawoye *et al.*, 2003;

Agarwal y Allamaneni, 2004). Los folículos primarios son menos sensibles al estrés oxidativo, mientras que los folículos antrales y las células de la granulosa y ovocitos preovulatorios son más sensibles al cambio antioxidante, en particular a la concentración de glutatión, que al disminuir evita la formación del pronúcleo masculino postfecundación, incrementándose el número de folículos antrales atrésicos y la apoptosis de las células de la granulosa y la teca interna (Liu *et al.*, 2014).

Otros estudios reportan que bajos niveles de ROS actúan como moléculas de comunicación, modulan la proliferación celular, apoptosis y expresión de genes a través de la activación de factores de transcripción como NF- κ -B (Poljsak *et al.*, 2013). Los ROS también pueden participar como mensajeros intermedios para citosinas, incluido el factor necrosis tumoral alfa (TNF α ; Tiku *et al.*, 1990; Lo y Cruz, 1995), el cual es considerado un mediador de la ovulación mediante la estimulación de la apoptosis folicular y ruptura de la matriz extracelular en la pared del folículo (Murdoch *et al.*, 1997; Crespo *et al.*, 2010).

2.2.2 Radicales libres durante el desarrollo embrionario

El estrés oxidativo compromete el ambiente folicular y la actividad ovárica, ya que es el principal responsable de los daños a nivel embrionario. Tanto las ROS como el O₂ son capaces de difundir y pasar a través de las membranas celulares, alterando muchos tipos de moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En consecuencia, ocurren alteraciones a nivel de mitocondria, bloqueo de la membrana celular, agotamiento del ATP y apoptosis (Liu *et al.*, 2014). También juega un papel importante en el desarrollo temprano del embrión, pues se ha demostrado que en condiciones *in vitro* sólo unos pocos ovocitos se desarrollan a embriones. Lo anterior sugiere que los embriones generan ROS, producto de su propio metabolismo y el ambiente que los rodea, los cuales pueden retardar o bloquear el desarrollo embrionario temprano (Guérin *et al.*, 2001).

El metabolismo del embrión genera ROS en diferentes vías por mecanismos enzimáticos, lo cual depende de la especie, el ambiente y las condiciones de

cultivo. Existen múltiples mecanismos para la protección del embrión contra las ROS; las protecciones externas presentes en el folículo y que comprenden antioxidantes no enzimáticos como taurina, hipotaurina y ácido ascórbico; la protección interna está conformada por enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y γ -glutamincicloseina sintetasa. Dichas enzimas están presentes en el ovocito, embrión y oviducto (Guérin *et al.*, 2001). Las ROS pueden ser originadas internamente por las células del embrión o por el ambiente externo del mismo, pues inclusive la preimplantación embrionaria puede ocasionarlos, ya que involucra fosforilación oxidativa, NADPH oxidasa y xantino oxidasa (Filler y Lew, 1981). Las fuentes exógenas de ROS son de gran importancia en la reproducción, no obstante, las concentraciones de ROS son mayores en embriones cultivados *in vitro* que *in vivo*. Lo cual es debido a que las concentraciones de oxígeno en el oviducto son menores que las atmosféricas (laboratorio), aunque una fuente importante de ROS son los iones metálicos y las amino oxidasas de los espermatozoides muertos, el endometrio y aquellas producidas por la cavidad peritoneal (Goto *et al.*, 1993; Van Langendonck *et al.*, 2002).

2.3 Importancia de los antioxidantes

Un antioxidante biológico se define como una sustancia que está presente en bajas concentraciones con relación al sustrato oxidable (Poljsak *et al.*, 2013). El uso de antioxidantes ha sido una alternativa empleada para tratar de mejorar la calidad embrionaria en programas de ovulación múltiple, tanto en animales como en humanos (Aréchiga *et al.*, 1998; Paula-Lopes *et al.*, 2003; Agarwal y Allamaneni, 2004; Agarwal *et al.*, 2006; Fortier *et al.*, 2014). Diversos estudios han examinado el posible papel del balance entre radicales libres y antioxidantes en la maduración del ovocito, fertilización, regresión luteal y mantenimiento luteal durante la preñez (Riley y Behrman, 1991), demostrándose que el incremento en los radicales libre puede ser una causa de infertilidad en ganado lechero (Aréchiga *et al.*, 1998). Aunque autores mencionan que el uso de antioxidantes neutraliza los ROS y disminuyen el estrés oxidativo, esto no siempre puede ser benéfico (Salganik, 2001). Por otra

parte, Poljsak *et al.* (2013) mencionan que no hay efecto benéfico con la terapia del uso de antioxidantes y que su consumo inapropiado puede causar estrés oxidante, por lo que es importante determinar los niveles de estrés oxidativo, para así poder prescribir su suplementación.

2.3.1 Los antioxidantes en el desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario ha sido asociado negativamente con elevadas concentraciones de lípidos peroxidados (Noda *et al.*, 1991). Durante el metabolismo celular la producción de piruvato incrementa, además de ser uno de los sustratos preferidos durante el desarrollo embrionario en la etapa de 12 células, por lo que la oxidación aumenta durante las fases de compactación de la mórula y blastulación (Azzi-Moghadam, 2012). El uso de antioxidantes como protectores del embrión de las fuentes de ROS, ha sido una valiosa herramienta en reproducción animal desde hace algunos años (Aréchiga *et al.*, 1998; Agarwal y Allamaneni, 2004). Los embriones pueden usar múltiples mecanismos para protegerse del estrés oxidativo generado por sí mismo o el ambiente que los rodea, pues de manera natural producen antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C, el glutatión, hipotaurina y taurina, que los protegen de las fuentes externas de ROS, además de otros como son SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (Agarwal y Allamaneni, 2004). Muchos antioxidantes han sido estudiados debido a que han demostrado tener efectos benéficos en la calidad embrionaria. Por ejemplo, las vitaminas C y E, las cuales ayudan a prevenir el daño en la célula ocasionado por las ROS, además se han observado incrementos en la capacidad de desarrollo embrionario, reducción de blastocistos degenerados, incremento en las tasas de desarrollo en blastocistos y reducción de apoptosis, así como mejoras en el ambiente para la preimplantación embrionaria, al suplementar con dichas vitaminas (Agarwal *et al.*, 2006).

La vitamina E está representada por una familia estructuralmente compuesta (vitameros), se encuentra en forma natural en aceites vegetales o materiales vegetales (Bramley *et al.*, 2000). Es un potente antioxidante soluble lipídico en

plasma, donde se incluyen α -, β -, γ - y δ - tocoferoles, estos compuestos contienen un anillo de cromanol unidos a un fitilo saturado (tocoferoles) e insaturados (tocotrienoles) y varían de acuerdo al número de grupos metilo o en el anillo de cromanol (Grilo *et al.*, 2014).

Los requerimientos de vitamina E en rumiantes se evalúan de acuerdo a la cantidad necesaria que ayude a prevenir el desarrollo de miopatías subclínicas. Por otra parte, se sugiere que el requisito mínimo de vitamina E en materia seca sea de 10-20 mg kg⁻¹ equivalente a 15-30 UI kg⁻¹ de MS, en ovejas. La recomendación puede aumentar a 15-28 mg kg⁻¹, si el contenido de selenio (Se) es bajo en la dieta (Liu *et al.*, 2004). Cuando existen deficiencias de vitamina E, se tiene como consecuencia la miopatía nutricional, la cual ocasiona una alta mortalidad en ovinos en crecimiento (Steele *et al.*, 1980). La vitamina E es importante para asegurar la supervivencia de corderos destetados, ya que participa en funciones vitales como: inmunidad, mejora los niveles de Se y aminoácidos azufrados. Se requieren 0.1 mg de vitamina E kg⁻¹ de MS en la dieta para mantener la competencia inmune en ganado ovino (Liu *et al.*, 2014).

2.3.2 Importancia de la vitamina E en la reproducción

La vitamina E juega un papel importante en el control del estrés oxidativo y la eficiencia reproductiva, tanto en hembras como en machos. Por ejemplo, los espermatozoides están sujetos a daño oxidativo debido a su alta tasa metabólica, y a la elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados que constituyen sus membranas: Por otra parte, en hembras el estrés oxidativo afecta el desarrollo folicular y compromete la actividad ovárica; siendo indispensable, en ambos casos, el papel de la vitamina E como antioxidante que ayude a mitigar o prevenir el daño ocasionado por la oxidación (Murdoch y Martinchit, 2004). La vitamina E previene el daño oxidativo en membranas celulares mediante la destrucción o evitando la formación de hidroperóxidos, actúa junto con el Se y protege las membranas celulares y los organelos de daños peroxidativos, además de destruir peróxidos endógenos (Gupta *et al.*, 2005).

De igual manera en reproducción, la vitamina E protege el epitelio ovárico del daño oxidativo inducido por la ovulación, pues durante ésta ocurre muerte celular en la superficie del ápice de los folículos preovulatorios para formar el estigma (Murdoch y Martinchit, 2004). Otros estudios afirman que la combinación de Se y vitamina E reduce la retención de membranas fetales en ganado lechero (Aréchiga *et al.*, 1998).

2.4 Importancia del α -tocoferol

El α -tocoferol (Figura 2) se ha definido como una cadena de radicales que tiene una naturaleza hidrofóbica que opera en un ambiente lipídico. El α -tocoferol tiene un efecto antioxidante que restringe los efectos directos en las membranas, además de inhibir las enzimas que producen a los radicales, pero también funciona como activador de enzimas antioxidantes (Azzi, 2007). El α -tocoferol tiene una alta potencia biológica (Grilo *et al.*, 2014). La digestión de los tocoferoles y tocotrienoles es similar a los lípidos, de modo que la emulsificación y la incorporación de micelas mixtas se lleven a cabo. Estos compuestos son absorbidos por los enterocitos y son transportados al intestino delgado, en estas células los tocoferoles son incorporados por los quilomicrones y son transportados al sistema linfático (Grilo *et al.*, 2014). Los tocoferoles llegan al hígado a través de los quilomicrones, el alfa-tocoferol es transportado por una proteína con alta afinidad por lo que es el isómero que se encuentra en mayor concentración en el plasma y tejidos (Fu *et al.*, 2014).

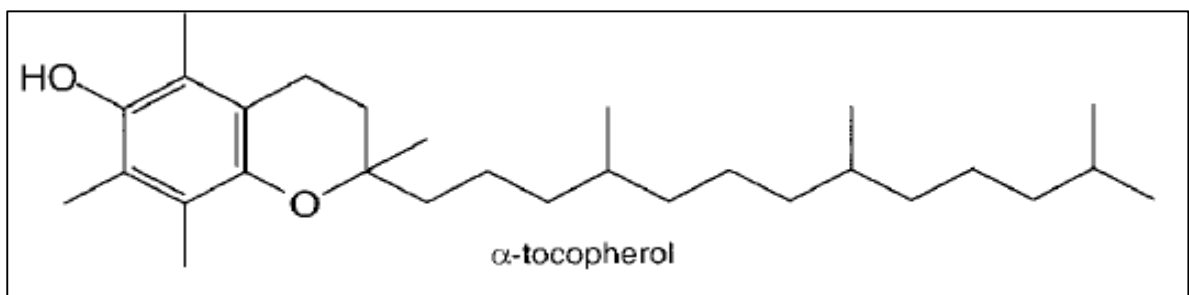


Figura 2. Estructura molecular del α - tocoferol (Azzi, 2007).

En rumiantes el 50% de acetato de α -tocoferol es degradado en el rumen, debido a que actúa como antioxidante en la alimentación y es en el intestino

donde se pueden causar pérdidas antes de su absorción (EFSA, 2010). BASF (2005) sugiere que los requerimientos de vitamina E dependen del consumo de ácidos grasos poliinsaturados (más de 7 g de ácido linoleico) en humanos, y que altos consumos de ácidos grasos poliinsaturados incrementan los requerimientos de vitamina E (EFSA, 2010).

En reproducción se han realizado investigaciones sobre la suplementación de α -tocoferol en combinación con el ácido ascórbico en cultivos *in vitro*. Natarajan *et al.* (2010) y Miclea *et al.* (2012) reportaron que la combinación de ambos antioxidantes (20 μ M α -tocoferol y 750 μ M de ácido ascórbico) tienen un efecto positivo en la maduración de los ovocitos por la expansión del *cumulus oophorus*. Natarajan *et al.* (2010) encontraron que la tasa de desarrollo de blastocistos fue mayor al suplementar con α -tocoferol 100 μ M ($p < 0.01$) y 400 μ M ($p < 0.05$), con respecto al grupo control. El efecto fue asociado a que se mejora el ambiente embrionario en cultivos *in vitro* y los embriones se protegen del daño oxidativo.

2.5 Superovulación en ovejas

Los tratamientos hormonales para la superovulación y subsecuente colección de embriones en ovejas han sido de las herramientas más eficientes para programas de mejora genética y preservación de razas ovinas. Por lo anterior, se han evaluado diferentes procedimientos enfocados a incrementar el número de embriones transferibles (Forcada *et al.*, 2013; Bó y Mapletoft, 2014). No obstante, existe una variabilidad impredecible en la respuesta a la superovulación, la cual se atribuye a factores tanto endógenos (genéticos, estado nutricional, estado folicular, estación del año, etc.) como exógenos (tratamiento de superovulación, contaminación de las gonadotropinas, etc.), aunque la contribución de cada uno es difícil de estimar o corregir (Amiridis y Cseh, 2012).

Las gonadotropinas utilizadas en los programas de superovulación incluyen a la gonadotropina coriónica equina (eCG) aplicada en una sola inyección, o aplicaciones múltiples de hormona folículo estimulante. También se usa la

gonadotropina menopausal humana (hMG), la cual tiene efectos similares a la eCG. La hMG induce regresión luteal prematura, por lo que su uso es limitado (Hu *et al.*, 2010; Amiridis y Cseh, 2012).

La eCG se ha utilizado para inducir ovulación múltiple (Lozano-González *et al.*, 2012) mediante la aplicación de una inyección al retirar los dispositivos liberadores de progesterona o progestágenos (Abecia *et al.*, 2011). La eCG presenta mayor actividad de FSH y menor de LH, por lo cual ocasiona un incremento en el crecimiento folicular y el reclutamiento de folículos pequeños, aumentando la tasa de ovulación (Dias *et al.*, 2001). Sin embargo, la aplicación de dosis altas es menos eficiente, y ocasiona la formación de folículos persistentes, ovocitos anormales y anticuerpos que pueden afectar la fertilidad posterior de las hembras, por lo que su uso ha disminuido en programas de superovulación (Abecia *et al.*, 2011; Amiridis y Cseh, 2012).

Debido a los efectos indeseables que presenta la eCG, su uso ha sido reemplazado por extractos de pituitaria que contienen FSH, principalmente de origen porcino y ovino (Armstrong y Evans, 1983). Sin embargo, por su corto tiempo de vida, debe ser suministrada en forma repetida, incrementándose los costos del tratamiento (Kanitz *et al.*, 2002). Aunque el uso de dosis decrecientes de FSH es comúnmente cuestionado, aparentemente el decremento de la dosis en el tratamiento reduce la incidencia de folículos anovulatorios y previene la atresia de folículos grandes (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que el uso combinado de FSH y eCG en tratamientos de superovulación incrementa la respuesta superovulatoria (Cseh y Solti, 2001). La aplicación única de FSH en conjunto con eCG representan un costo bajo, sin comprometer la tasa de producción embrionaria. Sin embargo, los embriones producidos después del uso combinado de estas gonadotropinas presentan más bajo número de células y reducida viabilidad después de la vitrificación que los producidos con FSH sola (Leoni *et al.*, 2001).

3. LITERATURA CITADA

- Abecia, J. A., F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27: 67-79.
- Agarwal, A., and R. A. Saleh. 2002. Role of antioxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Urologic Clinics of North America* 29: 1-12.
- Agarwal A., R. M. Saleh, and A. Bedaiwy. 2003. Role of oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79: 879-843.
- Agarwal, A., and S. S. R. Allamaneni. 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 338-347.
- Agarwal, A., S. Gupta, and S. Sikka. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18: 325-332.
- Agarwal, A., D. Durairajanayagam, and S. S. du Plessis. 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12: 1-19.
- Amiridis, G. S., and S. Cseh. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* 130: 152-161.
- Aréchiga, C. F., S. Vázquez-Flores, O. Ortiz, J. Hernández-Cerón, A. Porras, L. R. McDowell, and P. J. Hansen. 1998. Effect of injection of β -carotene or vitamine E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50: 65-76.
- Armstrong, D. T., and G. Evans. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.
- Azzi-Moghadam, A. 2007. Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radical Biology & Medicine* 43: 16-21.

- Azzi-Moghadam, A. 2012. Metabolism of energy substrates of *in vitro* and *in vivo* derived embryos from ewes synchronized and super ovulated with norgestomet and porcine follicle stimulating hormone. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 3: 1-7.
- BASF (The Chemical Company). 2005. Vitamin E. Technical Information pp: 1-4.
- Baldassarre, H. 2007. Assisted reproduction in goats: artificial insemination to cloning. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31: 274-282.
- Bramley, P. M., I. Elmadfa, A. Kafatos, F. J. Kelly, Y. Marios, H. E. Roxborough, W. Schuch, P. J. A. Sheehy, and K. H. Wagner. 2000. Review Vitamin E. *Journal of Science of Food and Agriculture* 80: 913-938.
- Brigelius-Flohé, R., and M. G. Traber. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal* 13: 1145-1155.
- Bó, G. A., and R. J. Mapletoft. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81: 38-48.
- Church, D. C., W. G. Pond, y K. R. Pond. 2013. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. 2a. ed. Limusa pp: 253-254.
- Crespo, D., E. Bonnet, N. Roher, S. A. MacKenzie, A. Krasnov, F. W. Goetz, J. Bobe, and J. V. Planas. 2010. Cellular and molecular evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in the ovulatory mechanism of trout. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 34.
- Cseh, S., and L. Solti. 2001. Studies on factors affecting superovulation and embryo transfer in hungarian merino ewes. *Acta Veterinaria Hungarica* 49: 431-441.
- Dias, F. E. F., E. S. Lopes J., A. B. S. Villaroel, D. Rondina, J. B. Lima-Verde, N. R. O. Paula, e V. J. F. Freitas. 2001. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica eqüina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58: 618-623.

- EFSA. 2010. (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin E as a feed additive for all animal species. EFSA Journal 8: 1635.
- Filler, R., and K. J. Lew. 1981. Developmental onset of mixed-function-oxidase activity in preimplantation mouse embryos. Proceedings National Academy Sciences 78: 6991-6995.
- Forcada, F., M. A. Amer-Meziane, J. A. Abecia, M. C. Maurel, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muño-Blanco, B. Asenjo, M. I. Vázquez, and A. Casao. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. Theriogenology; 75: 769-776.
- Forcada, F., J. Estaún, A. Casao, L. Sánchez-Prieto, I. Palacín, and J. A. Abecia. 2013. Short communication. *In vitro* embryo production can be modified by the previous ovarian response to a superovulatory treatment in sheep. Spanish Journal of Agricultural Research 11: 366-370.
- Fortier, L. A., S. Mc Graw, F. L. Lopes, K. M. Niles, M. Landry, and J. M. Trasler. 2014. Modulation of imprinted gene expression following superovulation. Molecular and Cellular Endocrinology 1-2: 51-57.
- Fu, J., H. Che, D. M. Tan, and K. Teng. 2014. Bioavailability of tocotrienols: evidence in human studies. Nutrition and Metabolism 11: 1-10.
- Grazul-Bilska, A. T., J. D. Kirsch, J. J. Bilski, K. C. Kraft, E. J. Windorski, J. S. Luther, K. A. Vonnahme, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2007. Superovulation in sheep: number and weight of the corpora lutea and serum progesterone. Sheep & Goat Research Journal 22: 26-31.
- Grilo E. C., P. N. Costa, C. S. S. Gurgel, A. F. L. Beserra, F. N. S. Almeida, and R. Dimenstein. 2014. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetables oils. Food Science and Technnology 34: 379-385.

- Goto, Y., Y. Noda, T. Mori, and M. Nakao. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultures *in vitro*. *Free Radical Biology Medicine* 15: 69-75.
- Gonzalez-Bulnes, A., D. T. Baird, B. K. Campbell, M. J. Cocero, R. M. Garcia-Garcia, E. K. Inskeep, A. Lopez-Sebastian, A. S. Mcneilly, J. Santiago-Moreno, C. J. H. Souza, and A. Veiga-Lopez. 2004. Multiple factors affecting efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 421-435.
- Guérin, P., S. El Mouatassim, and Y. Ménézo. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Human Reproductive Update* 7: 175-189.
- Gupta, S., H. K. Gupta, and J. Soni. 2005. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 64: 1273-1286.
- Gupta, S., L. Sekhon, Y. Kim, and A. Agarwal. 2010. The role of oxidative and antioxidants in assisted reproduction. *Current Women's Health Reviews* 6: 227-238.
- Halliwell, B. 1989. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 82: 747-752.
- Hu, J., J. Bao, X. Ma, W. Li, A. Lei, C. Yang, Z. Gao, and H. Wang. 2010. FSH is superior to eCG for promoting ovarian response in Chinese Bamei gilts. *Animal Reproduction Science* 122: 313-316.
- Kanitz, W., F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H. P. Nohner, and R. Pöhland. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development* 42: 587-599.
- Mayorga, I., L. Mara, D. Sanna, C. Stelletta, M. Morgante, S. Casu, and M. Dattena. 2011. Good quality sheep embryos produced by superovulation

treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology* 75: 1661-1668.

Miclea, I., N. Pacala, A. Hettig, M. Zăhan, and V. Miclea. 2012. Alpha-tocopherol and ascorbic acid combinations influence the maturation of sheep oocytes. *Animal Science and Biotechnologies* 45: 310-313.

Miyamoto, K., E. F. Sato, E. Kasahara, M. Jikumaru, K. Hiramoto, H. Tabata, M. Katsuragi, S. Odo, K. Utsumi, and M. Inoue. 2010. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 49: 674-681.

Murdoch, W. J., D. C. Colgin, and J. A. Ellis. 1997. Role of tumor necrosis factor- α in the ovulatory mechanism of ewes. *Journal Animal Science* 75: 1601-1605.

Murdoch, W. J., and J. F. Martinchit. 2004. Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine* 229: 456-552.

Nagy, K., B. Lobo, M. C. Courtet-Compondu, S. Braga-Lagache, L. Ramos, V. Puig-Divi, F. Azpiroz, J. R. Malagelada, M. Beaumont, J. Moulin, S. Acquistapace, L. Sagalowicz, M. Kussmann, J. Santos, B. Holst, and G. Williamson. 2014. Vitamin E and vitamin E acetate absorption from self-assembly systems under pancreas insufficiency conditions. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 68: 129-134.

Natarajan, R., M. B. Shankar, and D. Munuswamy. 2010. Effect of α -tocopherol supplementation on *in vitro* maturation of sheep oocytes and *in vitro* development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27: 483-490.

Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi, and T. Mori. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular Reproduction and Development* 28: 356-360.

- Leoni, G., L. Bogliolo, P. Pintus, S. Ledda, and S. Naitana. 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower *in vitro* viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reproduction Nutrition Development* 41: 239-246.
- Liu, S., D. Masters, M. Ferguson, and A. Thompson. 2014. Vitamin E status and reproduction in sheep: potential complications for Australian sheep production. *Animal Production Science* 54: 694-714.
- Lo, Y. Y. C., and T. F. Cruz. 1995. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 11727-11730.
- Lozano-González, J. F., L. F. Uribe-Velázquez, y J. H. Osorio. 2012. Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas (Ovisaries). *Veterinaria y Zootecnia* 6: 134-147.
- Organización Mundial de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2008. Anuario estadístico 2005-2006 de ganadería. FAO-STAT. Roma, Italia. 339 p.
- Oyawoye, O., A. A. Gadir, A. Garner, N. Constantinovici, C. Perrett, and P. Hardiman. 2003. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human Reproduction* 18: 2270-2274.
- Pasqualatto, E. B., A. Agarwal, R. K. Sharma, V. M. Izzo, J. A. Pinotti, N. J. Joshi, and B. I. Rose. 2004. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility* 81: 973-976.
- Paula-Lopes, F. F., Y. M. Al-Katani, A. C. Majewski, L. R. McDowell, and P. J. Hansen. 2003. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. *Journal of Dairy Science* 86: 2343-2351.

- Poljsak, B., D. Šuput, and I. Milisav. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013: 1-11.
- Revelli, A., L. D. Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio, and P. Rinaudo. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 40. Disponible en: <http://www.rbej.com/content/7/1/40>. Consultado: 23 de mayo de 2016.
- Riley, J. C., and H. R. Behrman. 1991. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198: 781-791.
- Sánchez, F., H. Bernal, A. S. del Bosque, A. González, E. Olivares, G. Padilla, and R. A. Ledezma. 2013. Superovulation and embryo quality with porcine follicle stimulation hormones (pFSH) in Katahdin hair sheep during breeding season. *African Journal of Agricultural Research* 8: 2977-2982.
- Salganik R. I. 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the humans population. *The Journal of the American College of Nutrition* 5: 46S-72S.
- Steele, P., R. L. Peet, S. Skirrow, W. Hopkins, H. G. Masters. 1980. Low alpha-tocopherol levels in livers of weaner sheep with nutritional myopathy. *Australian Veterinary Journal* 56: 529-532.
- Sönmez, M., T. Bozkurt; G. Türk, S. Gür, M. Kızıl, and A. Yüce. 2009. The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive performance of goats following estrous synchronization using intravaginal sponges. *Animal Reproduction Science* 114: 183-192.
- Tamura, H., A. Takasaki, I. Miw, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, T. Taketani, A. Matsuoka, Y. Yamagata, K. Shinamura, H. Morioka, H. Ishikawa, R. J. Reiter, and N. Sugino. 2008. Oxidative stress impairs

oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research* 44: 280-287.

Tiku, M. L., J. B. Liesch, and F. M. Robertson. 1990. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. *The Journal of Immunology* 145: 690-696.

Van Langendonckt, A., F. Casanas-Roux, and J. Donnez. 2002. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility* 77: 861-870.

4. SUPLEMENTACIÓN DE α -TOCOFEROL EN DOS GRUPOS RACIALES DE OVEJAS: EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*¹

4.1 Resumen

La eficiencia de un programa de ovulación múltiple y transferencia de embriones depende del número de embriones de buena calidad obtenidos, algunos estudios sugieren que la suplementación con antioxidantes puede ayudar a mejorar la calidad del embrión. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con α -tocoferol en la calidad de embriones producidos en un programa de ovulación múltiple en dos razas ovinas. Para su estudio se aplicaron 500 UI a 12 hembras Charollais y 12 Dorper (tratamiento 1), y 0 UI a 11 hembras Charollais y 8 Dorper (tratamiento 2). Las ovejas se sincronizaron con esponjas intravaginales por 12 días y el día 10 fueron superovuladas con una fuente purificada de hormona folículo estimulante. Los celos se detectaron con machos marcadores y las ovejas se inseminaron por laparoscopia 18 h después del celo con 4 dosis de semen fresco. La recuperación embrionaria se realizó 7 d después del celo por laparotomía. Se midió la tasa de ovulación, tasa de recuperación, fertilización embrionaria, y calidad de las estructuras recuperadas. Los resultados se analizaron mediante los procedimientos GLM y CATMOD como fue requerido. No se encontró efecto ($p>0.05$) de la aplicación de α -tocoferol, raza o su interacción en las tasas de ovulación y recuperación. La tasa de fertilización fue similar ($p>0.05$) entre ovejas tratadas o no con α -tocoferol, pero fue mayor ($p<0.05$) en ovejas Dorper que Charollais (45.10 vs. 36.42%). La calidad embrionaria fue similar ($p>0.05$) entre razas, pero inferior ($p<0.05$) en ovejas tratadas (53.91%) que en las que no recibieron α -tocoferol (70.33%). La misma tendencia se presentó en las dos razas. La aplicación de α -tocoferol no mejoró la tasa de fertilización ni la calidad de los embriones recuperados bajo las condiciones del estudio.

Palabras clave: ovinos, estrés oxidativo, ovulación múltiple, calidad embrionaria.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Yesenia López Del Valle
Director de Tesis: Raymundo Rangel Santos, Ph. D.

5. α -TOCOPHEROL SUPPLEMENTATION IN TWO RACIAL GROUPS OF EWES: EFFECT ON *IN VIVO* EMBRYOS PRODUCTION²

5.1 Abstract

The efficiency of a multiple ovulation and embryo transfer (MOET) program depends on the number of good quality embryos obtained. Some studies suggest that supplementation with antioxidants can improve embryo quality. The objective of the study was to evaluate the effect of α -tocopherol supplementation on embryo quality of a MOET program in two sheep breeds. In the study 500 IU α -tocopherol were administered to 12 Charollais and 12 Dorper ewes (treatment 1), and 0 IU were given to 11 Charollais and 8 Dorper females (treatment 2). The ewes were synchronized with intravaginal sponges for 12 days, on day 10th they were superovulated with a purified source of follicle stimulating hormone. Estrus was detected with teaser rams; ewes in estrus were inseminated by laparoscopy 18 h after estrus onset with 4 doses of fresh semen. Embryo recovery was done 7 d after estrus by laparotomy. Ovulation rate, recovery rate, fertilization rate, and embryo quality were recorded. The results were analyzed using GLM and CATMOD procedures. There was no significant ($p>0.05$) effect of α -tocopherol application, breed or their interaction on ovulation and recovery rates. Fertilization rate was similar ($p>0.05$) among ewes treated or not with α -tocopherol, but was higher ($p<0.05$) in Dorper than in Charollais ewes (45.10 vs. 36.42%). Embryo quality was similar ($p>0.05$) among breeds, but lower ($p<0.05$) in treated (53.91%) than non-treated (70.33%) α -tocopherol ewes. Application of α -tocopherol did not improve fertilization rate and embryo quality of superovulated ewes under the conditions of the study.

Key words: sheep, oxidative stress, multiple ovulation, embryos quality.

² Master of Sciences Thesis, Universidad Autonoma Chapingo
Author: Yesenia Lopez Del Valle
Advisor: Raymundo Rangel Santos, Ph. D.

5.2 Introducción

En ovejas las técnicas de reproducción asistida se utilizan para incrementar la eficiencia reproductiva (Grazul-Bilska *et al.*, 2007). Los programas de ovulación múltiple y la transferencia de embriones (MOET) es una herramienta importante para la mejora y conservación de animales de alto valor genético, no obstante, la eficiencia de una MOET depende en gran medida del número de embriones transferibles obtenidos (Mayorga *et al.*, 2011).

El uso de antioxidantes ha sido una de las alternativas empleadas para tratar de incrementar el número de embriones de buena calidad en programas de superovulación (Agarwal y Allamaneni, 2004; Agarwal *et al.*, 2006; Fortier *et al.*, 2015). Diversos estudios han examinado el papel del balance entre radicales libres y antioxidantes en la maduración y fertilización del ovocito (Riley y Behrman, 1991), y se ha demostrado que la excesiva producción de radicales libres puede ser una causa de infertilidad (Aréchiga *et al.*, 1998).

En la última década se han realizado diversos estudios sobre el daño oxidativo a nivel celular. Desde 1922 la vitamina E se ha considerado un nutriente esencial en la reproducción de los mamíferos (Brigelius-Flohé y Traber, 1999), ya que protege a los órganos reproductivos del daño oxidativo causado por la peroxidación lipídica y mejora la eficiencia reproductiva (Hong *et al.*, 2009). La vitamina E se agrupa según el tipo tocoferoles α , β , γ y δ y de tocotrienoles en α , β , γ y δ (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). Se ha demostrado que el uso de α -tocoferol mejora la maduración del ovocito y la expansión del cumulus oophorus (Miclea *et al.*, 2012). Además, restringe efectos directos sobre la membrana celular, inhibe enzimas que producen radicales libres y activa enzimas antioxidantes (Azzi, 2007). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la raza y la suplementación de α -tocoferol en la fertilización y calidad embrionaria de ovejas superovuladas.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Localización

El experimento se realizó en un rancho comercial ubicado en el municipio de Jocotitlán, Estado de México, entre las coordenadas 19°42'40" latitud norte y 99°47'20" longitud oeste, a una altura promedio de 2538 msnm. Con una temperatura media anual de 12.4°C y lluvias en verano con una precipitación anual de 757 mm (CONAGUA-SMN, 2016).

5.3.2 Animales

Se utilizaron 43 ovejas multíparas Charollais (24) y Dorper (19), con promedio de peso vivo (PV) de 84.3±2.03 y 81.9±3.04 kg, respectivamente.

5.3.3 Diseño del estudio

El estudio se realizó durante el mes de diciembre de 2014. Las hembras se distribuyeron por raza y se asignaron aleatoriamente a los tratamientos: 1, aplicación intramuscular de 500 UI de α -tocoferol (α -Tocopherol ®, Sigma-Aldrich, Alemania) utilizando como vehículo aceite de oliva extra virgen (El Español ®, México) y 2, sin aplicación de α -tocoferol (0 UI).

5.3.4 Manejo alimenticio

Las ovejas fueron alimentadas con ensilado de maíz y concentrado comercial (Borregas reproductoras ®, Maltacleyton, México), a cada oveja se le ofrecieron 2 kg de la mezcla por día y agua a libre acceso.

5.3.5 Protocolo de sincronización y superovulación

El día 0 se insertó una primera esponja intravaginal impregnada con 20 mg de cronolona micronizada (Chrono Gest ®, Intervet, México), además se aplicaron 5 mg de selenio y 68 UI de vitamina E (MU-SE ®, Intervet, México). El día 6 del protocolo se removió la primera esponja y se insertó una segunda. Durante los días 8, 9, 10, 11 y 12 se llevó a cabo la superovulación, mediante la aplicación de FSH (20 mg de FSHp mL⁻¹; Folltropin-V ®, Vetepharm, Canada) en dosis decrecientes (50 y 46; 46 y 30; 30 y 26; 26 y 14 mg de FSHp d⁻¹; am y pm,

respectivamente). El día 8 del protocolo se realizó la aplicación de 500 UI de α -tocoferol por vía IM por oveja, al momento de aplicar la FSHp. El día 9 las ovejas recibieron 250 μ g cloprostenol (Celosil [®], Intervet, México) y 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon [®], Intervet, México). El día 11 se suministraron 250 μ g de cloprostenol, y se removió la segunda esponja. Además, se aplicaron 200 μ g de gonadorelina (GnRH [®], Sanfer, México) al momento del celo.

5.3.6 Inseminación artificial

La detección del celo se realizó 24 h después de remover la segunda esponja. Las ovejas se inseminaron por laparoscopia 24 h después de detectado el celo, con dosis diluidas de semen fresco (100×10^6 espermatozoides dosis⁻¹) provenientes de machos de la raza Charollais y Dorper de fertilidad conocida. El semen fue envasado en pajillas de 0.25 mL, aplicándose la mitad de la dosis en la parte media de cada cuerno uterino.

5.3.7 Recuperación embrionaria

La recuperación embrionaria se realizó mediante laparotomía, para llevarla a cabo se aplicaron 0.2 mg Kg⁻¹ PV mg de xilacina IM (Procin [®], Pisa, México) y 6 mg Kg⁻¹ PV de ketamina por vía IV (Anesket [®], Pisa, México). Se lavó, rasuró y desinfectó la región ventral enfrente de la ubre. La cavidad abdominal fue insuflada con CO₂, y se realizó una incisión de aproximadamente 5 cm en la línea media, incidiendo piel y peritoneo. Posteriormente se exteriorizaron los cuernos uterinos con una pinza Babcock y se fijaron con gasa para evitar su retorno a la cavidad abdominal. En seguida se realizó una punción en la base de uno de los cuernos con una pinza chica por donde fue introducido un catéter Foley No.12. El catéter fue fijado en el cuerno al aplicar 4 a 6 cm³ de aire. En seguida se practicó una segunda punción cerca de la unión útero-tubárica, donde se colocó un Punzo-cat No. 18 conectado a una jeringa conteniendo 60 mL de medio de lavado (Flushing [®], Bioniche). El procedimiento fue realizado en ambos cuernos cuando el número de cuerpos lúteos fue de tres o más. El medio de lavado fue colectado en un filtro estéril (Emcon [®], Biogenec) con

mallá de 80 μm , el cual fue colocado a la salida del catéter Foley. Una vez finalizado el lavado del cuerno, se retiró el filtro, se vació el contenido en una caja de Petri, y se procedió a la búsqueda de estructuras (embriones: mórulas y blastocistos, y ovocitos) con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

5.3.8 Evaluación embrionaria

Los embriones se contabilizaron y se clasificaron de acuerdo a sus características morfológicas en calidad buena (forma esférica, simetría de color y textura, tamaño de células uniforme, sin imperfecciones, pocos blastómeros extruidos) y mala (forma irregular, presencia de blastómeros extruidos, vesículas y pocas células degeneradas), de acuerdo a la clasificación propuesta por Lindner y Wrigth, (1983).

5.3.9 Análisis estadístico

Las variables de respuesta de tasa de ovulación y tasa de recuperación embrionaria se analizaron, bajo el supuesto de que cuentan con distribución normal, mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS 9.3, 2013).

Las variables de respuesta tasa de fertilización y la calidad embrionaria, se analizaron mediante modelos de datos categóricos con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS 9.3, 2013).

El modelo estadístico utilizado para tasa de ovulación, tasa de recuperación embrionaria fue el siguiente:

$$y_{ijk} = rz_i + vt_j + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} = Tasa de ovulación y/o tasa de recuperación embrionaria de la oveja de la i -ésima raza con la j -ésima aplicación de vitamina E.

rz_i = Efecto de la raza de la oveja, i = Charollais, Dorper

vt_j = Efecto de cantidad de vitamina E aplicado a la oveja, j = 0 UI, 500 UI

ε_{ijk} = Error (0, σ_e^2)

El modelo estadístico utilizado para las variables analizadas mediante modelos de datos categóricos (tasa de fertilización y calidad embrionaria) fue el siguiente.

$$p_i = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 rz + \beta_2 vt}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 rz + \beta_2 vt}}$$

p_i = Probabilidad de la hembra sea fecundada, y la calidad del embrión según la raza de la oveja y/o la dosis de vitamina E aplicada.

β_j = Coeficientes de regresión parcial asociados a la ordenada al origen ($j=0$), el efecto de raza ($j=1$) y el efecto de la dosis de vitamina E aplicado

rz_k = Efecto de la raza de la oveja, k = Charollais, Dorper.

vt_l = Efecto de la l -ésima dosis de vitamina E aplicada, l = 0 UI, 500 UI.

5.4 Resultados

5.4.1 Tasa de ovulación

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el número de cuerpos lúteos presentes en el ovario derecho (CLOD), izquierdo (CLOI) y totales (CLT) entre razas, entre ovejas suplementadas y no suplementadas con α -tocoferol, y de la interacción entre raza y suplementación con α -tocoferol (Cuadro 1).

Cuadro 1. Influencia de la raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción en la tasa de ovulación^z de ovejas superovuladas.

Ítem	N	Tasa de ovulación ($\bar{X} \pm E.E.$)		
		CLOD	CLOI	CLT
Raza				
Charollais	24	9.04 \pm 0.84 ^a	10.63 \pm 1.08 ^a	19.67 \pm 1.65 ^a
Dorper	19	8.55 \pm 0.95 ^a	8.03 \pm 1.23 ^a	16.57 \pm 1.87 ^a
		p=0.70	p=0.12	p=0.22

Dosis de α-tocoferol (UI)					
500		24	8.34 \pm 0.86 ^a	9.51 \pm 1.11 ^a	17.84 \pm 1.68 ^a
0		19	9.25 \pm 0.94 ^a	9.15 \pm 1.21 ^a	18.40 \pm 1.84 ^a
			p=0.70	p=0.83	p=0.83
Raza	Dosis de α-tocoferol (UI)				
Charollais	500	12	8.58 \pm 1.85 ^a	10.83 \pm 1.53 ^a	19.42 \pm 2.33 ^a
	0	11	9.50 \pm 1.85 ^a	10.42 \pm 1.53 ^a	19.92 \pm 2.33 ^a
Dorper	500	12	8.09 \pm 1.24 ^a	8.18 \pm 1.60 ^a	16.27 \pm 2.43 ^a
	0	8	1.90 \pm 1.45 ^a	7.88 \pm 1.87 ^a	16.88 \pm 2.85 ^a
			p=0.87	p=0.47	p=0.65

^zPorcentajes con diferente literal ^{ab} en cada columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

5.4.2 Tasa de recuperación embrionaria

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el número promedio de estructuras totales recuperadas (EST) y el porcentaje de recuperación (%REC) entre razas, ovejas suplementadas o no con α -tocoferol, así como en la interacción entre raza y suplementación con α -tocoferol (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción en el número promedio^y de estructuras totales recuperadas (EST) y el porcentaje^z de recuperación embrionaria (% REC) de ovejas superovuladas.

Ítem	N	Tasa de recuperación embrionaria ($\bar{X} \pm E.E.$)		% REC
		CLT	EST	
Raza				
Charollais	24	19.67 \pm 1.65 ^a	12.58 \pm 1.61 ^a	61.14 \pm 5.29 ^a
Dorper	19	16.57 \pm 1.87 ^a	8.12 \pm 1.83 ^a	45.95 \pm 6.02 ^a

			p=0.22	p=0.70	p=0.70
Dosis de α-tocoferol (UI)					
500	24		17.84 \pm 1.68 ^a	10.56 \pm 1.64 ^a	54.17 \pm 5.41 ^a
0	19		18.40 \pm 1.84 ^a	10.15 \pm 1.80 ^a	52.92 \pm 5.92 ^a
			p=0.83	p=0.87	p=0.88
Raza	Dosis de α -tocoferol (UI)				
Charollais	500	12	19.42 \pm 2.33 ^a	12.75 \pm 2.27 ^a	63.57 \pm 7.48 ^a
	0	11	19.92 \pm 2.33 ^a	12.42 \pm 2.27 ^a	58.70 \pm 7.48 ^a
Dorper	500	12	16.27 \pm 2.43 ^a	8.36 \pm 2.37 ^a	44.76 \pm 7.82 ^a
	0	8	16.88 \pm 2.85 ^a	7.88 \pm 2.78 ^a	47.13 \pm 9.17 ^a
			p=0.65	p=0.35	p=0.28

^yMedias o ^zporcentajes con diferente literal ^{ab} en cada columna son estadísticamente diferentes (p<0.05).

5.4.3 Tasa de fertilización

La tasa de fertilización embrionaria fue diferente (p<0.05) entre razas, sin embargo, fue similar (p>0.05) entre ovejas suplementadas y no suplementadas con α -tocoferol. Se encontró efecto (p<0.05) de la interacción entre raza y suplementación con α -tocoferol (Cuadro 3). En ovejas de la raza Charollais la aplicación de α -tocoferol produjo porcentaje de fertilización (41.18%) mayor que el de ovejas no suplementadas (31.54%), no obstante, estos porcentajes no fueron diferentes estadísticamente. Para la raza Dorper, el mayor porcentaje de fertilización se obtuvo en las ovejas del grupo control (69.84%), con respecto al de las suplementadas (56.52%), no obstante, estos porcentajes no difirieron estadísticamente.

Dentro de la interacción (Raza x Dosis de α -tocoferol), ovejas no suplementadas (0 UI) de la raza Dorper tuvieron una mayor tasa de fertilización

($p < 0.05$) que Charollais (69.84% vs. 31.54%), mientras que en ovejas suplementadas (500 UI) la tasa de fertilización fue similar entre razas (41.18% vs. 56.52%); sin embargo, la tasa de fertilización fue similar entre ovejas suplementadas y no suplementadas, de la misma raza (Charollais: 41.18 vs. 31.54%; Dorper: 56.52 vs. 69.84%).

Cuadro 3. Efecto de la raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción sobre la tasa de fertilización^z embrionaria.

Item	N	Estructuras Totales	Huevos fertilizados	% fertilización	
Raza					
Charollais	24	302	110	36.42 ^a	
Dorper	19	155	96	45.10 ^b	
				$p < 0.01$	
Dosis de α-tocoferol (UI)					
500	23	245	115	46.93 ^a	
0	20	212	91	42.92 ^a	
				$p = 0.39$	
Raza	Dosis de α-tocoferol (UI)				
Charollais	500	12	153	63	41.18 ^{a,b}
	0	11	149	47	31.54 ^b
Dorper	500	12	92	52	56.52 ^{a,c}
	0	8	63	44	69.84 ^c
				$p < 0.01$	

^zPorcentajes con diferente literal ^{abc} en cada columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

5.4.4 Calidad embrionaria

El porcentaje de embriones de calidad buena y mala fue similar ($p>0.05$) entre razas, aunque el porcentaje de embriones de calidad buena fue mayor ($p<0.05$) en las ovejas del grupo control (70.33 vs. 53.91%), mientras que el porcentaje de embriones de calidad mala fue superior en las ovejas tratadas con α -tocoferol (46.09 vs. 29.67%). No se encontró efecto de la interacción ($p>0.05$) entre raza y suplementación con α -tocoferol en el porcentaje de embriones de calidad buena y mala (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de raza, suplementación con α -tocoferol y su interacción sobre la calidad^z embrionaria.

	Embriones				
	Totales	Calidad buena		Calidad mala	
Ítem	N	No.	%	No.	%
Raza					
Charollais	110	69	62.72 ^a	41	37.28 ^a
Dorper	88	57	59.37 ^a	39	38.1 ^a
p=0.62					
Dosis de α-tocoferol (UI)					
500	115	62	53.91 ^a	53	46.09 ^b
0	91	64	70.33 ^b	27	29.67 ^a
p<0.05					
Raza	Dosis de α-tocoferol (UI)				

Charollais	500	63	36	57.14 ^a	27	42.86 ^a
	0	47	33	70.21 ^a	14	29.79 ^a
Dorper	500	52	26	50.00 ^a	26	50.00 ^a
	0	44	31	70.45 ^a	13	29.55 ^a

p=0.09

^zPorcentajes con diferente literal ^{ab} en cada columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

5.5 Discusión

5.5.1 Tasa de ovulación

La tasa de ovulación fue similar en OD y OI. Los resultados son contrarios a los reportados en ovejas por Karami *et al.* (2009), quienes indicaron que el ovario derecho tiene mayor actividad que el ovario izquierdo, ya que el ovario derecho presentó mayor incidencia de ovulaciones dobles, lo cual puede estar asociado a mayor circulación sanguínea y alta concentración de progesterona en suero. Posiblemente las diferencias se deban a que en el presente estudio las ovejas fueron estimuladas con gonadotropinas exógenas y en el caso de Karami *et al.* (2009), se usaron ovejas no estimuladas hormonalmente.

No se encontraron diferencias (p>0.05) en la tasa de ovulación entre ovejas Charollais y Dorper (19.67±1.65 vs. 16.57±1.87). Los resultados son diferentes a los reportados por Rodríguez (2004), quien reportó mayor (p<0.05) tasa de ovulación en ovejas Charollais que en Dorper (18.16±0.99 vs. 10.70±0.86). La variación en la tasa de ovulación fue mayor en el presente estudio, lo cual podría ayudar a explicar la ausencia de diferencias significativas entre razas. La mayor respuesta en las ovejas Charollais ha sido asociada al número de corderos nacidos que normalmente produce dicha raza (Schmidová *et al.*, 2014), lo cual sugiere que podría presentar una población folicular con capacidad de responder a la aplicación de gonadotropinas exógenas mayor que las ovejas Dorper. Estudios en ovejas (Lopez-Alonso *et al.*, 2005), vacas (Malhi *et al.*, 2008) y cabras (Lehloenya y Greyling, 2010) han reportado mayores

tasas de ovulación en hembras con poblaciones foliculares ováricas altas sometidas a tratamientos de superovulación.

La tasa de ovulación fue similar entre ovejas suplementadas o no con α -tocoferol (17.84 ± 1.63 vs. 18.40 ± 1.84). Los resultados concuerdan con los reportados por Raasch et al. (1997), al aplicar 300 UI de vitamina E en ovejas Suffolk y Hampshire (2.2 ± 1 vs 2.3 ± 1), aunque en dicho estudio las ovejas no fueron estimuladas con gonadotropinas exógenas.

No se encontró efecto significativo ($p > 0.05$) de la interacción entre raza y la dosis α -tocoferol, lo cual sugiere que la tasa de ovulación entre razas fue independiente de la aplicación de α -tocoferol.

5.5.2 Tasa de recuperación embrionaria

En el presente estudio la tasa de recuperación embrionaria fue similar ($p > 0.05$) entre ovejas raza Charollais (61.14 ± 5.29) y Dorper (45.95 ± 6.02). Los resultados son similares a los reportados por Rodríguez (2004) quien obtuvo una tasa de recuperación embrionaria para Charollais de 75.76 ± 8.6 y para Dorper de 63.61 ± 7.5 , sin encontrar diferencias ($p < 0.05$). Por otra parte, Cordeiro *et al.* (2003) y Forcada *et al.* (2011) mencionan que la tasa de recuperación embrionaria puede ser afectada por la presencia de adherencias post-operatorias, y en el presente estudio, algunas hembras ya habían sido candidatas en programas de transferencia de embriones. Además, la presencia de folículos grandes o en crecimiento al inicio del tratamiento de superovulación disminuye la producción de embriones (Veiga-Lopez *et al.*, 2006; Bartlewski *et al.*, 2008).

No se encontró efecto ($p > 0.05$) de la aplicación de α -tocoferol en la tasa de recuperación embrionaria, ni tampoco efecto de la interacción entre raza y dosis de α -tocoferol ($p > 0.05$).

5.5.3 Tasa de fertilización embrionaria

La aplicación de tratamientos de superovulación en general incrementa las concentraciones de estradiol, modificando el ambiente a nivel del oviducto y en

consecuencia se incrementa la cantidad de ovocitos no fertilizados y embriones degenerados (Folch *et al.*, 2001). La tasa de fertilización fue menor ($p < 0.01$) en ovejas Charollais que en Dorper (36.42% vs. 45.1%). La tasa de ovulación puede afectar la tasa de fertilización. Al respecto, tasas de ovulación altas (12.6 ± 0.25 ; Lymberopoulos *et al.*, 2001), medias (10.9 ± 2.3 ; Armstrong y Evans, 1984) y bajas (7.8 ± 1.39 ; McKelvey *et al.*, 1985) han sido asociadas con porcentajes de fertilización medios (81.9), bajos (72.0) y altos (90.0), respectivamente. En el presente estudio, aunque no se encontraron diferencias significativas en la tasa de ovulación entre razas, las ovejas Charollais presentaron respuestas aritméticamente mayores que las ovejas Dorper, por lo que la tasa de fertilización pudo verse disminuida. Por otra parte, la formación de adherencias post-operatorias también afecta el transporte espermático y en consecuencia se incrementa la cantidad de ovocitos no fertilizados (Forcada *et al.* 2011). Además, la inducción de ovulaciones frecuentes disminuye el contenido de ADN mitocondrial, generando ovocitos de baja calidad (Miyamoto *et al.*, 2010).

La tasa de fertilización embrionaria fue similar ($p > 0.05$) entre ovejas suplementadas o no suplementadas con α -tocoferol (46.93% vs. 42.92%). Aunque algunos autores (Agarwal y Allameni, 2004) afirman que en el folículo existen fuentes potenciales de ROS, como resultado de la actividad metabólica normal de las células de la granulosa, las cuales podrían reducir la tasa de fertilización. La ausencia de efecto al aplicar α -tocoferol podría sugerir que en el líquido folicular se encuentran compuestos antioxidantes que protegen al ovocito del daño producido por las ROS. Sin embargo, la producción excesiva de ROS puede producir daños que afectan la calidad del ovocito (Tamura *et al.*, 2008). Además, ovocitos con baja capacidad antioxidante tienen menor posibilidad de ser fecundados y desarrollarse (Kazemi *et al.*, 2013).

La suplementación con α -tocoferol no afectó la tasa de fertilización dentro de razas, porcentajes similares se observaron en ovejas de la misma raza suplementadas y no suplementadas. Sin embargo, la tasa de fertilización fue mayor ($p < 0.01$) en ovejas Dorper sin suplementación con α -tocoferol (69.84%),

con respecto a la de ovejas Charollais suplementadas (41.18%) y no suplementadas (31.54%).

5.5.4 Calidad embrionaria

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en los porcentajes de embriones de buena (62.72 vs. 59.37%) y mala calidad (37.28 vs. 38.1) para las razas Charollais y Dorper, respectivamente. El porcentaje de embriones de buena calidad es similar al 69% reportado en ovejas Suffolk (Tabarez-Rojas *et al.*, 2009) y 66% en ovejas Katahdin (Sánchez *et al.*, 2013) superovuladas. Las ovejas superovuladas pueden presentar tasas de ovulación altas, medias o bajas y las bajas respuestas han sido asociadas con mayor calidad embrionaria (Lymberopoulos *et al.*, 2001). Además, D'Alessandro *et al.* (1996) sugieren que la aplicación de 250 UI de FSHp puede generar mayores porcentajes de embriones viables en ovejas superovuladas.

La suplementación con α -tocoferol afectó la calidad de los embriones recuperados. El porcentaje de embriones de buena calidad fue menor ($p < 0.05$) en las ovejas suplementadas con 500 UI de α -tocoferol que en las no suplementadas (53.91 vs. 70.33%), mientras que el porcentaje de embriones de calidad mala fue mayor en las ovejas suplementadas (46.09 vs. 29.67%). Los resultados fueron contrarios y no concuerdan con los encontrados por Wang *et al.* (2002), quienes sugieren que al suplementar con α -tocoferol se incrementa la cantidad de embriones de buena calidad y el número de blastocistos. No obstante, Sales *et al.* (2008) indicaron que la suplementación con α -tocoferol no mejoró la calidad embrionaria en vaquillas superovuladas. Además, bajo condiciones *in vitro* la inclusión de vitamina E (600 y 800 μ M) puede ser embriotóxica (Wang *et al.*, 2002) y perjudicar el desarrollo embrionario (Sudano *et al.*, 2010).

Heinonen y Albanes (1994) mencionan que altas dosis en la suplementación de α -tocoferol puede causar hemorragias e interrumpir la coagulación sanguínea, además, en trabajos *in vitro*, dosis altas inhibieron la agregación de plaquetas. Por otra parte, Ebner *et al.* (2008) reportaron que la presencia de coágulos de

sangre en el complejo cumulus-ovocito estuvieron asociados a una reducida calidad del ovocito, tasa de fertilización y formación de blastocistos en comparación con los no afectados; estos mismos autores sugirieron que la presencia de sangre tiene un efecto detrimental en la calidad del ovocito y la futura segmentación en el estadio de blastocisto, y que la remoción de los coágulos de sangre no mejora la calidad del ovocito o el embrión.

La calidad embrionaria fue similar ($p>0.05$) entre ovejas suplementadas o no con α -tocoferol independientemente de raza. No obstante, se encontró un menor porcentaje de embriones de buena calidad en las ovejas suplementadas con 500 UI de α -tocoferol (Charollais: 57.14% y Dorper: 50%), mientras que un mayor porcentaje de embriones de buena calidad se obtuvo en las ovejas que no fueron suplementadas (Charollais: 70.21% y Dorper: 70.45%). Es posible que la calidad embrionaria pudo ser afectada por la aplicación de FSH (D'Alessandro *et al.*, 1996), que en conjunto con la aplicación de α -tocoferol, probablemente provocó un desbalance entre la cantidad de compuestos oxidantes y antioxidantes (Agarwal *et al.*, 2014). Finalmente, reduciendo la calidad del ovocito y posteriormente del embrión. Por otra parte, EFSA (2010), afirman que no hay evidencia suficiente de que los requerimientos mínimos de α -tocoferol en animales sean de 450 UI por día, por lo que es probable que la suplementación no haya sido adecuada.

5.6 Conclusión

La aplicación de 500 UI de α -tocoferol, en ovejas superovuladas de las razas Charollais y Dorper, no mejoró la tasa de fertilización ni la calidad de los embriones recuperados. Sin embargo, la raza Dorper mostró una mayor tasa de fertilización con respecto a Charollais.

5.7 Literatura citada

Agarwal A., and S. S. R. Allamaneni. 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod. BioMed. Online* 9: 338-347.

- Agarwal A., D. Durairajanayagam, and S. S. du Plessis. 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive BioMedicine Online* 12: 1-19.
- Agarwal A., S. Gupta, and S. Sikka. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18: 325-332.
- Aréchiga C. F., S. Vázquez-Flores, O. Ortiz, J. Hernández-Cerón, A. Porras, L. R. McDowell, and P. J. Hansen. 1998. Effect of injection of β -carotene or vitamine E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50: 65-76.
- Armstrong D. T., and G. Evans. 1984. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 71: 89-94.
- Azzi A. 2007. Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radical Biology & Medicine* 43: 16-21.
- Bartlewski P. M., B. D. Alexander, and W. A. King. 2008. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 75: 210-216.
- Brigelius-Flohé R., and M. G. Traber. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal* 13: 1145-1155.
- Comisión Nacional del Agua, Servicio Meteorológico Nacional (CONAGUA, SMN). Normales climatológicas Estado de México, municipio de Jocotitlán, estación climatológica Pozo Cuatro. Disponible en <http://smn.cna.gob.mx/es/información-climatologica-ver-estado=mex>. Consultado: 4 de junio de 2016.
- Cordeiro M. F., J. B. Lima-Verde, E. S. Lopes-Junior, D. I. A. Teixeira, L. N. Farias, H. O. Salles, A. A. Simplicio, D. Rondina, and V. J. F. Freitas. 2003. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive

- superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research Res.* 49: 19-23.
- D'Alessandro A. D., G. Martemucci, F. Toteada, M. Gambacorta, and A. Manchisi. 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. *Small Ruminant Research* 19: 255-261.
- Ebner T., M. Moser, O. Shebl, M. Sommergruber, C. Yaman and G. Tews. 2008. Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development. *Reproductive BioMedicine Online* 16: 801-807.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Scientific opinion on the safety and efficacy of vitamin E as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal* 8: 1635.
- Folch J., J. P. Ramón, M. J. Cocero, J. L. Alabart, and J. F. Beckers. 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 55: 1777-1785.
- Forcada F., M. A. Amer-Meziane, J. A. Abecia, M. C. Maurel, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muño-Blanco, B. Asenjo, M. I. Vázquez, and A. Casao. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. *Theriogenology* 75: 769-776.
- Fortier M. E., I. Audet, A. Giguère, J. P. Laforest, J. F. Bilodeau, H. Quesnel, J. J. Matte. 2015. Effect of dietary organic and inorganic selenium antioxidant status, embryo development, and reproductive performance in hyperovulatory first-parity gilts. *Journal of Animal Science* 90: 231-240.
- Grazul-Bilska A. T., J. D. Kirsch, J. J. Bilski, K. C. Kraft, E. J. Windorski, J. S. Luther, K. A. Vonnahme, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2007. Superovulation in sheep: number and weight of the corpora lutea and serum progesterone. *Sheep & Goat Research Journal* 22: 26-31.

- Heinonen P. O., y Albanes D. 1994. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* 15: 1029-1035.
- Hong Z., L. Hailing, M. Hui, and Z. Guijie. 2009. Effect of vitamin E supplementation on development of reproductive organs in Boer goat. *Anim. Reprod. Sci.* 113: 93-101.
- Karami S. H., J. Habibzad, and M. Toriki. 2009. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. *Animal Reproduction Science* 4: 362-369.
- Kazemi A., F. Ramezanzadeh, M. H. Nasr-Esfahani, A. A. S. Yaraghi, and M. Ahmadi. 2013. Does dietary fat intake influence oocyte competence and embryo quality by inducing oxidative stress in follicular fluid. *Iranian Journal Reproductive Medicine* 12: 1005-1012.
- Lehloenya K. C., and J. P. C. Greyling. 2010. The ovarian response and embryo recovery rate in Boer goat does following different superovulation protocols, during the breeding season. *Small Ruminant Research* 88: 38-43.
- Lindner G. M., and W. Jr Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 4: 407-416.
- Lopez-Alonso C., T. Encinas, A. Veiga-Lopez, R. M. Garcia-Garcia, M. J. Cocero, J. M. Ros, A. S. McNeilly, and A. Gonzalez-Bulnes. 2005. Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single short-acting dose of GnRH antagonist. *Theriogenology* 64: 1833-1843.
- Lymberopoulos A. G., G. S. Amiridis, B. Kühholzer, U. Besenfelder, V. Christodoulou, E. Vainas, and G. Brem. 2001. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology* 55: 1855-1862.

- Malhi S. P., P. G. Adams, J. R. Mapletoft, and J. Singh. 2008. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Animal Reproduction Science* 109: 100-109.
- Mayorga I., L. Mara, D. Sanna, C. Stelletta, M. Morgante, S. Casu, and M. Dattena. 2011. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology* 75: 1661-1668.
- McKelvey W. A. C., J. J. Robinson, and R. P. Aitken. 1985. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology* 24: 519-535.
- Miclea I., N. Pacala, A. Hettig, M. Zahan, and V. Miclea. 2012. Alpha-tocopherol and Ascorbic acid combinations influence the maturation of sheep oocytes. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 45: 310-313.
- Miyamoto K., E. F. Sato, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, Katsuragi M, Odo S, K. Utsumi, and M. Inoue. 2010. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 49: 674-681.
- Raasch A. G. 1997. Effect of supplemental vitamin E and A on reproductive performance and serological profiles of ewes managed in drylot. *Sheep Research Report. Paper 9.* Disponible en: http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1001&context=sheepreports_1997. Consultado: 3 de mayo de 2016.
- Riley J. C., and H. R. Behrman. 1991. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 198: 781-791.

- Rodríguez M. A. 2004. Efecto de la raza en la producción de embriones de ovejas superovuladas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. 61 p.
- Sales J. N. S., L. M. K. Dias, A. T. M. Viveiros, M. N. Pereira, and J. C. Souza. 2008. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. *Animal Reproduction Science* 106: 77-89.
- SAS Institute Inc. 2013. SAS/SAT 9.3 User's Guide. SAS Institute. Cary, N. C. USA.
- Sánchez F., H. Bernal, S. A. del Bosque, A. González, E. Olivares, G. Padilla, and A. R. Ledezma. 2013. Superovulation and embryo quality with porcine follicle stimulation hormone (pFSH) in Katahdin hair sheep during breeding season. *African Journal of Agricultural Research* 8: 2977-2982.
- Schmidová J., M. Milerski, A. Svitaková, L. Vostrý, and A. Novotná. 2014. Estimation of genetic parameters for litter size in Charollais, Romney, Merinolandschaf, Suffolk, Sumava and Texel breeds of sheep. *Small Ruminant Research* 119: 33-38.
- Sudano M. J., M. C. Mattos, C. B. Fernandes, R. R. Mazierio, and F. C. Landim-Alvarenga. 2010. *In vitro* production of bovine embryos using Sigma antioxidant supplement®, α -tocoferol and L-ascorbic acid. *Animal Reproduction* 1: 42-48.
- Tabarez-Rojas A, Porrás-Almeraya A, Vaquera-Huerta H, Hernández-Ignacio J, Valencia J, Rojas-Maya S, Hernández-Cerón J. Desarrollo embrionario en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. *Agrociencia* 2009; 43: 671-680.
- Tamura H., A. Takasaki, I. Miwa, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, T. Taketani, A. Matsuoka, Y. Yamagata, K. Shimamura, H. Morioka, H. Ishikawa, R. J. Reiter, and N. 2008. Sugino. Oxidative stress impairs

oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research* 44: 280-287.

Veiga-Lopez, A., M. J. Cocero, V. Dominguez, A. S. McNailly, and A. Gonzalez-Bulnes. 2006. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. *Reproductive Biology* 6: 243-264.

Wang X., T. Falcone, M. Attaran, J. M. Goldberg, A. Agarwal, and R. 2002. Sharma. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility* 1272-1277.