



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Loma Bonita

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

**EFFECTO DE LA SINCRONIZACIÓN CON UNA O DOS
ESPONJAS DE FGA SOBRE LA RESPUESTA
SUPEROVULATORIA EN OVEJAS**

TESIS

Que para obtener el título de :

LICENCIADA EN ZOOTECNIA

Presenta

SHEILA SOLEDAD JARQUIN IGNACIO

Director de tesis: Dr. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA

Loma Bonita, Oax

Abril del 2009



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

LA PRESENTE TESIS TITULADA “EFECTO DE LA SINCRONIZACIÓN CON UNA O DOS ESPONJAS DE FGA SOBRE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN OVEJAS”. PRESENTADA POR LA PASANTE SHEILA SOLEDAD JARQUIN IGNACIO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA, HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL JURADO EXAMINADOR PARA SER DEFENDIDA EN EL EXAMEN PROFESIONAL Y OBTENER EL TITULO DE LICENCIADA EN ZOOTECNIA.

JURADO EXAMINADOR

DR. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA
DIRECTOR

DR. JOSÉ ABAD ZAVALA
REVISOR

M.C. JOSÉ ÁNGEL RUEDA BARRIENTOS
REVISOR

LOMA BONITA, OAXACA, ABRIL DEL 2009

DEDICATORIA

A DIOS

Por ser el guía de mis proyectos y darme la fortaleza para cumplir una etapa más en mi vida.

A MIS PADRES

Silvia Ignacio Antonio y Abdón Jarquín Illescas

Por que a pesar de la adversidad nunca dejaron de creer en mí.
Gracias por darme la mejor herencia “mi educación” y por ser los mejores
padres.

Los amo

AGRADECIMIENTOS

A la UNPA

Por haberme permitido ser parte de ella y contribuido a mi educación.

AI CEIEPO

Por haberme brindado las facilidades para llevar a cabo el experimento, y las enseñanzas como las atenciones por parte de los doctores, trabajadores y prestadores de servicio de dicha institución.

Gracias al equipo que formamos para llevar a cabo el trabajo de campo de mi tesis y las de mis compañeros: Dr. Octavio Mejía, Dr. Javier Hernández, Dra. Mary Palma, MVZ. Ana Jiménez, Juan de Dios, Alma y Judith.

A mi director de tesis Dr. Octavio Mejía Villanueva, por su paciencia y sus enseñanzas.

A mis asesores Dr. José Abad Zavaleta y MC. José Ángel Rueda Barrientos, por sus consejos y apoyo en la tesis.

A mis maestros MC. Víctor Meza Villalvazo y MC. Ubaldo Aguilar Martínez por la ayuda en la revisión

A mis amigas de universidad por cinco años de convivencia: *Elo, Rox, Cris, y Adri.*

A mi hermano *Carlos*, por que nunca te has olvidado de mí y el apoyo incondicional que siempre me brindas.

En especial a *Francisco*, gracias por tu amor y por ser el ángel que me ayuda a levantarme en los momentos difíciles.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
3.	HIPÓTESIS.....	4
4.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1.	Características reproductivas de las ovejas domesticas.	5
4.2.	Ciclo estral de la oveja.....	6
4.3.	Fases del ciclo estral	6
4.3.1.	Estro.....	6
4.3.2.	Metaestro.....	7
4.3.3.	Diestro.....	7
4.3.4.	Proestro.....	7
4.4.	Manipulación artificial del ciclo estral.....	8
4.4.1.	Sincronización.....	8
4.4.2.	Estimulo superovulatorio.....	11
4.5.	Dinámica folicular.....	13
4.6.	Regresión prematura del cuerpo lúteo.....	14
4.7.	Servicio.....	15
4.7.1.	Inseminación artificial.....	15
4.7.2.	Inseminación con monta natural dirigida.....	16
4.8.	Recolección y evaluación de embriones.....	16
4.8.1.	Evaluación de la respuesta superovulatoria.....	16
4.8.2.	Recolección de embriones.....	17
4.8.3.	Clasificación de los embriones.....	20
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
8.	LITERATURA CITADA	32

INDICE DE CUADROS

1. Clasificación de embriones de acuerdo al grado de desarrollo.....	21
2. Clasificación de embriones de acuerdo a su calidad	21
3. Respuesta ovulatoria	29
4. Estructuras recolectadas	30

RESUMEN

El objetivo del presente estudio, fue evaluar la sincronización con dos esponjas de 20 mg de FGA por 12 días, para favorecer el número y la calidad de los embriones en ovejas donadoras. Se sincronizaron 34 ovejas adultas divididas en dos grupos de 17. El Grupo I, con una esponja de 20 mg de FGA durante 12 días y el Grupo II, con una esponja durante seis días y su reposición por una nueva hasta el día 12. Para la superovulación, a ambos grupos se les administraron 190 mg de FSH en esquema decreciente cada 12 h durante cuatro días (40, 30, 30, 30, 30, 20 y 10 mg), iniciando 48 h antes del retiro del progestágeno. A las 24 h posteriores al retiro del progestágeno se inició la detección de estro hasta las 36 h, y conforme presentaron conducta estral recibieron monta natural dirigida. A los siete días posteriores a la primera monta se recolectaron los embriones mediante laparotomía media ventral y se evaluaron de acuerdo a su calidad y grado de desarrollo. El 100 % de las ovejas del Grupo I (17/17) y II (17/17) presentaron estro. La distribución de porcentajes de estros detectados a las 24, 28, 36 h fue de 76, 18, 6 %, para el Grupo I y 18, 53 y 29 %, para el Grupo II; al contrastarse la hora media de presentación de estro se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el Grupo I (25.41 ± 0.76) y el Grupo II (29.64 ± 1.08). No existió diferencia significativa ($P > 0.05$) al contrastar CLT (13.47 ± 1.16 y 11.58 ± 0.82), CLN (12.82 y 11.58) para el Grupo I y II respectivamente. Sin embargo, al analizar CLR (0.64 y 0.00) y FP (0.05 y 0.52), presentaron diferencias ($P < 0.01$) entre ambos grupos. El número de ERT por oveja fue 7.41 ± 1.07 y 7.35 ± 1.39 , de los cuales ETT 5.64 ± 1.18 y 4.64 ± 1.18 , obteniendo de ENT 1.76 ± 0.59 y 2.70 ± 0.93 , para los Grupos I y

II, respectivamente, sin diferencia estadística ($P>0.05$). Con base en los resultados obtenidos, y las condiciones de este trabajo, se concluye que el uso de dos esponjas con 20 mg de FGA no favorece el número ni la calidad de los embriones a la recolección.

Palabras clave: calidad embrionaria, FGA, dos esponjas, superovulación

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the synchronization with two sponges, 20 mg of FGA for 12 days, to improve the number and quality of embryos in donor ewes. 34 adult ewes were synchronized in two groups of 17; Group I, with a sponge of 20 mg of FGA for 12 days and Group II, initially with a sponge over six days followed by a replacement sponge until the 12th day. For superovulation both groups were injected 190 mg of FSH in a decreasing scheme every 12 h during four days (40, 30, 30, 30, 30, 20 and 10 mg), beginning 48 h before withdrawal of progestagen. 24 h after withdrawal of progestagen the detection of estrus was started until 36 h, and according to the estrus behavior the ewes received natural mating. For the seven days after the first natural mating embryos were collected by ventral middle laparotomy and were evaluated according to their quality and level of development. 100% of the ewes in Group I (17/17) and II (17/17) showed estrus. The distribution of percentages of detected estrus at 24, 28 and 36 h was 76, 18, 6% for Group I, and 18, 53, 29% for Group II. When contrasted to the duration of output in estrus there was a significant difference ($P < 0.05$) between Group I (25.41 ± 0.76) and Group II (29.64 ± 1.08). There was not a significant difference ($P > 0.05$) when contrasted CLT (13.47 ± 1.16 and 11.58 ± 0.82), CLN (12.82 and 11.58) for Group I and II, respectively, however, when analysis of CLR (0.64 and 0.00) and FP (0.05 and 0.52), showed a difference ($P < 0.01$) between the groups. The number of ERT per ewe was 7.41 ± 1.07 and 7.35 ± 1.39 , of which ETT 5.64 ± 1.18 , and 4.64 ± 1.18 resulting the ENT 1.76 ± 0.59 and 2.70 ± 0.93 , for Groups

I and II, respectively, without statistical difference ($P>0.05$). Based on the results and under the conditions of this experiment, it appears that the use of two sponges with 20 mg of FGA does not improve the number and quality of embryos.

Keywords: embryo quality, FGA, two sponges, superovulation.

1. INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones es una biotecnología aplicada para el incremento de la producción animal y la conservación e intercambio de material genético a nivel mundial (Gibbons, 2004). La transferencia de embriones se comenzó a trabajar experimentalmente en ovinos y caprinos desde 1936. Sin embargo, hasta 1970 se utiliza a nivel comercial, siendo países pioneros Inglaterra y Estados Unidos y posteriormente Australia, Nueva Zelanda, Francia, Sudáfrica y Canadá (Mejía, 2008; Brackett *et al.*, 1998).

La transferencia de embriones, inició con la finalidad de utilizar en gran escala el potencial genético de las hembras de diferentes especies, ya que permite la formación de rebaños genética y productivamente uniformes, al aumentarse la presión de selección y reducirse el intervalo entre generaciones; con esta técnica se ha podido obtener un mayor número de embriones y crías de una hembra genéticamente superior a lo que pudiera obtenerse de manera normal en toda su vida reproductiva, lo cual justifica los altos costos que implica dicha técnica (Mejía, 2008; Gibbons, 2004).

Para la recolección de embriones, se requiere llevar a cabo las técnicas de sincronización y superovulación. La sincronización del ciclo estral en ovejas se realiza generalmente, a través de la administración de progesterona (P_4) natural o sintética, lo que permite agrupar la presentación del estro con la finalidad de dar monta dirigida, inseminar artificialmente o transferir embriones, y así facilitar el manejo de los animales al tener lotes homogéneos.

El uso de esponjas intravaginales, con P₄ sintética es común en los pequeños rumiantes para sincronizar, ya que inhiben la secreción de gonadotropinas, el desarrollo folicular y la ovulación. Desde el inicio de su uso, se propuso que la duración del tratamiento debería ser igual o superior a la vida del cuerpo lúteo (CL); es decir de 9 a 14 días (Robinson *et al.*, 1968; Quinlivan y Robinson, 1969). Algunos estudios indican que la sincronización a base de progestágenos, con tratamientos superiores a los 7 días disminuyen la fertilidad; ya que después de este periodo hay un descenso en los niveles de P₄ proporcionados por los dispositivos, lo que provoca un incremento prematuro en los pulsos de LH (hormona luteinizante) sin ocasionar la ovulación, al prolongar el crecimiento del folículo dominante y retrasar su ovulación, que en consecuencia compromete la fertilización del ovocito (Viñoles *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2007). También impide el desarrollo de otros folículos en crecimiento (Rubianes *et al.*, 1996). Por lo que los protocolos de superovulación permiten vencer los mecanismos inhibidores establecidos por el folículo dominante, y así aumentar la tasa de ovulación (González *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se propuso el uso de dos esponjas, colocando una esponja de 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA) durante seis días y sustituyéndola por una nueva otros seis días, con el fin de que no disminuyan los niveles de P₄ al día siete, para comparar la obtención de embriones de mejor calidad, a los obtenidos con la sincronización de una sola esponja durante 12 días.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar en ovejas donadoras el efecto de la sincronización del ciclo estral con una y dos esponjas de 20 mg de FGA sobre la respuesta a la superovulación con FSH en la recolección de embriones.

Objetivos específicos

1. Evaluar el uso de dos esponjas intravaginales impregnadas de 20 mg de FGA en la sincronización de ovejas; respecto al uso de una esponja, en el número y calidad de embriones transferibles.
2. Comparar la respuesta superovulatoria en base al número de cuerpos lúteos.
3. Determinar y comparar la proporción de ovejas en estro entre las 24 y las 36 horas posteriores al retiro de la esponja.

3. HIPÓTESIS

La sincronización del ciclo estral de ovejas donadoras de embriones con dos esponjas de 20 mg de FGA, respecto al uso de una sola esponja favorecerá el número y la calidad de los embriones a la recolección.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Características reproductivas de las ovejas domesticas.

Las ovejas domesticas son consideradas como una especie poliestrica estacional, debido a que presentan receptividad sexual durante algunos meses del año y anestro en otros. La estación reproductiva abarca en nuestro país, de manera general, los meses de julio a febrero, mientras que el anestro comprende los meses de marzo a junio, de modo que las crías nacen durante la primavera, época más favorable del año. Esta estacionalidad se rige por el fotoperiodo, por lo que la actividad estral comienza durante la época de días más cortos. Particularmente la época de anestro puede presentar diferente duración, dependiendo principalmente de factores como la raza y la nutrición; es posible encontrar importantes variaciones aún dentro de los animales de un mismo rebaño (Mejía, 1997; Hafez, 2002).

Cabe destacar que algunas razas puras de lana como la Suffolk y la Hampshire, presentan una época de reproducción y de anestro bien definida; otras razas de lana como: Merino, Dorset, Rambouillet, Ille de France o Charolais tienen una época de reproducción más prolongada, pero con un anestro largo. Las ovejas de pelo como Pelibuey, Black Belly, y en menor proporción Kathadin, Dorper y Santa Cruz; presentan una época de reproducción prolongada con un anestro corto (Mejía, 1997).

Los ovinos pueden alcanzar la pubertad en promedio de los seis a nueve meses de edad. Se conoce que las ovejas de pelo alcanzan la pubertad antes que las

de lana; y en el caso de los ovinos criollos, por su lento crecimiento derivado de un nulo mejoramiento genético más un ambiente adverso, es más retardada. También se ha demostrado, que bajo las mismas condiciones, las hembras alcanzan la pubertad antes que los machos (Mejía, 1997; Hafez, 2002).

La prolificidad depende de la tasa ovulatoria y es difícil de predecir, ya que está determinada por factores como la época del año, raza, edad, peso y la condición corporal (De Lucas *et al.*, 1996; Fammy, 1996).

4.2. Ciclo estral de la oveja.

El ciclo estral se define como un fenómeno rítmico, con periodos regulares limitados de receptibilidad sexual, asociados, en la mayoría de los casos, con la liberación de óvulos capaces de ser fertilizados, y en la oveja tiene una duración de 17 días en promedio (Ortiz, 2005). El conocimiento de los diferentes eventos ováricos y uterinos que suceden durante el ciclo estral, es importante en programas de reproducción animal aplicada, donde se modifica el ambiente hormonal y por ende la fisiología del aparato reproductivo (Heredia, 1998).

4.3. Fases del ciclo estral

4.3.1. Estro. Es considerado la etapa de receptividad sexual de la hembra. Los estrógenos secretados por los folículos son los responsables de los cambios anatómicos y del comportamiento relacionado con el estro, tales como permanecer inmóvil ante los intentos del macho o de otras hembras para montarla, movimientos de la cola (banderilleo), inquietud, y vulva edematizada. La duración del estro varía de 24 a 48 h, ocurriendo la ovulación entre las 24 y

las 30 h de iniciado el estro. Se considera finalizado el estro en el momento en que la hembra ya no permite más la monta del macho, iniciando la siguiente fase, el metaestro (Mejía, 1997).

4.3.2. Metaestro. Este inicia después de la ovulación y dura 3 días, en esta fase inicia la formación de un coágulo de sangre en el ovario llamado cuerpo hemorrágico, por la influencia de la oleada de LH, las células de la granulosa y de la teca, se transforman en células lúteas grandes y pequeñas que después llenan el antro del folículo; e inicia paulatinamente la secreción de P_4 (Evans y Maxwell, 1990; McDonald, 1991).

4.3.3. Diestro. Se caracteriza por la plena funcionalidad del CL y la producción de niveles de P_4 superiores a 1 ng/ml hasta 9 ng/ml medidos en sangre, leche, heces u orina (Mejía, 1997). En caso de que el óvulo sea fertilizado, el CL se mantiene vivo durante casi toda toda la gestación; pero si el óvulo no es fecundado, el CL sólo permanece funcional durante 11 a 12 días, después se lisa (luteólisis) por acción de la prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) producida en el endometrio del útero, con lo que se reinicia el proestro (McDonald, 1991).

4.3.4. Proestro. Inicia el crecimiento folicular, el que se encuentra bajo el control de las gonadotropinas FSH (hormona folículo estimulante) y LH. La FSH estimula el crecimiento temprano de los folículos y la LH es necesaria para complementar las últimas fases del crecimiento folicular así como la maduración del núcleo del óvulo. Las gonadotropinas también hacen que el folículo secrete estrógenos que se liberan al torrente circulatorio. Cuando el nivel de estrógenos es alto, generalmente al final del proestro, se dispara en consecuencia la

posterior oleada preovulatoria de LH, produciendo cambios en la pared del folículo que conducen a su ruptura y a la liberación del óvulo. Además de los estrógenos, el folículo (o los folículos) que madura produce también la hormona inhibina, la cual suprime selectivamente la secreción de FSH, y evita el crecimiento folicular adicional cuando ya existen folículos preovulatorios (de Graff), con lo que se limita el ritmo de ovulación. La duración de esta fase es de aproximadamente dos días (Evans y Maxwell, 1990; McDonald, 1991).

4.4. Manipulación artificial del ciclo estral

4.4.1. Sincronización. La sincronización del ciclo estral se realiza con el objetivo de agrupar hembras en estro en pocos días, o bien para sincronizar los partos (Soto y Medrano, 2008).

La sincronización del estro se puede lograr a través de métodos naturales y farmacológicos. Dentro de los farmacológicos, algunos pueden usarse casi en cualquier época del año, como es la P₄ natural o sintética (progestágenos). Además existen otros fármacos de acción luteolítica como la PGF₂ α , sin embargo, ésta se utiliza exclusivamente en época de reproducción, ya que depende de la presencia de un CL funcional (Hafez, 2002).

En México, el método de elección había sido el uso de esponjas impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona (17 α -acetoxo-9 α -fluro-11 β -hydroxy-pregn-4-ene-3,20-dione), colocadas vaginalmente durante 9 a 12 días. Sin embargo, actualmente las esponjas comerciales contienen únicamente 20 mg de FGA, lo cual se ha demostrado no ser diferente en los resultados

reproductivos tras su utilización en rebaños de aptitud para producir carne o leche (Martín *et al.*, 2007).

El FGA liberado lentamente, simula la presencia de un CL, inhibiendo la secreción de GnRH a nivel hipotalámico y la secreción de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH, limitando el desarrollo folicular y la ovulación. Al retirar la esponja, la hipófisis incrementa la liberación de gonadotropinas, con lo cual se estimula el crecimiento folicular por acción de la FSH, así como la maduración folicular final y se presenta la ovulación por efecto de la LH. También es factible usar dispositivos denominados CIDR's, que contienen 300 mg de P₄ natural. Tanto con la P₄ sintética como con la natural, la presentación de los estros ocurre en la mayoría de las donadoras entre las 24 y 36 h posteriores a su retiro (Mejía, 2008).

Algunos trabajos han reportado que una de las desventajas de los progestágenos, es que al ser utilizados por más de 14 días pueden resultar en una baja fertilidad del estro inducido (Quispe *et al.*, 1994). La baja fertilidad ha sido atribuida a un deficiente transporte de gametos dentro del cérvix, los cuernos uterinos y el oviducto (Hackett *et al.*, 1981; Herrera *et al.*, 1990). En ovejas, cuando se colocan esponjas con progestágenos, la reducción en las concentraciones de P₄ puede promover un crecimiento folicular excesivo, así como la persistencia de folículos grandes, lo que aumenta la edad de dichos folículos ovulatorios y del ovocito que contienen (Menchaca y Rubianes, 2004). Algunos trabajos recientes en ovejas, indican que los progestágenos pueden ser usados durante periodos largos sin afectar la fertilidad, y que el posible efecto negativo se debe a una disminución en las concentraciones del

progestágeno exógeno, lo cual puede ocasionar: secreción de gonadotropinas, la presentación de una oleada de desarrollo folicular y un desbalance hormonal, originado por niveles ascendentes de estradiol (López *et al.*, 1990; Mitchel *et al.* 2002; González *et al.*, 2003; Folch *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2005). Por lo anteriormente explicado, se ha propuesto la sustitución de la esponja al día seis o siete de haber sido colocada la primera.

Molina *et al.* (2005) reportaron que el nivel de progestágenos disminuye alrededor del día seis a siete de haber sido colocada la esponja, en esquemas de sincronización donde el dispositivo permaneció insertado por 12 a 14 días. Caso contrario sucede en una fase lútea sin manipulación, donde las concentraciones séricas de P₄ son bajas al principio y se van incrementando conforme avanza el ciclo estral (Menchaca y Rubianes, 2004).

Cruz *et al.* (2007) sincronizaron el ciclo estral de ovejas, con una o dos esponjas con 40 mg de FGA durante 12 días más 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG), al retiro de la esponja. Estos autores reportan una disminución de los niveles del progestágeno a partir del día siete de haber colocado las esponjas; mientras que en el grupo donde la esponja fue sustituida por una nueva al día siete, los niveles de P₄ se mantuvieron elevados durante los 10 primeros días, para disminuir hasta los dos últimos. El resultado, fue una fertilidad significativamente mayor en las hembras sincronizadas con dos esponjas, 94.12 %, en comparación con las sincronizadas con una esponja, 61.11 %, después de haber realizado inseminación intrauterina con semen fresco.

Mejía y Núñez (2008) sincronizaron el ciclo estral de ovejas con una o dos esponjas de 20 mg de FGA durante 10 días más la administración de 200 UI de eCG a su retiro, y no encontraron diferencias significativa en ovejas en celo para ser inseminadas, ni en la fertilidad de las ovejas sincronizadas con una esponja y las sincronizadas con sustitución de esponja al día seis.

Para la recuperación de embriones, cualquiera que sea el protocolo para sincronizar, el siguiente paso a la sincronización es un estímulo superovulatorio con la administración de hormonas que estimulen el crecimiento folicular.

4.4.2. Estimulo superovulatorio. Con la ovulación múltiple se trata de aumentar el número de folículos y ovocitos capaces de ovular y por tanto, esta técnica es de gran utilidad para la producción de embriones genéticamente superiores (Maxwell y Butler, 1984).

El efecto superovulatorio puede conseguirse incrementando los niveles de gonadotropinas en sangre, antes de que se inicie la atresia folicular; es decir de tres a cinco días antes de la ovulación, siendo las más utilizadas eCG, gonadotropina coriónica humana (hCG), o con el uso de la FSH de origen porcino (Driancourt y Fry, 1992; Buxade, 1996).

La eCG tiene una vida media larga, por lo que al usarla como tratamiento superovulatorio estimula el desarrollo folicular durante varios días, lo cual ocasiona que a nivel ovárico se continúen desarrollando pequeños folículos después de ocurrida la superovulación. Estos folículos pueden persistir hasta el momento en que se realiza la recolección de los embriones, y al parecer, los estrógenos producidos por estos folículos anovulatorios pueden ser suficientes

para desencadenar la secreción prematura de $\text{PGF2}\alpha$, y la regresión prematura de los CL formados (Baird *et al.*, 1976; Saharrea *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 1981; Mejía, 2008). Además, se ha comprobado en ovejas, que sobreviven más CL hasta el día de la recolección embrionaria cuando el tratamiento superovulatorio se provoca con FSH, en comparación con el uso de la eCG (Schiewe *et al.*, 1990). Por ello es preferible utilizar la FSH, ya que provoca un mayor número de ovulaciones, menor número de folículos anovulatorios y más embriones recuperados y de mejor calidad, además de producir una respuesta lútea más aceptable y consistente (Cognie *et al.*, 1985; Schiewe *et al.*, 1990). Dado que la FSH de origen ovino o porcino tiene una vida media corta de 5 h, se requiere de seis a ocho inyecciones a intervalos de 12 h, iniciadas dos o tres días antes de remover el progestágeno, para mantener suficiente concentración sanguínea y originar una respuesta ovárica (Córdova *et al.*, 2008). Los esquemas de superovulación sugieren dosis de 180 a 200 mg, constantes o decrecientes (Alwan *et al.*, 1998). Existen estudios donde se reporta que en pequeños rumiantes, dosis mayores a 180 mg pueden originar la formación de folículos anovulatorios, de cuerpo lúteo en regresión (CLR), la recuperación de un mayor número de ovocitos y por ende un menor número de embriones (Mejía *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2007).

Otros trabajos muestran mejores resultados cuando se utilizan dosis decrecientes de FSH, ya que mediante el seguimiento por ecografía, indican que este protocolo induce el crecimiento de un mayor número de folículos hacia las categorías preovulatorias (Cocero *et al.*, 1999).

La administración de FSH, con inyecciones cada 12 h, comienza a actuar sobre la población folicular presente en el ovario de la oveja entre las 12 y 24 h después de iniciado el tratamiento. A partir de ese momento, y hasta las 48 h, se observa un marcado crecimiento de los folículos desde los 2 mm de diámetro hasta los 5 mm. Los folículos en crecimiento alcanzarán el tamaño preovulatorio (5 mm) entre las 36 y 60 h, pero especialmente entre las 48 y 60 h (González *et al.*, 1995).

4.5. Dinámica folicular.

El proceso de crecimiento continuo y regresión de folículos antrales que conduce al desarrollo del folículo preovulatorio se conoce como dinámica folicular y se refiere al crecimiento de dichas estructuras en oleadas (Espinoza *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la emergencia de los folículos que crecen de 3 mm hasta 5 mm ocurre en ondas, en un promedio de 3 ondas que emergen alrededor de los días cero, seis y once del ciclo estral de la oveja. En promedio de 1.2 a 1.5 folículos alcanzan 5 o más mm de diámetro en cada onda, pero esto depende de la raza (Bartlewsky *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2000; Ginther *et al.*, 1995; Leyva *et al.*, 1999; Viñoles *et al.*, 1999). La LH ayuda a la maduración final del folículo alcanzando el tamaño de preovulatorios a partir de los 4 mm de diámetro, y produciéndose la ovulación 24 h después de la descarga preovulatoria de LH (López *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado, una deficiencia de P₄ durante la fase lútea propicia un incremento en la frecuencia de pulsos de FSH y LH, permitiendo un prolongado crecimiento del folículo dominante, formando folículos persistentes y dando

lugar a la ovulación de ovocitos envejecidos, que pueden alterar los procesos de fertilización y desarrollo embrionario temprano (Greve *et al.*, 1995; Viñoles, 2000). Mediante ecografía, se ha evidenciado el efecto negativo de la presencia de folículos mayores a 6 mm de diámetro y la ventaja de la presencia de folículos de 2 a 3 mm de diámetro, al comienzo del tratamiento de ovulación múltiple; es decir, en ausencia de un folículo dominante, existe una mejor respuesta ovulatoria ya que esto implica la presentación de un mayor número de ovulaciones (Gibbons, 2004; Rubianes *et al.*, 1996; Veiga *et al.*, 2008).

4.6. Regresión prematura del cuerpo lúteo.

Algunos trabajos han reportado que la regresión prematura de los CL es un fenómeno asociado normalmente a la superovulación, que origina una pobre, o incluso nula, recuperación de embriones (Cerbón, 1995).

En condiciones en donde la dinámica folicular se ve alterada, como en la superovulación, diversas investigaciones han demostrado que la regresión prematura de los CL se debe a una programación adelantada de la secreción de las PGF2 α uterinas (Southee *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1991; Battye, 1988), originada por niveles elevados del estradiol, proveniente de los folículos antrales formados (Baird *et al.*, 1976; Silvia *et al.*, 1992), los cuales al interactuar con sus receptores estimulan la síntesis para receptores de oxitocina. Así, la oxitocina de origen hipofisiario secretada en forma pulsátil, interactúa con sus receptores y favorece la liberación de la PGF2 α uterina (McCracken *et al.*, 1984; Silvia *et al.*, 1991). Las elevadas concentraciones de PGF2 α a su vez estimulan al CL para que éste libere más oxitocina (Moore *et*

al., 1986), estableciéndose un ciclo de retroalimentación positivo entre estas dos hormonas. La síntesis de PGF₂α termina de 6 a 12 h después que las concentraciones de P₄ regresan a su nivel basal (Hunter *et al.*, 1989; Swenson y Reece, 1999; Cunningham, 1999).

En ovejas como en cabras, se ha encontrado que el número de embriones transferibles está relacionado con la presencia de CL normales, que producen niveles de P₄ plasmática superiores a 1 ng/ml hasta el día en que se realiza la recolección embrionaria (Cerbón, 1995).

El paso siguiente a la superovulación es la detección de estros, para dar servicio a las hembras, y fertilizar todos los óvulos liberados.

4.7. Servicio

El servicio puede darse mediante inseminación artificial o monta natural.

4.7.1. Inseminación artificial. La IA es una técnica en la que el semen previamente recolectado de los machos es depositado en el tracto reproductivo de las hembras para producir la fecundación de los óvulos maduros. La IA en la oveja puede ser vaginal, cervical o intrauterina; los métodos difieren en cuanto a su complejidad y expectativas de éxito.

La inseminación con mejores resultados ha sido la intrauterina, ya sea con semen congelado o fresco; se puede realizar a tiempo fijo alrededor de las 50-60 h después de retirada la P₄ natural o sintética, utilizando un laparoscopio y con una concentración de por lo menos 100 millones de espermatozoides (Mejía, 2008).

4.7.2. Inseminación con monta natural dirigida.

La monta natural dirigida consiste en reunir a la hembra en celo con el semental seleccionado, sujetando a la oveja en forma tal que sea posible la monta (Hafez, 2002). A las donadoras detectadas en estro se les debe dar monta dirigida tres o cuatro veces al día, mientras presenten estro conductual, debido a que de esta forma se incrementan las posibilidades de fertilización de los óvulos y por tanto, de colectar un mayor número de embriones. En ovejas domesticas, con monta natural dirigida se logran gestar más del 80 % de las hembras inseminadas (Mejía, 2008).

De seis a siete días posteriores a la primera inseminación con monta natural dirigida o IA, se realiza la recolección de embriones.

4.8. Recolección y evaluación de embriones.

4.8.1. Evaluación de la respuesta superovulatoria. Es necesario antes de recolectar, evaluar la respuesta superovulatoria para estimar el número de embriones a obtener. Aquellas hembras que presentan en ambos ovarios un total de tres CL o menos, no se consideran superovuladas y no debe continuarse en ellas con la recolección. La calidad de los CL se evalúa con base en su tamaño y color, para determinar si son normales (grandes, bien definidos, con buena irrigación y de color naranja o rojo brillante), o si se encuentran en regresión prematura (pequeños, de color blanco o rosa pálido y sin irrigación marcada) (Mejía, 2008; Schiewe *et al.*, 1991; Flores, 1991).

4.8.2. Recolección de embriones. En los pequeños rumiantes existen diferentes técnicas para recolectar embriones, y pueden ser por laparotomía media ventral, por laparoscopia o por transcervical (Gibbons y Cueto, 1995).

La técnica por laparoscopia, consiste en tres punciones (con trócares) en la cavidad abdominal. La primera punción permite introducir el laparoscopio, la segunda una sonda de tres vías y la tercera, una pinza no traumática. Esta pinza permite la manipulación del tracto reproductivo, a fin de hacer avanzar la sonda por la luz uterina y fijar la unión útero tubárica durante el flujo de la solución de lavado. Esta técnica presenta una menor eficiencia en la recuperación de embriones, de un 60 % y la cirugía es más tardada que la laparotomía media (McKelvey *et al.*, 1986). La recuperación transcervical, es mediante la introducción de una sonda de Foley a través del cérvix, pero se lesiona en la mayoría de las ocasiones la vagina y el cérvix de las hembras (Mejía, 2008). Por lo que no se ha desarrollado del todo, debido a que es una técnica cuya eficiencia es muy variable, logrando una recuperación embrionaria del 36 % en ovejas (Flores *et al.*, 1992).

El método que permite la mejor recuperación de embriones en ovejas es el quirúrgico, por medio de una laparotomía media ventral, que permite la exteriorización del útero, el lavado de los cuernos uterinos y la evaluación precisa de la respuesta ovárica (Valencia, 1998; Mejía, 2008).

La laparotomía consiste en una incisión de aproximadamente 3.5 a 4 cm de largo y 4 cm anterior a la ubre, sobre la línea media. Se exterioriza el útero y posteriormente se lava cada cuerno uterino por separado, utilizando una sonda de Foley de calibres 8 ó 10 G, que se introduce en la base del cuerno mediante

una punción realizada con un catéter intravenoso (14 G x 5½), para a través de esta sonda recuperar el medio de lavado, hacia un filtro concentrador. A través de otro catéter intravenoso (18 G x 1¼), insertado en la punta del cuerno uterino y dirigido hacia la base, se administran 60 ml de solución Dulbecco modificada (a la que se le agregan 0.4 % de albúmina sérica bovina y 100 UI/ml de penicilina G sódica). Actualmente se puede adquirir un medio de lavado comercial completo al que no es necesario agregar albúmina ni antibiótico, el cual contiene D-PBS (solución salina Dulbecco fosfatada y bufferada), agua bidestilada, cloruro de calcio, piruvato de sodio, glucosa, alcohol polivinílico (PVOH), gentamicina y kanamicina. Concluida la recolección de los embriones, el útero se regresa a la cavidad abdominal y se sutura la incisión hecha en línea media y en piel (Mejía, 2008). Esta técnica permite una recuperación del 70 % de los embriones (Gibbons y Cueto, 1995). La desventaja principal de la laparotomía media ventral, es el que se ocasionan adherencias y fibrosis en los ovarios y el útero; así como en la línea media, por lo que el uso repetido de hembras de alto valor genético de las que se obtienen los embriones se reduce. Sin embargo, si se realiza adecuadamente la recolección de embriones mediante laparotomía, manejando delicadamente los tejidos, evitando el sangrado en los ovarios, el útero, los músculos o la piel y sobre todo la deshidratación del útero expuesto, puede llevarse a cabo la recolección de cuatro a seis ocasiones en la misma hembra donadora (Mejía, 2008)

El número de embriones obtenidos por las donadoras es muy variable, debido principalmente a las diferencias en la condición fisiológica en la que se encuentran los ovarios al momento de la superovulación. Existen hembras de

las que se recolectan entre 12 y 15 embriones transferibles, mientras que en otras ninguno. En promedio puede considerarse que se obtienen seis embriones transferibles por hembra donadora (Mejía, 2008).

Los embriones, para ser transferidos en fresco o congelados, se obtienen generalmente en el tercio superior de los cuernos uterinos entre los días cinco a siete posteriores al estro; su grado de desarrollo corresponde al de mórula o blastocisto. A esta edad de desarrollo los embriones de ovinos y caprinos, deberán medir entre 140-160 μm de diámetro (Elsden, 1987; Trejo, 1996). Para llevar a cabo la congelación es necesario el estadio de mórula compacta o blastocisto (Gibbons y Cueto, 1995). En el estadio de desarrollo de entre 40 y 60 células (días cuatro a cinco), los embriones abandonan el oviducto y se trasladan al cuerno del útero e inician su compactación. Posteriormente, los blastómeros pierden su forma esférica al adherirse unos con otros; así, los embriones en estos grados de desarrollo reciben el nombre de mórulas iniciales o tempranas, mórulas y mórulas compactas, y tienen una edad de entre 5 - 6.5 días (Palma, 2008; Hernández, 2008). Hacia la última fase del estadio de mórula, los blastómeros producen líquido y comienzan a diferenciarse en dos tipos de células, las que se acomodan hacia la periferia del embrión para constituir a las células del trofoblasto y las que permanecen en la parte interna formando la masa celular interna. La masa de células internas se ubica y se dirigen hacia un polo del embrión, dejando un espacio lleno de líquido denominado blastocele, para dar lugar al siguiente estado de desarrollo, el de blastocisto. Estos embriones tienen una edad aproximada de 6.5 a 7.5 días (Palma, 2008; Hernández, 2008). Se deben de descartar los embriones de

menos de 32 células. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración (Gibbons y Cueto, 1995)

4.8.3. Clasificación de los embriones. La calidad de los embriones es un factor relevante para lograr una alta eficiencia reproductiva. El éxito en la transferencia es muy bajo con embriones con dos o más días de retraso respecto al estado esperado de desarrollo (Moore, 1980; Gibbons, 2004). La elección correcta de embriones aumenta de manera importante los porcentajes de gestación (Wright, 1981).

Los embriones al ser recuperados, se evalúan morfológicamente con un microscopio estereoscópico y son clasificados con una metodología avalada por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones o IETS (Baril *et al.*, 1995). De manera estricta, se consideran como embriones transferibles, aquellos con un grado de desarrollo que corresponda al día en que son recolectados (Baril *et al.*, 1995; Moore, 1980), como se muestra en el Cuadro 1. La calidad de los embriones se clasifica en cuatro categorías por su aspecto morfológico (Baril *et al.*, 1995; Elsdén, 1987; Trejo, 1996) como muestra el Cuadro 2. Los embriones de calidad 1, 2 y 3 se consideran viables para su transferencia y los de categoría 4 como no transferibles (Palma, 2008).

Cuadro 1. Clasificación de embriones de acuerdo al grado de desarrollo según la IETS.

Clasificación	Grado de desarrollo
1	Ovocito (sin fertilizar)
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula (compacta)
5	Blastocisto inicial
6	Blastocisto (maduro)
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto expandido maduro
9	Blastocisto eclosionado (en eclosión)

Fuente: Baril et al., 1995.

Cuadro 2. Clasificación de embriones de acuerdo a su calidad según la IETS

Clasificación	Calidad	Características
1	Excelente	Embriones compactos y esféricos; simétricos; células de tamaño, color y textura uniformes, sin gránulos en el citoplasma con pocas vesículas pequeñas y espacio perivitelino vacío.
2	Bueno	Embriones con ligera asimetría; algunos blastómeros extruidos y un ligero retardo en su desarrollo.
3	Regular	Ligero grado de degeneración; blastómeros esféricos dispares, poco compactos y de tamaño variable; retardo de 1 a 2 días en su desarrollo; masa celular aparentemente viable pero con grandes vesículas entre las células y superficie irregular; color muy claro o muy oscuro y material de desecho en el espacio perivitelino.
4	Degenerado	Embriones con zona pelúcida rota; blastocele no visible con grandes zonas de degeneración; poca cantidad de células y blastómeros sueltos de diferentes tamaños.

Fuente: (Baril et al., 1995).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. El Centro se encuentra ubicado en el Km 53.1 de la carretera federal México-Cuernavaca, en el poblado de Tres Marías, municipio de Huitzilac en el estado de Morelos, con las coordenadas geográficas de 19° 13' latitud norte, 99° 14' longitud oeste y a una altura de 2,810 msnm. El clima de la región es templado semi-frío con verano fresco y largo, precipitación promedio anual de 1,724.6 mm y temperatura media anual de 9.9 °C, clasificado como C (w2) (w) (b1) i, de acuerdo a la clasificación de Köepen modificada por Enriqueta García (Gómez, 1991).

Animales experimentales

Se utilizaron 34 ovejas adultas, 17 ovejas Suffolk y 17 Dorset, las cuales fueron divididas al azar en dos grupos experimentales de igual tamaño, con edades de cuatro a seis años y una condición corporal de 2.5 a 3, de acuerdo con la escala subjetiva de 0 a 5 (Russel *et al.*, 1969). La alimentación de las ovejas se basó en pastoreo de 8 am a 3 pm en praderas de trébol blanco (*Trifolium repens*), Rye grass (*Lolium multiflorum*), y Orchard (*Dactylis glomerata*) y en la tarde se suplementó con concentrado comercial, proporcionando 3.05 Mcal de EM y 14.7 % de PC/Kg de MS y Avena (*Avena sativa*).

Tratamiento de sincronización y superovulación

El primer grupo, se conformó de 17 ovejas sincronizadas con P₄ sintética por medio de una esponja intravaginal de 20 mg con FGA¹ durante 12 días. El segundo grupo, fue 17 ovejas sincronizadas con el mismo progestágeno, durante 12 días, a diferencia del anterior grupo, al día seis se retiró la esponja y se sustituyó por otra esponja con la misma concentración hormonal.

Dos días antes del retiro de la esponja, es decir al día 10, se inició la superovulación de las ovejas, siendo el mismo protocolo de superovulación para ambos grupos, mediante el uso de la FSH² en dosis decrecientes aplicando siete inyecciones con intervalos de 12 h entre sí, en el primer día se aplicó 40 mg a las 8 am y 30 mg a las 8 pm; el segundo día se aplicó 30 mg a las 8 am y a las 8 pm; el tercer día se aplicó 30 mg a las 8 am y 20 mg a las 8 pm; para el cuarto día se aplicó 10 mg a las 8 am sólo en borregas que no mostraron estro a las 24 h. A las que presentaron el estro ya no se les aplicó la última dosis, por tal se administró una dosis total de superovulación de 190 mg por oveja y en las que presentaron el estro a las 24 h, tuvieron una dosis total de 180 mg.

Detección de estro y monta natural dirigida

La detección de estros se inició a las 24 posteriores al retiro de la esponja hasta las 36 h, con la ayuda de un semental con mandil y conforme la oveja presentó estro conductual recibieron monta natural con un semental correspondiente a la raza de la oveja, cada 8 h mientras la oveja permaneció receptiva.

¹ Chronogest® Dispositivo vaginal con acetato de fluorogestona, Intervet. Francia.

² Folltropin-V® Extracto de pituitaria porcino, Bioniche. Canadá.

Recolección y evaluación de embriones

Se dietaron las ovejas 24 h antes de la recolección de embriones para evitar la regurgitación de líquido ruminal durante la cirugía y se afeitó el área abdominal. La recolección de embriones se llevó a cabo el día siete posterior al primer servicio, las ovejas se inmovilizaron mediante la inyección intramuscular de Xilazina³ al 2 %, con una dosis de 0.44 mg/kg de PV, y 10 minutos posteriores se administró vía endovenosa ketamina⁴ en una dosis de 2 mg/kg de PV. Una vez ejercido el efecto del anestésico, se colocó a la oveja en una camilla de recolección, se lavó con jabón quirúrgico y desinfectó con yodo la región abdominal.

Una vez limpia el área de cirugía se procedió a realizar la laparotomía media ventral, haciendo una incisión a una distancia de 4 a 5 cm anterior a la ubre sobre la línea media de aproximadamente 4 cm de largo, se exteriorizaron los cuernos uterinos y los ovarios para contar los CL. Posteriormente se realizó una punción en la base del cuerno uterino mediante un catéter intravenoso del calibre (14 G x 5 ½), donde se introdujo una sonda de Foley (calibre 10 Fr)⁵ con dos vías donde en una entra aire, y por la otra vía se recupera el medio, con la ayuda de otro catéter (18 G x 5¼) se realizó otra punción en la parte más delgada del cuerno uterino, donde se administró 40 ml de solución de lavado,⁶ inyectándolo en dos porciones de 20 ml, dando un ligero masaje y por arrastre

³ Sedazine®, Fort Dodge USA.

⁴ Anesket®, Pisa México.

⁵ Sonda Foley Adex®. Sonda de látex estéril tipo Foley de 2 vías. Adex. México.

⁶ Vigro Complete Flush®. Solución de lavado. Bioniche Animal Health. USA.

el medio pasó a la sonda de Foley, donde fue depositado al filtro concentrador⁷, mientras los cuernos uterinos se mantuvieron fuera se les mantuvo húmedos irrigándolos con solución hidratante.⁸ De igual forma se procedió a lavar el otro cuerno uterino. Terminada la recolección de los embriones, el útero se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la incisión, después se aplicó de forma cutánea cicatrizante. Finalmente se administró 5 mg de prostaglandina⁹ y oxitetraciclina¹⁰ en una dosis de 20 mg/kg de PV vía intramuscular.

Los embriones se colocaron en una caja de petri cuadrículada de 10 x 10 cm para su búsqueda, y se conservaron con una solución de mantenimiento,¹¹ el cual a diferencia del de lavado no contiene alcohol polivinílico. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se evaluaron y clasificaron de acuerdo a su integridad y viabilidad aparente. Tanto el medio de lavado como el de mantenimiento se manejaron a temperaturas de entre 25 y 30 °C, y un pH de 7.4.

Todas las ovejas sometidas a dicha cirugía se les observó su conducta en el periodo postoperatorio en caso de posible infección, y para evitarlo se cuidó la higiene del corral que fueron alojadas. Diez días posteriores a la cirugía se retiraron los puntos y se aplicó de forma cutánea cicatrizante.

⁷ Filtro Em Con®. Concentrador de embriones irradiado. Immunosystems Inc. USA.

⁸ Suero fisiológico, Fiori México.

⁹ Lutalyse*, Pharmacia Animal Health México.

¹⁰ Emicina*/ LA Pfizer. México.

¹¹ Emcare Holding Solution®. Medio de mantenimiento. AB Technology. USA.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, para contrastar si las variables pertenecían a una distribución normal. Las variables: hora de presentación de estro (HPE), cuerpos lúteos totales (CLT), estructuras recolectadas totales (ERT), embriones totales transferibles (ETT) y estructuras no transferibles (ENT), se ajustaron a la normalidad por lo que se analizaron mediante la prueba de t de student. Para las variables número de cuerpos lúteos normales (CLN), cuerpos lúteos en regresión (CLR) y folículos preovulatorios (FP); al no presentar una distribución normal, se analizaron mediante una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. El análisis estadístico se realizó en la versión 8.2 de SAS/STAT (SAS, 2009).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta a la sincronización

El 100 % de ovejas empleadas en el experimento (n=34) sincronizadas durante 12 días presentaron estro, con una esponja durante 12 días (17/17) y con sustitución de esponja al día seis (17/17), en contraste con lo que reportaron Mejía y Núñez (2008), quienes sincronizaron ovejas por 10 días con esponjas de 20 mg de FGA; reportando con el uso de una esponja presentación de estros del 86.6 % (26/30), y con sustitución de esponja al día seis, de 93.33 % (28/30). En un estudio similar Cruz *et al.*, (2007) sincronizaron ovejas por 12 días con esponjas de 40 mg de FGA, teniendo con una esponja el 90 % (18/20) de presentación de estros y con sustitución de esponja al día siete, el 85 % (17/20). González *et al.*, (2004) sincronizó borregas durante 14 días con una esponja de 40 mg y tuvo el 85 % (17/20) de presentación de estros, y con sustitución de esponja al día siete un 71.4 % (15/21).

En el grupo I, en que se utilizó una esponja de 20 mg con FGA durante 12 días, con respecto a las detecciones de estro a las 24, 28 y 36 h, el porcentaje de ovejas en estro fue de 76 % (13/17), 18 % (3/17) y 6 % (1/17), respectivamente. Para el grupo II, con el uso de una esponja de 20 mg de FGA durante seis días y sustitución por una nueva por otros seis días dieron como resultado porcentajes de 18 % (3/17), 53 % (9/17) y 29 % (5/17) en las detecciones de estro a las 24, 28 y 36 h; en el mismo orden. La media de la hora de presentación de estro fue de 25.41 ± 0.76 , para el grupo I, y de 29.64 ± 1.08 , para el grupo II; encontrándose diferencia estadística ($P < 0.05$) entre grupos.

A pesar de que existió diferencia de horas en la presentación de estro entre grupos, se encontró en los márgenes establecidos por la literatura, que son de 24 a 36 h posterior al retiro de la esponja (Scudamore *et al.*, 1991). Sin embargo, se observó que las ovejas tratadas con dos esponjas tardaron más tiempo en presentar estro, pudiéndose deber a los niveles de P_4 al sustituir la esponja; como lo reportan diversos autores, donde mencionan que puede presentarse un retraso en la presentación del estro conforme se incrementa la dosis de FGA, o de algún progestágeno (Robinson *et al.*, 1968; Allison y Robinson, 1970; Pearce y Robinson, 1985; Greyling *et al.*, 1997; Simmoneti *et al.*, 2000). Sin embargo, al tener un número de animales relativamente pequeño en el presente trabajo, es difícil el contar con una explicación concluyente.

Respuesta superovulatoria

Para las variables CLT y CLN, no hubo diferencias entre grupos. Sin embargo, el número de CLR fue mayor para el grupo I ($P < 0.01$), mientras que el número de FP fue mayor en el grupo II ($P < 0.01$) (Cuadro 3), obteniéndose valores superiores en CLN a los de Mejía *et al.* (2000), donde sincronizaron ovejas con 40 mg de FGA durante 12 días y 200 UI de FSH en esquema decreciente; estos autores reportaron la obtención de 10.62 ± 1.99 CLT, dentro de los cuales la media de 5.75 ± 2.57 eran CLN y 4.87 ± 2.12 de CLR. Cerbón (1995) obtuvo 7.3 ± 1.9 CLN y 1.9 ± 1.1 CLR; valores también inferiores de CLN a los aquí encontrados.

Puede resaltarse que se encontró una buena respuesta ovulatoria en CLN, en las ovejas tratadas con una esponja de 20 mg de FGA, por lo que pudiera especularse que el uso de una esponja de 20 mg permite alcanzar resultados

favorables en un programa de sincronización y superovulación en ovejas donadoras de embriones. Aunque también debe señalarse, que entre grupos de borregas donadoras de embriones, es común la presentación de una gran variabilidad en la respuesta, aún bajo las mismas condiciones.

A pesar de que en el grupo de dos esponjas se tuvo una mejor respuesta ovulatoria, al no presentar CLR, se obtuvieron de manera numérica un menor número de ETT y un mayor número de ENT que en el grupo de una sola esponja (Cuadros 3 y 4). En este último, aunque hubo CLR se obtuvieron mayor número de ETT y menor número de ENT (Cuadros 3 y 4), siendo esto lo más deseable al recuperar embriones. No obstante, al no haberse detectado diferencias significativas entre grupos, los CLR no tuvieron ningún efecto negativo sobre la obtención de embriones transferibles, lo que contrasta con Cerbón (1995), quien menciona que uno de los principales problemas en la superovulación es la presencia de CLR al momento de la recolección embrionaria, los cuales ocasionan una disminución en el número de embriones que se obtienen o incluso una nula colecta.

Cuadro 3. Respuesta ovulatoria

Tratamiento	CLT	CLN	CLR	FP
I	13.47 ± 1.16 ^a	12.82 ^a	0.64 ^a	0.05 ^a
II	11.58 ± 0.82 ^a	11.58 ^a	0.00 ^b	0.52 ^b

CLT= Cuerpos lúteos totales (CLN + CLR).

CLN= Cuerpos lúteos normales.

CLR= Cuerpos lúteos en regresión.

FP= Folículos preovulatorios.

^{a, b}, literales diferentes indican diferencias significativas (P < 0.01).

Las estructuras totales transferibles (Cuadro 4), encontradas fueron: mórula inicial calidad 1 y 3, mórula compacta calidad 1, 2 y 3, blastocisto inicial calidad 1 y 2, blastocisto maduro calidad 1 y 2, y blastocisto expandido calidad 1, no encontrándose diferencia entre grupos con respecto al número y calidad de las estructuras viables. De forma similar González *et al.* (2004), también obtuvieron de manera numérica más embriones viables en ovejas sincronizadas con dos esponjas de 40 mg (4.9 ± 1.2), sustituyéndola el día siete, al obtenido cuando usó una esponja (4.3 ± 1.2) por 14 días. Sin embargo, tampoco hubo diferencia entre grupos. En ENT, se encontraron ovocitos, embriones de desarrollo temprano de 2, 4, 8 y 16 células y mórulas compacta calidad 4, del cual con respecto a su media no hubo diferencia entre grupos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estructuras recolectadas

Tratamiento	ERT	ETT	ENT
I	7.41 ± 1.07^a	5.64 ± 1.18^a	1.76 ± 0.59^a
II	7.35 ± 1.39^a	4.64 ± 1.18^a	2.70 ± 0.93^a

ETT= Estructuras totales transferibles.

ENT: Estructuras no transferibles

ERT= Estructuras recolectadas totales (ETT + ENT).

^{a, b}, literales diferentes indican diferencias significativas

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El uso de dos esponjas de 20 mg a intervalo de seis días cada una, no favorece el número de estructuras totales transferibles en comparación al uso de una sola esponja en la sincronización de ovejas.

Al utilizar dos esponjas para la sincronización existe una mejor respuesta ovulatoria, evita la presencia de cuerpos lúteos en regresión y obtiene solo cuerpos lúteos normales, sin embargo los cuerpos lúteos en regresión presentados con el uso de una sola esponja no repercute en el número de embriones recolectados.

La sincronización con una esponja de 20 mg durante 12 días, permite mayor agrupación de presentación de celos, lo que facilita el manejo de animales por lotes.

Bajo las condiciones de este trabajo se recomienda sincronizar con una esponja de 20 mg de FGA durante 12 días, para reducir el manejo de los animales y disminuir los costos.

8. LITERATURA CITADA

Allison, A y Robinson, J. 1970. The effect of dose level of intravaginal progestagen on sperm transport, fertilization and lambing in the cyclic merino ewe. *J. Reprod. Fertil.* 22:515-531.

Alwan, F., Boland, M. P., Gordon, I. 1998. Superovulation and oocyte recovery in the ewe. *Theriogenology.* 29:1143-1148.

Baird, T., Land, B., Scaramuzzi, J., Wheeler, G. 1976. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androsterone and uterine prostaglandin F2 α throughout the oestrus cycle. *J. Endocr.* 69: 275-286.

Baril, G., Brebion, P., Chesné, P. 1995. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. FAO, Producción y Sanidad Animal. Roma.

Bartlewsky, P. M., Beard, A. P., Rawlings, N. C. 1999. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52 (1): 115-130.

Battye, M., Fairclough, J., Cameron, W., Trounson, O. 1988. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil.* 84:425-430.

Brackett, B.G., Seidel, G.E., Seidel, S.M. 1998. Avances en zootecnia: nuevas técnicas de reproducción animal. Acribia, Zaragoza.

Buxade, C. 1996. Zootecnia bases de la producción animal. Tomo VIII. Producción ovina. Editorial Mundi-Prensa.

Carson, S., Findlay, K., Burger, G., Trounson, O. 1981. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod.* 24: 105-113.

Cerbón, G. J. L. Recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural. (Tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1995.

Cervantes, J., Juárez, L., Mejía, O., Berruecos, M., Vera, R., Valencia J. 2007. Use of fluorogestone acetate alter breeding to reduce the effect premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim Reprod Sci.* 97: 47-54.

Cocero, M. J., González, B. A., Santiago, M. J., García, L. M., López, S. A. 1999. Efecto del protocolo de administración de FSH ovina sobre los rendimientos superovulatorios en ovejas Manchegas. *ITEA.* 20, 702-704.

Cognie, Y., Chupin, D., Saumande, J. 1985. Comparison of two treatment schedules to induce superovulation in ewes. *Theriogenology.* 23:185.

- Cooper, D. A., Carver, D. A., Villeneuve, P., Silvia, W. J., Inskip, E. K. 1991. Effects of progesterone treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J Reprod Fertil.* 91:411-421.
- Córdova, I. A., Córdova, J. M. S., Córdova, J. C. A., Guerra, L. J. E. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Rev. vet.* 19: 1, 67-79.
- Cruz, M., García, C., Rangel, R., Apodaca, A., Ayala, J. 2007. Sincronización de celos utilizando una y dos esponjas intravaginales. XXXI Congreso Nacional de Buiatría, XII Congreso Latinoamericano de Buiatría. Guerrero, México. 9-11. 723-726.
- Cunningham. 1999. *Fisiología veterinaria*. 2ª edición. Editorial Mc. Graw Hill interamericana. México. 510-516.
- De Lucas, T. J y Arbiza, A. S. I. 1996. *Razas de ovinos*. México: Editores mexicanos unidos.
- Driancourt, A y Fry, C. 1992. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim Reprod Sci.* 27: 279-292.
- Elsden, P. 1987. Freezing bovine embryos: causes of damage. *Embryo transfer.* 2: 1-6.
- Espinoza, V. J. L., Ortega, P. R., Palacios, E. A., Valencia, M. J., Aréchiga, F. F. C. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *INCI*, 32(2): 93-99.
- Evans, A. C.O., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M. P. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in the sheep. *Theriogenology* 53:699-715.
- Evans, G y Maxwell, M. 1990. *Inseminación Artificial de ovejas y cabras*. España: Acribia.
- Fammy, M. H. 1996. *Prolific sheep*. Cambridge, U.K: CAB international.
- Flores, F. G. 1991. Embryo transfer in Kenyan goats. Naivasha, Kenya, *Kenya Agricultural* :3-29.
- Flores, F. G; McBride, B. M., Kraemer, B. C., Nuti, L. C. 1992. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology* 37:213 (abstr).
- Folch, J., Roche, A., Cocero, J., Alabart, J. L., Olivera, J. 2004. Embryo transfer applied to a sheep selection program *Rep Fert Dev.* 16 (4): 512-517.
- Gibbons, A. 2004. Transferencia de embriones en ovinos. *IDIA XXI, INTA Buenos Aires.* 4(7): 79-82.

- Gibbons, A y Cueto, M. 1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Consultado el 23 de marzo de 2007, disponible en: <http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/ct-290.pdf>
- Ginther, O. J., Kot, K., Wiltbank, M. C. 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 43, 689-703.
- Gómez, R. J. C. 1991. Boletín CXLVII: Agroclimatología y espacio geográfico en el noreste del estado de Morelos. México: Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística.
- González, B. A., Baird, T., Bruce, K., Cocotero, M., García, G. R., Keith, E. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Rep Fert Dev.* 16:421-435.
- González, B. A., García, G. R. M., Castellanos, V., Santiago, M. J., Ariznavarreta, C., Domínguez, V., López, S. A., Tresguerres, J., Cocero, M. J. 2003. Influence of maternal environment of the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Rep Nutr Dev.* 43:17-28.
- González, B. A., Santiago, M. J., García, L. M., López, S. A. 1995. Ultrasonic monitoring of ovarian follicular development in ewes during administration of homologous FSH. *Intern. Symp. on Life Cycle of the Ovarian Follicle*, Florida.
- González, B. A., Santiago, M. J., García, G. R. M., Cocero, M. J., López, S.A. 2002. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes. *Invest.Agr:Prod.Sanid.Anim.* 17:1-2.
- Greve, T., Callensen, H., Hyttel, P., Hoier, R., Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43, 41-50.
- Greyling, C., Erasmus, A., Taylor, G., Van Der Merwe, S. 1997. Synchronization of estrous in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Rum. Res.* 26:137-143.
- Hackett, J., Lagfort, A., Robetson, A. 1981. Fertility of ewes alters synchronization of estrus with prostaglandin F2 α and insemination. *Theriogenology*. 15: 4-6.
- Hafez, E. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7^a ed. España: Mc Graw Hill.
- Heredia, M. 1998. Ovulación múltiple y transplante de embriones en ovinos. Conducta estral y detección de estros. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma de Yucatán. México.

- Herrera, H., Feldman, S., Zarco, L., Valencia, M., Ortiz, H., Ángeles, C. 1990. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina F2 α en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Méx.* 21: 143-147.
- Hernández, I. J. 2008. Evaluación de los embriones recolectados. Memorias del curso "Recolección y transferencia de embriones en ovinos". Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina. FMVZ, UNAM.
- Hunter, G., Ayad, J., Gilbert, L., Southee, J. A., Wathes, D. C. 1989. Role of prostaglandin F2 and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lútea in anestrus ewes. *J Reprod Fertil.*85: 551-556.
- Leyva, V., Buckrell, B. C., Walton, J. S. 1999. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50:395-416.
- López, S. A., Cognie, Y., Cocero, M. J., De la Puente, J., Poulin, N. 1990. Affect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep *Theriogenology.* 34: 175-181.
- López, S. A., González, B. A., Santiago, M. J. 2002. Dinámica folicular en relación a los sistemas tradicionales de control de ciclo sexual. *INIA, Madrid. PR* 3:2, 18-23.
- Martín, S., Agar, A., Palacín, I. 2007. Eficiencia de CHRONOGEST® 20 mg liberación controlada en ovejas adultas con monta natural. XXXII jornadas internacionales de la SEOC.Mallorca.
- Maxwell, M., Butler, L.G. 1984. Intrauterine insemination of ewes with frozen semen. *Journal Agric Sci Camb.*102:233-235.
- McCracken, J. A., Schramm, W., Okulicz, W. C. 1984. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7: 31-55.
- McDonald, L. E. 1991. *Veterinaria: reproducción y endocrinología.* 6ª ed. México.
- McKelvey, W. A. C., Robinson, J. J., Aitken, R. P., Robertson, I. S. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopic. *Theriogenology* 25: 855-856.
- Mejía, O., Murcia, C., Valencia, J., Espinosa, F. 2000. Administración postmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Veterinaria México.* 31: 129-135.
- Mejía, V. O. 1997. Características reproductivas de los ovinos. Memorias del curso de "Manejo reproductivo e inseminación artificial en pequeños rumiantes". FMVZ, UNAM.
- Mejía, V. O. 2008. Transferencia de embriones en ovejas y cabras. Memorias del curso "Recolección y transferencia de embriones en ovinos". Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina. FMVZ, UNAM.

Mejía, V. O. y Núñez, S. J. 2008 Fertilidad de ovejas sincronizadas con una o dos esponjas de 20 mg de FGA inseminadas intrauterinamente con semen congelado. Congreso de buiatría.

Menchaca, A. y Rubianes, E. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 16:403-413.

Mitchel, M., Dingwall, S., Mylne, J., Hunton, J., Matthews, K., Gebbie, E. 2002. Season affects characteristics of the preovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Anim Rep Sci.* 74: 163-174.

Molina, P., Sánchez, T., García, O., Martínez, A., Cárdenas, M., Peralta, J., Cordero, J., Hizarza, A., Ortega, E. 2005. Manipulación de la presencia del cuerpo lúteo en la sincronización del estro en ovejas Dorset. *Agrociencia.* 39:11-18.

Moore, L. G., Choy, V. J., Elliot, R. L., Watkins, W. B. 1986. Evidence for pulsatile release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 76:159-166.

Moore, N. W. 1980. Procedures and results obtainable in sheep and goats. In *Current Therapy in Theriogenology*. Ed. D. A. Morrow and W. B. Saunders, 89-85.

Ortiz, H. A. 2005. Ciclo estral y métodos para sincronizarlos. Memorias curso teórico-práctico de "Inseminación artificial en ovinos". Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina. FMVZ, UNAM.

Palma, I. M. 2008. Mantenimiento y evaluación de embriones. Memorias del curso "Recolección y transferencia de embriones en ovinos". Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina. FMVZ, UNAM.

Pearce, T y Robinson, T. 1985. Plasma progesterone concentrations, ovarian and endocrinological responses and sperm transport in ewes with synchronized oestrus. *J. Reprod. Fertil.* 75:49-62.

Quinlivan, T y Robinson, T. 1969. Number of spermatozoa in the genital tract after artificial insemination of progestagen-treated ewe. *J Reprod. Fertil.* 19:73-86.

Quispe, T., Zarco, L., Valencia, J., Ortiz, A. 1994. Estrus synchronization with melengestrol acetate in cycle ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. *Theriogenology.* 41:1385-1392.

Robinson, T., Quinlivan, T., Baxter, C. 1968. The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 17:471-483.

Rubianes, E., De Castro, T., Carvajal, B. 1996. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Can. J. Anim.Sci.* 76:473-475.

Russel, A. J., Doney, J. M., Gunn, R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agr, Sci., Cambridge*, 72: 451 -454.

Saharrea, A., Valencia, J., Balcazar, A., Mejía, O., Cerbón, J., Caballero V. 1998. Premature regression in goats superovulated with PMSG: Effect of hCG or GnRH administration during early luteal phase. *Theriogenology*. 50: 1039-1052.

SAS Institute User's Guide. Consultado en marzo del 2009, disponible en: <http://support.sas.com/rnd/app/doc.html>

Schiewe, C., Howard, G., Goodrowe, L., Stuart, D., Wildt, E. 1990. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after PGF₂ α synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology*. 34:3.

Schiewe, M. C., Fitz, T. A., Brown, J. L., Stuart, L. D., Wildt, D. E. 1991. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2 α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep *J Reprod Fertil*. 93:19-30.

Scudamore, C. L., Robinson, J., Aitken, P. 1991. The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenology*. 35: 907.

Silvia, J., Lewis, S., McCracken, A., Thatcher, W., Wilson, J. R. L. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants *Biol Reprod*; 45:655-663.

Silvia, W. J., Raw, R. W., Aldrich, S. L., Hayes, S. L. 1992. Uterine secretion of prostaglandin F₂ α in response to oxytocin in ewes: changes during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*85:11-15.

Simmoneti, L., Blanco, R., Gardón, C. 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small Rum. Res.* 38:243-247.

Soto, G. R y Medrano, H. J. A. 2008. Reproducción de ovejas y cabras. 1ª ed. FMVZ, UNAM.

Southee, A., Hunter, G., Law, S., Haresing, W. 1988. Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH induced ovulation in the anoestrus ewe. *J Reprod Fertil*. 84:149-155.

Swenson, M. J y Reece, W. O. 1999. Fisiología de los animales domesticos de Dukes. 5ª edición. Tomo II, Noriega editores, México.

Trejo, A. 1996. Control de la reproducción caprina y ovina en la producción de pequeños rumiantes. México: AGT Editor SA.

Valencia, J. 1998. Manipulación del ciclo estral en la oveja. 1er Congreso Nacional de Producción Ovina. México.

Veiga, L. A., Encinas, T., McNeilly, A. S., González, B. A. 2008. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. *Reprod Dom Anim* 43:1, 92–98.

Veiga, L. A., González, B. A., García, G. R. M., Domínguez, V., Cocero, M. J. 2005. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatment in sheep. *Theriogenology*. 63:1973-1983.

Viñoles, C. 2000. Some aspects on the effects of estrous synchronization treatment on ovarian dynamics in the cyclic ewe. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 11-23.

Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*. 51:1351-1361.

Wright, J. M. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo recipient interactions. *Theriogenology*. 15:43-55.