

50  
Res.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**RECUPERACION DE EMBRIONES EN OVEJAS  
SUPEROVULADAS INSEMINADAS INTRAUTERINAMENTE  
O POR MONTA NATURAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**JOSE LUIS CERBON GUTIERREZ**

**ASESORES: MVZ. DVM. JAVIER DE JESUS VALENCIA MENDEZ  
MVZ. PHD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO  
MVZ. MPA. JUAN ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ  
MVZ. MPA. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA**



México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**RECUPERACION DE EMBRIONES EN OVEJAS  
SUPEROVULADAS INSEMINADAS INTRAUTERINAMENTE  
O POR MONTA NATURAL**

Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de  
**Médico Veterinario Zootecnista**

Por

**JOSE LUIS CERBON GUTIERREZ**

**ASESORES: MVZ. DVM. JAVIER DE JESUS VALENCIA MENDEZ  
MVZ. PHD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO  
MVZ. MPA. JUAN ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ  
MVZ. MPA. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA**

México, D.F.  
1995

## **DEDICATORIA**

**A mi madre y padre por todo el amor y comprensión que han desbordado hacia mi, además de su confianza y apoyo incondicional.**

**A mi hermana Claudia por su cariño y fe, tanto en ella como en mí.**

**A mi sobrino Daniel para que con el paso del tiempo aprenda a comprender a la naturaleza y también a ser un hombre de bien.**

**A Alejandro por aportar más felicidad a esta familia.**

**A mis amigos Graciela y José Luis por sus consejos y enseñanzas, por no cejar y no permitir que renunciara.**

**A Margarita con todo mi amor.**

**A toda la familia Gutiérrez por mantenerse unidos y no permitir que ninguno pierda el camino.**

**A la Naturaleza, que nos da la oportunidad de conocerla y formar parte de ella, por ser tan exquisita y extasiarnos con sus creaciones.**

**A la embelesante flor de blancos pétalos y centro como el sol.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis asesores: Dr. Javier Valencia, Dr. Luis Zarco, Alberto y Octavio por su paciencia y apoyo para la realización de este trabajo. Sin ellos no hubiese sido posible.**

**A Verónica y Ramón por su amistad y compañía durante estos años.**

**Carolina y Alberto, amigos dentro y fuera del trabajo, por su ayuda y comprensión.**

**A la gente que participó en este proyecto: Verónica Caballero, Carolina Luyando, Adriana Saharrea, Alberto Balcázar, Dr. Javier Valencia, Dr. Luis Zarco, Israel Brito, Ramón Mier, Octavio Mejía, Julio Rosas, gracias por su tiempo y valiosa ayuda.**

**Mariana Bernal, Susana Rojas y Clara Murcia, aceptarme y ser mis amigas debe ser algo difícil, que bueno que lo son.**

**Dra. Rosa Páramo, Dr. Joel Hernández, Dr. Carlos Esquivel, Dr. Antonio Porras, Dr. Salvador Romo: agradezco su amistad y el compartir sus conocimientos. Vero Campos, Miriam, Max, Juan, Pancho, gracias por su apoyo.**

**Al Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, que brindó esta oportunidad.**

**Al CEPIER por las facilidades brindadas.**

**Al laboratorio Intervet por la donación de las esponjas intravaginales con acetato de flurogestrona (Chronogest), y por seguir apoyando la investigación en medicina veterinaria.**

**A las ovejas utilizadas, ya que sin ellas no hubiese sido posible este experimento.**

**A los miembros del jurado por sus aportaciones e interés en este trabajo.**

**Por el apoyo y aportación a las ilustraciones, Alejandro y Rocío Raymond, gracias.**

**Margarita, Lola, Emma, Tere, Angel, Carlos, Chino, Goyo, Joe, Julian, Raúl, Ricardo, Rodolfo, por ser amigos entrañables de toda una vida.**

**A la nueva luz que va abriendo el camino como una flor.**

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN -----	1
I INTRODUCCION -----	2
II REVISION DE LITERATURA -----	5
2.1 Sincronización -----	5
2.2 Superovulación -----	7
2.3 Inseminación artificial intrauterina -----	10
2.4 Colección embrionaria -----	12
III MATERIAL Y METODOS -----	14
3.1 Localización -----	14
3.2 Animales experimentales -----	14
3.3 Colección y almacenamiento del semen -----	15
3.4 Tratamiento y manejo de las ovejas -----	15
3.5 Colección embrionaria -----	16
3.6 Análisis estadístico -----	17
IV RESULTADOS -----	21
V DISCUSION -----	28
VI CONCLUSIONES -----	35
VII LITERATURA CITADA -----	36

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN -----	1
I INTRODUCCION -----	2
II REVISION DE LITERATURA -----	5
2.1 Sincronización -----	5
2.2 Superovulación -----	7
2.3 Inseminación artificial intrauterina -----	10
2.4 Colección embrionaria -----	12
III MATERIAL Y METODOS -----	14
3.1 Localización -----	14
3.2 Animales experimentales -----	14
3.3 Colección y almacenamiento del semen -----	15
3.4 Tratamiento y manejo de las ovejas -----	15
3.5 Colección embrionaria -----	16
3.6 Análisis estadístico -----	17
IV RESULTADOS -----	21
V DISCUSION -----	28
VI CONCLUSIONES -----	35
VII LITERATURA CITADA -----	36

## RESUMEN

**CERBON GUTIERREZ JOSE LUIS. Recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural. (Bajo la dirección de: MVZ. DVM. Javier de Jesús Valencia Méndez, MVZ. PHD. Luis Alberto Zarco Quintero, MVZ. MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez y MVZ. MPA. Vicente Octavio Mejía Villanueva.)**

Se utilizaron 35 ovejas adultas durante la época reproductiva. Las hembras fueron tratadas con esponjas vaginales y superovuladas con FSH-P. Las ovejas se inseminaron con semen congelado ( $80 \times 10^6$  espermatozoides) el cual fue colocado intrauterinamente por medio de laparoscopia a las 12 h ( $n=10$ ) ó 24 h ( $n=10$ ) del inicio del celo. Otro grupo recibió monta natural a partir de las 12 h del inicio del estro ( $n=15$ ). Seis días después del servicio o inseminación artificial intrauterina se realizó la colección quirúrgica de los embriones. El número de cuerpos lúteos normales encontrados en los grupos de inseminación a las 12 h, 24 h y monta natural fue de  $6.6 \pm 2.4$ ,  $9.6 \pm 2.4$  y  $7.3 \pm 1.9$ , respectivamente ( $p > 0.05$ ). Las ovejas inseminadas intrauterinamente a las 12 h no produjeron embriones. Se colectaron  $8.7 \pm 2.2$  y  $5.8 \pm 1.3$  embriones transferibles en los animales de inseminación artificial intrauterina a las 24 h y monta natural respectivamente. No existió diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en el número de embriones obtenidos en ambos grupos, lo que indica la posibilidad de aprovechar las ventajas del semen congelado en la transferencia de embriones. La recuperación embrionaria fue nula en las ovejas que presentaron solamente cuerpos lúteos en regresión prematura. El promedio de cuerpos lúteos normales y en regresión prematura en las ovejas que produjeron embriones fue de  $11.41 \pm 1.4$  y  $0.9 \pm 0.8$  respectivamente, mientras que en las ovejas de las cuales no se recuperaron embriones los promedios de cuerpos lúteos normales y en regresión fueron de  $3.5 \pm 2.0$  y  $7.5 \pm 1.2$  respectivamente, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).



## I INTRODUCCION

La superovulación y la transferencia de embriones son técnicas de gran importancia para aumentar los índices reproductivos de animales con mérito genético superior.

Para lograr la superovulación en ovejas, por lo general se administran inyecciones subcutáneas o intramusculares de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) o de hormona folículoestimulante (FSH). Los mejores resultados se obtienen al utilizar FSH-P en dosis decrecientes cada 12 horas durante 3 días (Maxwell y Hewitt, 1986; Hafez, 1987).

Para alcanzar los máximos beneficios de la transferencia embrionaria, las hembras donadoras deben ser inseminadas con semen de machos de alta calidad genética, por lo que la inseminación artificial (IA) con semen congelado cobra especial importancia, ya que esta técnica permite utilizar al máximo el potencial genético de los machos, además de tener otras ventajas como el optimizar el uso de los sementales y controlar enfermedades contagiosas en los rebaños (Davis *et al.*, 1984; Rival *et al.*, 1984).

A pesar de que la IA es una técnica que se ha utilizado desde 1907, en ovinos ha tenido su mayor auge en los últimos 15 años (Davis *et al.*, 1984). El método tradicional de IA en la borrega consiste en la aplicación de semen fresco diluído, depositado en la os externa del cérvix (Davis *et al.*, 1984; Maxwell y Butler, 1984, Maxwell *et al.*, 1993). Sin embargo, la utilización de semen fresco diluído para la IA tiene muchas limitaciones, por lo que desde el punto de vista de mejoramiento genético es recomendable utilizar semen congelado.

Sin embargo, cuando se insemina con semen congelado, el cérvix constituye una barrera inicial en el ascenso de los espermatozoides, pues resulta difícil el paso de la pipeta de inseminación a través de los anillos del cervix para depositar el semen intrauterinamente, por lo que relativamente pocos espermatozoides logran alcanzar el sitio de fertilización (Lightfoot y Salamon, 1970a; Maxwell *et al.*, 1980). La información existente parece indicar que para

obtener niveles de fertilidad aceptables mediante la IA con semen congelado es necesario colocar el semen en el interior del canal cervical o de preferencia en la luz uterina, ya que al inseminar por el método tradicional (cervical) con semen congelado el índice de fertilidad es bajo (Salamon y Lightfoot, 1967; Maxwell y Butler, 1984; Rival et al., 1984; Valencia, 1987).

Se han descrito varios métodos para mejorar la fertilidad al utilizar semen congelado. Así, Lightfoot y Salamon (1970a) obtuvieron altas tasas de fertilización en ovejas (88%) al pasar el cérvix y depositar el semen directamente en el útero, pero obtuvieron un índice bajo de sobrevivencia de los cigotos. Más adelante, los mismos autores demostraron que la infertilidad que se producía al inseminar con semen de carnero congelado en pellet estaba asociada con un patrón defectuoso del transporte de los espermatozoides en el aparato genital de la oveja (Lightfoot y Salamon, 1970b).

El problema de baja fertilidad al inseminar con semen congelado puede ser superado al depositar el semen directamente en el útero (Lightfoot y Salamon, 1970b; Maxwell et al., 1980; Armstrong y Evans, 1984). Para ello se han desarrollado métodos encaminados a depositar el semen intrauterinamente. Salamon y Lightfoot (1967) realizaron las primeras inseminaciones intrauterinas en ovejas exponiendo el útero por medio de laparotomía medio ventral, depositando el semen directamente en los cuernos y oviducto, logrando una alta fertilidad (90.5%); pero encontraron alta mortalidad embrionaria que fue atribuida a la intervención quirúrgica (Lightfoot y Salamon, 1970b).

Posteriormente se desarrolló una técnica para depositar el semen intrauterinamente visualizando el útero por medio de un laparoscopio. De esta manera se evita realizar una intervención quirúrgica tan traumática, evitando exteriorizar el útero por laparotomía y eliminado el estrés que se presenta por una cirugía mayor. Esto soluciona el problema de baja fertilidad que se obtiene al realizar la inseminación cervical con semen congelado (Killeen y Caffery, 1982).

Otros trabajos han confirmado que la inseminación laparoscópica con semen congelado en pajillas es tan efectiva como la inseminación artificial con semen fresco (Maxwell et al.

1980; Killeen y Caffery, 1982; Maxwell, 1984; Rival *et al*, 1984) o como la monta natural al primer estro post-sincronización (Maxwell, 1984). Además, las dosis de semen congelado requeridas son menores que al inseminar con semen fresco por vía cervical (Maxwell, 1984; Rival *et al*, 1984).

En ovejas superovuladas e inseminadas intrauterinamente con semen fresco o congelado, no se han encontrado diferencias en las tasas de fertilización con dosis que han variado de 2 a  $20 \times 10^6$  espermatozoides motiles (Walker *et al*, 1989). En general se recomienda aplicar una dosis mayor a  $6.2 \times 10^6$  espermatozoides móviles cuando se inseminan con semen congelado a ovejas superovuladas (Jabbour *et al*, 1988).

En un estudio realizado en ovejas superovuladas para determinar el efecto del tiempo óptimo de inseminación por laparoscopia utilizando semen congelado después de retirada la esponja intravaginal se obtuvieron tasas de recuperación embrionaria por laparotomía de 53.4% en ovejas inseminadas a las 48 h de retirada la esponja y 73.9% en ovejas inseminadas a las 60 h de retirada la esponja (Schiewe *et al*, 1990). Sin embargo, se desconoce si la fertilidad pudiera ser aumentada cuando las ovejas se inseminan intrauterinamente utilizando el inicio del estro como referencia para programas de inseminación. Lo anterior podría evitar el problema de falla en la presentación de estro cuando se realiza la inseminación "ciega", es decir a determinado tiempo después del retiro de la esponja.

El objetivo del presente trabajo es comparar la recuperación de embriones de ovejas superovuladas e inseminadas intrauterinamente con semen congelado a las 12 ó 24 h después del inicio del celo con la de ovejas superovuladas servidas por monta natural.

## II REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Sincronización.

El conocimiento de las bases endócrinas de la reproducción y de los mecanismos que regulan la secreción hormonal, ha posibilitado el control del ciclo estral de las ovejas por medio de programas de sincronización, los cuales facilitan el uso de otras técnicas como la superovulación y la inseminación artificial mediante las cuales se logra un mejor aprovechamiento del potencial genético de los animales (Hafez, 1987).

La sincronización del estro consiste en controlar el ciclo estral con la finalidad de que un grupo de animales presenten estro en forma simultánea y en un período determinado, facilitando el manejo reproductivo del hato en general (Maxwell y Butler, 1984; Quispe *et al.*, 1994).

Existen dos métodos generales para lograr la sincronización de estros en hembras con actividad cíclica. El primero consiste en la destrucción del cuerpo lúteo mediante el uso de sustancias luteolíticas que permiten que se inicie un nuevo ciclo estral (Hackett *et al.*, 1981; Herrera *et al.*, 1990).

Una de las hormonas más utilizadas para la lisis de cuerpo lúteo es la  $PGF_{2\alpha}$ , la cual es una sustancia orgánica que se produce en el útero a partir del ácido araquidónico (McCracken *et al.*, 1981), y se libera en forma pulsátil para producir la lisis del cuerpo lúteo (Zarco *et al.*, 1988).

Cuando se administra la  $PGF_{2\alpha}$  a partir del día 4 ó 5 del ciclo estral de la oveja, las células lúteas ya pueden responder a la acción de la  $PGF_{2\alpha}$ , produciéndose la lisis del cuerpo lúteo, la cual se completa entre 12 y 24 h de aplicada, presentándose el estro a las 36 a 44 h post inyección (Herrera *et al.*, 1990). Sin embargo, el uso de la  $PGF_{2\alpha}$  tiene limitantes ya que no puede utilizarse antes del día 4 del ciclo por no haber aún un cuerpo lúteo funcional.

Además, en la oveja se ha informado la ocurrencia de una incidencia relativamente alta

de fallas en la regresión lútea cuando es aplicada entre el día 8 y 11 del ciclo estral (Herrera et al., 1990), lo que hace necesario recurrir a tratamientos en los cuales se utilizan dos inyecciones con varios días de separación, o tratamientos combinados con progestágenos (Herrera et al., 1990).

El segundo método se basa en la administración de progestágenos, en donde el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la liberación de gonadotropinas es utilizado para sincronizar ovejas que se encuentran ciclando (Quispe et al., 1994), o para inducir la ovulación en ovejas anéstricas o prepúberes (Balcázar, 1992).

La forma en que un progestágeno actúa para sincronizar el estro en hembras ciclando se basa en la simulación de la fase lútea de un ciclo estral, por lo tanto mientras el progestágeno actúe se produce una inhibición en la liberación de GnRH a nivel hipotalámico (retroalimentación negativa), lo que a su vez resulta en la reducción en la secreción hipofisiaria de FSH y LH, limitándose así el desarrollo folicular (Cervantes et al., 1988). Al retirarse el tratamiento con progestágeno cesa la retroalimentación negativa, aumentando la frecuencia en la secreción de GnRH y gonadotropinas (FSH y LH), lo que estimula el desarrollo folicular en forma sincrónica, produciéndose la ovulación en un lapso de 24 a 36 h después de terminado el tratamiento (Scudamore et al., 1991).

El uso de progestágenos requiere que los niveles circulantes de la hormona utilizada se mantengan en forma sostenida durante varios días, por lo que se han desarrollado métodos que permiten la administración continua de los fármacos sin requerir de una utilización masiva de mano de obra, así, se han descrito varias vías de aplicación: intramuscular, vaginal, oral y subcutánea (Quirke, 1981).

Los análogos de la progesterona más utilizados en el ovino son: el acetato de medroxiprogesterona (MAP), acetato de clormadinona (CAP), el acetato de fluorogestrona (FGA) y el acetato de melengestrol (MGA) (Quirke, 1981; Quispe, et al. 1994). También se utiliza la progesterona natural, los cuales se pueden administrar mediante dispositivos vaginales llamados CIDR (control internal device release) o mediante la aplicación de inyecciones

(Scudamore *et al.*, 1993).

En diversas investigaciones se han observado diferentes grados de sincronización utilizando diferentes progestágenos por varias vías, siendo el más efectivo la utilización de esponjas vaginales impregnadas con acetato de fluorogestrona (FGA) (Crempien *et al.*, 1984; Scudamore *et al.*, 1993).

Una de las desventajas de los progestágenos es que su utilización por más de 10 días resulta en una baja fertilidad del estro inducido (Quispe, *et al.*, 1994). La baja fertilidad ha sido atribuida a que existe un deficiente transporte de gametos dentro del cervix y el oviducto (Hackett *et al.*, 1981).

## **2.2 Superovulación.**

La superovulación es una técnica que se ha utilizado en la oveja para incrementar la producción de ovocitos viables (Alwan *et al.*, 1988). Esta técnica es de gran utilidad para la producción de embriones de animales genéticamente superiores (Maxwell *et al.*, 1993). Se menciona que la respuesta a la superovulación no difiere entre ovejas de diferente edad. Sin embargo, otros autores han obtenido un reducido número de embriones y de baja calidad en ovejas mayores de 5 años (Ruttle *et al.*, 1988).

Dentro de las hormonas más utilizadas para lograr la superovulación se encuentran la hormona foliculo estimulante (FSH) y otras hormonas con efecto similar al de la FSH, como la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG) y la gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Wollen *et al.*, 1985; Driancourt y Fry, 1992).

Al parecer el efecto superovulatorio que se logra mediante la utilización de eCG se debe a que esta hormona ocupa los receptores para FSH en el foliculo. De esta manera se logra un incremento en la tasa de ovulación mediante el reclutamiento de pequeños folículos menores a 2 mm de diámetro en los cuales se aumenta la tasa de crecimiento, además de estimularse el crecimiento sostenido de folículos grandes (mayores de 4 mm). Así se logra un incremento en la tasa de desarrollo folicular, alterando el tamaño y distribución de folículos

grandes en el ovario ( McNatty *et al.*, 1982; Driancourt y Fry, 1992).

A pesar de que al utilizar eCG como tratamiento superovulatorio se requiere de una sola aplicación (1,500 UI) su uso no es del todo recomendable, ya que se produce un fuerte incremento en el número de ovocitos no fertilizados (Rainio, 1991).

Otra desventaja que se ha observado al usar eCG como tratamiento superovulatorio es que al tener una vida media muy larga en la circulación, continúa estimulando el desarrollo folicular durante varios días, lo cual ocasiona que a nivel ovárico se sigan desarrollando pequeños folículos (mayores o iguales a 2 mm) después de ocurrida la superovulación. Estos folículos pueden persistir hasta el momento en que se realiza el lavado para la recolección de embriones, y al parecer los estrógenos producidos por dichos folículos causan la regresión prematura del cuerpos lúteo (Battye *et al.*, 1988).

Se cree que las concentraciones relativamente bajas de estradiol producidas por estos pequeños folículos pueden ser las suficientes para desencadenar la secreción prematura de  $\text{PGF}_2\alpha$  (Carson *et al.*, 1981), ya que el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina en el endometrio, con lo cual la oxitocina puede estimular la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  endometrial (McCraken, 1984).

La FSH es responsable del crecimiento del folículo y de la selección del folículo destinado a ovular (Driancourt y Fry, 1992). Se conoce que la aplicación exógena de FSH causa que los folículos destinados a sufrir atresia maduren hasta una etapa preovulatoria. Tanto la LH como la FSH tienen una importante repercusión sobre la actividad esteroidogénica del folículo, ya que cuando la LH se acopla a su receptor en la célula de la teca se producen una serie de cambios bioquímicos encaminados a sintetizar andrógenos a partir de colesterol. Dichos andrógenos son subsecuentemente convertidos a estradiol en la célula de la granulosa por efecto de un fenómeno de aromatización estimulado por el acople de la FSH a su receptor (Driancourt y Fry, 1992). Los estrógenos producidos por el folículo actúan en forma sinérgica con la FSH, que junto con los niveles elevados de FSH exógena estimulan la mitosis de las células de la granulosa y la síntesis de receptores para LH en estas células, permitiendo así que

un continuo número de folículos maduren hasta el estado ovulatorio, produciéndose así la superovulación (Newman, 1991).

Se prefiere utilizar la FSH para la superovulación, ya que resulta en un mayor número de ovulaciones, menor número de folículos anovulatorios y más embriones recuperados y de mejor calidad (Cognie *et al.*, 1985), además de producir una respuesta lútea más aceptable y consistente (Schiewe *et al.*, 1990).

La FSH tiene una vida corta, y requiere frecuentes aplicaciones para mantener las concentraciones sanguíneas necesarias para afectar la respuesta ovárica (Dattena *et al.*, 1994). Existen diferentes esquemas de aplicación, los cuales varían en dosis, frecuencia y duración del tratamiento (Dattena *et al.*, 1994).

Las dosis utilizadas varían desde 12 a 22.5 mg según las características de los animales en estudio (Hawk *et al.*, 1987; Driancourt y Fry, 1992; Mejía, 1995). En bovinos se ha demostrado que la respuesta a la superovulación es mayor al aplicar el tratamiento en dosis decrecientes en comparación con la aplicación en dosis constantes (Chupin *et al.*, 1985). En ovinos las mejores respuestas se obtienen aplicando los tratamientos cada 12 horas durante 2 o 3 días en dosis decrecientes (Lopez-Sebastián *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1990). Existe una alta variabilidad en la respuesta, que parece deberse en parte al estado de la población folicular al iniciarse el tratamiento.

Otro esquema de aplicación es el utilizado por Dattena *et al.* (1994), quienes administraron intramuscularmente una dosis única de FSH disuelta en un vehículo de larga acción (polivinilpirrolidona), obteniendo resultados similares a los tratamientos tradicionales de varios días con dosis decrecientes.

Se ha informado que los regímenes de superovulación con FSH pueden ser mejorados con el uso suplementario de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de gonadotropina coriónica humana (hCG), las cuales provocan la ovulación de mayor cantidad de folículos (Barry *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1989; Krisher *et al.*, 1994).



### **2.3 Inseminación artificial intrauterina.**

La inseminación artificial (IA) es parte importante en la selección y explotación de genotipos superiores. El potencial de la IA para lograr su objetivo depende del desarrollo de métodos que permitan la conservación adecuada del semen y de técnicas de IA que logren índices de concepción adecuados con dosis pequeñas de semen (Kim *et al.*, 1992).

La congelación del semen supera el problema de distribución del semen, mientras que la inseminación intrauterina aumenta la tasa de concepción. Estas dos técnicas incrementan notablemente el número de crías producido por semental por temporada (Kim *et al.*, 1992).

Es conocido que el cérvix de la oveja actúa como una barrera para el paso del semen cuando se realiza inseminación artificial transcervical, además la sincronización y superovulación hacen más difícil superar (Armstrong y Evans, 1984; Hawk *et al.*, 1987). El tratamiento superovulatorio en ovejas donadoras resulta también en un ambiente uterino no favorable para el transporte de los espermatozoides, por lo que a veces no se logran altas tasas de recuperación embrionaria. Debido a esto, el depósito del semen directamente en la luz uterina por medio de laparoscopia incrementa el número de espermatozoides que alcanzan los oviductos, lo que aumenta tasa de fertilización en comparación con la inseminación artificial transcervical (Lightfoot *et al.*, 1970b; Fukui y Roberts, 1977; Robinson *et al.*, 1989; McKelvey, 1992).

Para obtener un máximo de fertilidad de los ovocitos es importante inseminar en un momento cercano a la ovulación (Scudamore *et al.*, 1991; Maxwell *et al.*, 1993), así como minimizar la pérdida de ovocitos producida por la manipulación quirúrgica (Robinson *et al.*, 1989). También resulta importante depositar el semen lo más cercano al sitio de fertilización, sobre todo cuando se limita el número de espermatozoides (Maxwell *et al.*, 1993).

Robinson *et al.* (1989) mencionan que si se realiza la inseminación intrauterina por laparoscopia en etapas tempranas de la fase folicular del ciclo estral (a las 36 h del retiro de la esponja) se puede interferir con la ruptura normal de los folículos preovulatorios y la captación de los ovocitos por el infundíbulo, obteniéndose una baja recuperación acompañada

de nula fertilización. Al realizar la inseminación intrauterina a las 48 h del retiro de la esponja (tiempo esperado de ovulación) se obtienen menores tasas de recuperación embrionaria en comparación con las obtenidas al inseminar a las 60 h del retiro de la esponja (Scudamore et al., 1991). Sin embargo, el número de embriones considerados como transferibles es menor al realizar la inseminación intrauterina a las 60 h del retiro de la esponja ya que se encuentran retrasados en su desarrollo (Scudamore et al., 1991), pues un número importante de ovocitos, en ovejas superovuladas en las cuales la ovulación ha empezado cerca del momento de la inseminación, pueden estar demasiado envejecidos para ser fertilizados cuando los espermatozoides ya se encuentren capacitados, y sean capaces de fertilizar (Armstrong y Evans, 1984).

La cantidad mínima de espermatozoides necesaria para la inseminación intrauterina aún no ha sido determinada, sin embargo puede variar considerablemente dependiendo del tiempo de inseminación en relación con la ovulación (Armstrong y Evans, 1984). Se han encontrado tasas de fertilización del 100% utilizando dosis altas de espermatozoides móviles ( $80 \times 10^6$ ) (Robinson et al., 1989), en contraste con tasas de 38 y 40% al utilizar dosis más bajas ( $10 \times 10^6$  espermatozoides móviles) (Evans y Armstrong, 1984). Walker et al. (1984) no encontraron diferencias en las tasas de fertilización al depositar intrauterinamente en ovejas superovuladas semen fresco o congelado ( $2 \text{ ó } 20 \times 10^6$  espermatozoides móviles). Jabbour et al. (1988) recomiendan dosis mayores a  $6.2 \times 10^6$  espermatozoides móviles al utilizar semen congelado en ovejas superovuladas.

Las técnicas de laparoscopia, tanto para diagnóstico directo de gestación como para el depósito intrauterino del semen, son de gran importancia en la transferencia embrionaria en ovinos y en la investigación relacionada a la reproducción. Además, estas técnicas pueden tener aplicaciones importantes en estudios similares que involucren especies no domésticas, en las cuales se desean procedimientos menos invasivos y cirugías poco traumáticas (Schiewe et al., 1984).

## **2.4 Colección embrionaria.**

La colección embrionaria puede realizarse ya sea mediante técnicas quirúrgicas o no quirúrgicas. Las técnicas quirúrgicas involucran cirugía mayor por medio de laparotomía y la exposición del útero (Boundy *et al.*, 1985); lo cual permite examinar el número, tamaño y apariencia general de los folículos y cuerpos lúteos, así como la manipulación del útero durante la recolección embrionaria. Mediante esta técnica se realiza una perforación en cada cuerno cerca de la bifurcación uterina, a través de la cual se inserta un catéter de Foley. Se introduce un total 40 a 50 ml del medio de lavado uterino a razón de 5 a 10 ml por lavado. El medio se colecta en una jeringa mientras se realiza un ligero masaje en el cuerno uterino. Este mismo procedimiento se repite de 5 a 8 veces por cuerno. Al final del procedimiento se retiran los catéteres y se suturan los sitios de perforación (Schiewe *et al.*, 1990).

Una variación de esta técnica fue desarrollada por Ruttle *et al.* (1988), quienes insertan un catéter intravenoso en la unión útero tubárica, por el cual recolectan el medio, que es introducido a través de un catéter localizado cerca de la bifurcación uterina.

Estas técnicas estándar de colección embrionaria por laparotomía resultan en la formación de adherencias del aparato genital, el omento y la pared abdominal. Estas adherencias pueden reducir la subsecuente fertilidad de las ovejas donadoras. También dificultan la realización de la cirugía en intentos subsecuentes de colección de embriones, y eventualmente esta se vuelve imposible, por lo que el resultado es la reducción de la vida reproductiva promedio de cada oveja donadora (McKelvey *et al.*, 1986).

La transferencia embrionaria se ve entonces limitada debido a la colección quirúrgica, por lo que recientemente se han desarrollado métodos no quirúrgicos para la colección embrionaria en pequeños rumiantes. Existen varias alternativas eficaces, tales como la colección embrionaria no quirúrgica y la colección por laparoscopia (Kraemer, 1989).

La colección embrionaria no quirúrgica involucra el pasar los anillos cervicales mediante la dilatación de los mismos, y la introducción de un catéter adecuado para la colección. Las desventajas de este método son la baja efectividad al tratar de dilatar el cérvix, y

además de que la presión que se requiere aplicar puede impulsar el medio a través de la unión útero-tubárica, lo que podría provocar la pérdida de los embriones en la cavidad abdominal (Kraemer, 1989).

Capehart *et al* (1984) realizaron la colección de embriones por laparoscopia utilizando el endoscopio para visualizar la respuesta ovárica y exteriorizar los cuernos uterinos. Se inyectó simultáneamente el fluido de colección en ambos cuernos uterinos y se colectó vía cervical a través de una sonda de Foley. La exteriorización parcial de los cuernos uterinos provocaron pequeñas adherencias en la unión útero tubárica. Más recientemente, McKelvey *et al* (1986) desarrollaron una técnica en la cual no es necesario exteriorizar el aparato reproductor y permite que las ovejas puedan utilizarse repetidamente como donadoras. Esta técnica consiste en colocar tres trocares-cánula por los cuales se insertan el laparoscopio y un par de forceps para laparoscopia. Se realiza una incisión en la pared uterina y se introduce un catéter pediátrico de Foley, mientras que en la unión útero tubárica se inserta un catéter intravenoso. El medio de lavado que se introduce por el catéter intravenoso es colectado por el catéter de Foley.

### III MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Localización.

Este trabajo se realizó durante los meses de octubre y noviembre en el Centro de Enseñanza Práctica Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el km 28.9 de la carretera federal México-Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° latitud oeste, a una altura de 2760 msnm. El clima de la región es de tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y una temperatura promedio de 19°C. La precipitación pluvial es de 800 a 1200 mm anuales (García, 1981).

#### 3.2 Animales experimentales.

Se utilizaron 35 ovejas adultas, de las cuales 15 eran de raza Rambouillet, 3 Suffolk y 17 cruzas (Suffolk x Hampshire). Las ovejas se dividieron al azar en 3 grupos experimentales, 10 de ellas en el grupo de inseminación artificial intrauterina a las 12 h de detectado el celo, 10 en el grupo de inseminación artificial intrauterina a las 24 h de detectado el celo y 15 en el grupo de monta natural.

Inicialmente todas las borregas fueron sincronizadas utilizando esponjas intravaginales impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestrona\* durante 12 días. Para la superovulación de las ovejas se aplicó FSH-P\*\* de la siguiente manera: 6 mg al día 10 de colocada la esponja intravaginal (3 mg en la mañana y 3 mg en la noche); 5 mg en el día 11 (3 mg en la mañana y 2 mg por la noche); y 4 mg en el día 12 (2 mg en la mañana y 2 mg por la noche).

-----  
\* Chronogest. Intervet. México, D.F.

\*\* FSH-P. Scheramex. México, D.F.

A partir de 24 h de retirada la esponja se realizó la detección de estros cada 12 h con un macho provisto de mandil.

El grupo no inseminado artificialmente recibió monta natural a partir de las 12 h del inicio del estro.

### **3.3 Colección y almacenamiento del semen.**

Se utilizaron tres carneros de razas Suffolk y Rambouillet, de los cuales, previa evaluación, se obtuvieron 3 eyaculados por medio de una vagina artificial.

La congelación del semen se llevó a cabo por el método de pellets (Lightfoot y Salamon, 1970a; Evans y Maxwell, 1987) modificada por Brito *et al* (1995), de tal manera que cada pellet tuviera un volúmen de 0.1 ml y  $80 \times 10^6$  espermatozoides. La descongelación se llevó a cabo en un vial estéril, el cual contenía 0.15 ml de suero salino fisiológico a 37 °C. Posteriormente se introdujo el semen en una pajilla de 0.25 ml, para su aplicación.

### **3.4 Tratamiento y manejo de las ovejas.**

Las 20 ovejas de los grupos de inseminación intrauterina fueron dietadas 24 h antes de la hora esperada de inseminación.

Para la inseminación intrauterina se rasuró y desinfectó con cloruro de benzalconio un área de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup> anterior a la ubre. Posteriormente las ovejas fueron puestas bajo anestesia general. La anestesia fue inducida utilizando hidrocloreuro de xilacina al 2% (0.01 g/kg de peso vivo) y ketamina base (2 mg/kg de peso vivo). Una vez anestesiadas las ovejas fueron suspendidas cabeza abajo en una cuna para laparoscopia en un ángulo de 30° con respecto a la horizontal. La piel se incidió a 3 cm a cada lado de la línea media, aproximadamente 10 cm adelante de la ubre para permitir la entrada de los trocar-cánula.

Se utilizó un laparoscopio operatorio recto de 30 cm de longitud y 10 mm de diámetro, el cual se introdujo a la cavidad abdominal a través de un trocar-cánula. Se utilizó una fuente de luz fría que transmite la luz a través de una fibra óptica flexible de 100 cm de largo por 4

mm de diámetro (Seeger y Klatt, 1980; Quiñones, 1984; Aragunde *et al.*, 1986).

Posteriormente se introdujo un manipulador para laparoscopia a través de otro trocar con la finalidad de desplazar el omento. Después de insuflar el abdomen con aire, se visualizó el útero. Se realizó una tercera incisión en la línea media de 12 a 15 cm adelante de la ubre para introducir a través de una cánula la pipeta de inseminación.

Una vez descongelado el semen, se evaluó la motilidad progresiva y fue introducido en una pajilla de 0.25 ml. Para la inseminación se utilizaron pipetas desechables\* en las cuales se introdujo la pajilla y se colocaron en una pistola de inseminación intrauterina\*\*. Las pipetas fueron introducidas bajo visualización laparoscópica hasta penetrar el cuerno uterino, depositando la mitad de la dosis dentro de cada cuerno. La figura 1 muestra el procedimiento utilizado para la inseminación artificial intrauterina.

Para comprobar que la aguja se encontraba dentro del lumen uterino se corroboró su libre movimiento y se observó por medio del laparoscopio el desplazamiento del estilote dentro de la pajilla, expulsando así el semen. También se verificó que no se formara una protuberancia en el punto de entrada o sobre la pared uterina, lo que indicaría que el semen no se depositó en la luz del útero. Este procedimiento se repitió en el otro cuerno uterino.

Posteriormente se procedió a suturar las incisiones realizadas en piel utilizando suturas absorbibles en la pared abdominal y no absorbibles en piel (McKelvey *et al.*, 1985).

### **3.5 Colección embrionaria.**

La colección de los embriones se realizó en el día 6 ó 7 postinseminación por medio de laparotomía media ventral utilizando la técnica estándar de lavado retrógrado descrita por Schiewe *et al.* (1990).

Al momento de la colección se observaron los cuerpos lúteos, contandose el número

\* ASPICS pour pailletes. IMV. L'aigle, Francia.

\*\*PISTOLET UNIVERSEL < <BARRACA> >. IMV. L'aigle, Francia.

total de estructuras y diferenciando entre cuerpos lúteos normales (bien definidos, de color rojo y bien irrigados) y cuerpos lúteos en regresión (pequeños, de color blanco azulado y sin irrigación marcada). La figura 2 muestra la exteriorización del útero y de los ovarios.

Para la evaluación de los embriones se tomaron en cuenta dos criterios: el grado de desarrollo y la morfología. Se consideraron como embriones transferibles a las mórulas compactas y blastocitos en diferentes etapas de desarrollo; los no transferibles fueron los óvulos no fertilizados, las mórulas no compactas y los embriones degenerados. La figura 3 muestra algunas estructuras transferibles y no transferibles.

En cuanto a su morfología se consideraron como transferibles los embriones buenos o excelentes (esféricos, simétricos y con células de tamaño, color y textura uniformes o con imperfecciones menores en estas características). (Trejo, 1986; Ruttle et al, 1988).

### **3.6 Análisis estadístico.**

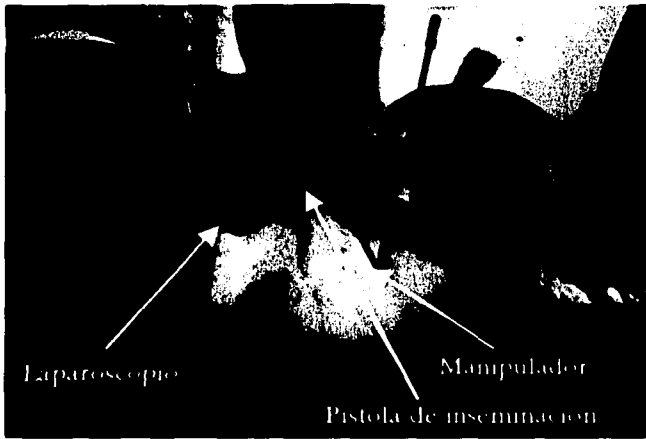
La respuesta a la superovulación se evaluó por el número y calidad de los cuerpos lúteos presentes en los ovarios, el cual se comparó entre grupos por medio de análisis de varianza (Triola, 1986).

Para evaluar el número de embriones colectados en los dos tratamientos (inseminadas intrauterinamente y monta natural) se realizó una prueba de comparación de medias mediante un análisis de varianza (Triola, 1986).

Se realizó un análisis de correlación entre el número y tipo de cuerpos lúteos y las estructuras recuperadas, así como un análisis de varianza utilizando como covariable el número de cuerpos lúteos (Triola, 1986).



a)



b)

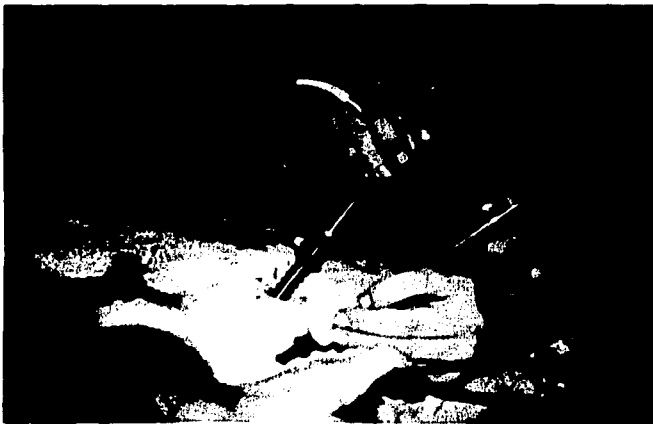


Figura 1. a) Sitios de Inserción de los trócares.  
b) Observación del útero y depósito del semen.

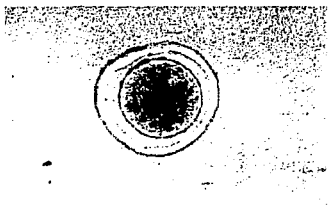


a)



b)

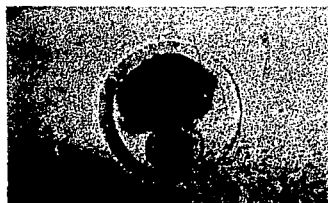
Figura 2. a) Exteriorización del útero y del ovario.  
b) Evaluación de la respuesta a la superovulación.  
En ambas (a y b) se observan cuerpos lúteos normales.



1)



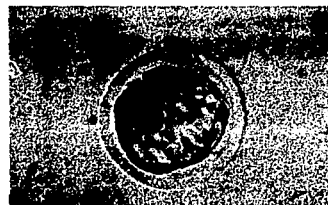
2)



3)



4)



5)



6)

Figura 3. Estructuras no transferibles: 1) ovocito; 2) mórula inicial degenerada. Estructuras transferibles: 3) mórula; 4) blastocito inicial; 5) blastocito maduro; 6) blastocito eclusionado.

#### IV RESULTADOS

Todas las ovejas sincronizadas manifestaron estro dentro de las primeras 24 h posteriores al momento del retiro de la esponja.

La motilidad del semen al descongelar fue de 45%, por lo que las ovejas fueron inseminadas con  $36 \times 10^6$  espermatozoides móviles, es decir aproximadamente  $18 \times 10^6$  en cada cuerno.

En el cuadro 1 se muestra la respuesta a la superovulación con FSH-P en base al promedio de cuerpos lúteos normales y cuerpos lúteos en regresión prematura en los tres grupos experimentales (monta natural, inseminación artificial intrauterina a las 12 h e inseminación artificial intrauterina a las 24 h). Se observa que entre los grupos no hay diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ), lo que significa que los tres grupos eran homogéneos.

Cuadro 1. Respuesta a la superovulación en los tres grupos experimentales utilizando FSH-P.

Tipo de cuerpos lúteos	Grupos de Inseminación		
	Monta natural n=15 media $\pm$ EEM	Inseminación intrauterina a las 12 h n=10 media $\pm$ EEM	Inseminación intrauterina a las 24 h n=10 media $\pm$ EEM
Cuerpos lúteos normales	7.3 $\pm$ 1.9	6.6 $\pm$ 2.4	9.6 $\pm$ 2.4
Cuerpos lúteos en regresión	1.9 $\pm$ 1.1	1.7 $\pm$ 1.4	4.1 $\pm$ 1.4

EEM = error estándar de la media.

n = número de la muestra.

Las diferencias entre los grupos no son significativas ( $p > 0.05$ ).

#### IV RESULTADOS

Todas las ovejas sincronizadas manifestaron estro dentro de las primeras 24 h posteriores al momento del retiro de la esponja.

La motilidad del semen al descongelar fue de 45%, por lo que las ovejas fueron inseminadas con  $36 \times 10^6$  espermatozoides móviles, es decir aproximadamente  $18 \times 10^6$  en cada cuerno.

En el cuadro 1 se muestra la respuesta a la superovulación con FSH-P en base al promedio de cuerpos lúteos normales y cuerpos lúteos en regresión prematura en los tres grupos experimentales (monta natural, inseminación artificial intrauterina a las 12 h e inseminación artificial intrauterina a las 24 h). Se observa que entre los grupos no hay diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ), lo que significa que los tres grupos eran homogéneos.

Cuadro 1. Respuesta a la superovulación en los tres grupos experimentales utilizando FSH-P.

Tipo de cuerpos lúteos	Grupos de Inseminación		
	Monta natural n=15 media $\pm$ EEM	Inseminación intrauterina a las 12 h n=10 media $\pm$ EEM	Inseminación intrauterina a las 24 h n=10 media $\pm$ EEM
Cuerpos lúteos normales	7.3 $\pm$ 1.9	6.6 $\pm$ 2.4	9.6 $\pm$ 2.4
Cuerpos lúteos en regresión	1.9 $\pm$ 1.1	1.7 $\pm$ 1.4	4.1 $\pm$ 1.4

EEM = error estandar de la media.

n = número de la muestra.

Las diferencias entre los grupos no son significativas ( $p > 0.05$ ).

En la figura 4 se observa que, independientemente del grupo de inseminación en el que quedaron asignadas, poco más de la mitad de las ovejas superovuladas tenían únicamente cuerpos lúteos normales, mientras que en el 34.28% de las ovejas había cuerpos lúteos en regresión, ya sea solos o acompañados por cuerpos lúteos normales. El 11.42% de los animales no ovularon o no tuvieron respuesta superovulatoria (menos de 3 cuerpos lúteos por oveja).

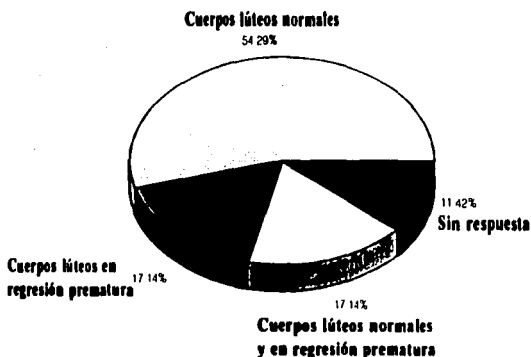


Figura 4. Porcentaje de ovejas superovuladas con diferentes tipos de cuerpos lúteos.

En el grupo inseminado intrauterinamente 12 h después del retiro de la esponja no se encontró un solo embrión, el promedio de ovocitos recuperados por oveja en dichos animales fue de 2.9 ovocitos. Debido a esto en todos los análisis posteriores solamente se compararán a las ovejas del grupo de monta natural contra las inseminadas intrauterinamente 24 h después del inicio del estro.

Al comparar las características ováricas de las hembras que produjeron embriones (fertilizadas) con aquellas en las que se recuperaron únicamente ovocitos (no fertilizadas), se observa que tanto en el grupo de inseminación artificial intrauterina a las 24 h como en el de monta natural las ovejas fertilizadas tenían más cuerpos lúteos normales y menos cuerpos lúteos en regresión que las ovejas no fertilizadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuerpos lúteos normales y en regresión de las hembras que produjeron embriones (fertilizadas) y hembras en las que se obtuvieron únicamente ovocitos (no fertilizadas).

Variable	Ovejas fertilizadas			Ovejas No. fertilizadas		
	Monta natural	Inseminación intrauterina a las 24 h	Promedio	Monta natural	Inseminación intrauterina a las 24 h	Promedio
	media $\pm$ EEM	media $\pm$ EEM	$\pm$ EEM	media $\pm$ EEM	media $\pm$ EEM	$\pm$ EEM
Cuerpos lúteos normales	10.0 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	11.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	3.7 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	3.5 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
Cuerpos lúteos en regresión prematura	1.1 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	12.0 $\pm$ 1.9 <sup>d</sup>	7.5 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>

EEM = error estándar de la media.

a, b, c, d, para un determinado tipo de cuerpo lúteo ( renglón) las literales diferentes indican diferencias estadísticas entre grupos ( $p < 0.01$ ).

En el cuadro 3 se muestra el promedio de embriones y ovocitos recuperados, considerando a todas las ovejas de los dos grupos experimentales (monta natural vs. inseminación artificial intrauterina a las 24 h). No se encontró efecto debido a la raza, por lo que los resultados se presentan en forma conjunta.

Cuadro 3. Promedio de embriones y ovocitos obtenidos en ovejas inseminadas intrauterinamente (24 h de la detección del estro) o servidas por monta natural.

Variable	Monta natural (n = 15)	Inseminación intrauterina a las 24 h (n = 10)
	Promedio ± EEM	Promedio ± EEM
Número de embriones	3.9 ± 1.2	5.2 ± 1.9
Embriones transferibles	3.5 ± 1.2	5.1 ± 1.8
Número de ovocitos	1.8 ± 1.0	1.6 ± 1.5
*Número de estructuras	5.7 ± 1.5	7.4 ± 2.2

EEM = error estándar de la media.

n = número de la muestra.

\* Número de estructuras = embriones + ovocitos.



En el cuadro 4 se observa el promedio de embriones y ovocitos recuperados en el día 6 ó 7, considerándose unicamente a las ovejas fertilizadas (que produjeron embriones).

A pesar de que no existieron diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ), parecería que existe una marcada tendencia a obtener mayor número de embriones totales y transferibles utilizando la inseminación artificial.

Cuadro 4. Promedio de embriones y ovocitos de las ovejas que produjeron embriones de acuerdo al tipo de servicio.

Inseminación	Monta natural (n = 8)	Inseminación Intrauterina a las 24 h (n = 6)
	Promedio ± EEM	Promedio ± EEM
Número de embriones	6.4 ± 1.3	8.8 ± 2.1
Embriones transferibles	5.8 ± 1.3	8.7 ± 2.2
Número de ovocitos	1.7 ± 0.7	1.2 ± 1.2
Número de estructuras	8.1 ± 1.5	11.1 ± 2.5

EEM= error estandar de la media.

n= número de la muestra.

Las diferencias entre grupos no son significativas ( $p > 0.05$ ).

Existió una alta correlación entre el número de cuerpos lúteos normales y el número de embriones totales y transferibles obtenidos en cada oveja (cuadro 5).

Cuadro 5. Coeficiente de correlación entre el número de cuerpos lúteos normales o en regresión y las estructuras recuperadas.

Estructuras recuperadas	Cuerpos lúteos normales promedio	Cuerpos lúteos en regresión promedio
Embriones totales	0.59 *	0.09
Embriones transferibles	0.63 *	0.15
Ovocitos	0.45 *	-0.1
Estructuras	0.72 *	0.01

\* Valores con asterisco representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ).

Existió una alta correlación entre el número de cuerpos lúteos normales y el número de embriones totales y transferibles obtenidos en cada oveja (cuadro 5).

Cuadro 5. Coeficiente de correlación entre el número de cuerpos lúteos normales o en regresión y las estructuras recuperadas.

Estructuras recuperadas	Cuerpos lúteos normales promedio	Cuerpos lúteos en regresión promedio
Embriones totales	0.59 *	0.09
Embriones transferibles	0.63 *	0.15
Ovocitos	0.45 *	-0.1
Estructuras	0.72 *	0.01

\* Valores con asterisco representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ).

Como se mostró en el cuadro 1, las ovejas del grupo de inseminación intrauterina, por razones de azar, tuvieron más ovulaciones que las de monta natural. Por esta razón, al repetir el análisis utilizando como covariable para cada oveja el número de cuerpos lúteos normales presentes en sus ovarios se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 6, en el que se observa que no existen diferencias entre los tipos de inseminación.

Cuadro 6. Promedio de embriones y ovocitos recuperados después de inseminar artificialmente a las 24 h del inicio del estro o por monta natural utilizando el número de cuerpos lúteos como covariable.

Inseminación	Monta natural (n = 8)	Inseminación intrauterina a las 24 h (n = 6)
	Promedio ± EEM	Promedio ± EEM
Número de embriones	6.9 ± 1.2	7.3 ± 2.0
Embriones transferibles	6.4 ± 1.6	6.9 ± 1.9
Número de ovocitos	2.0 ± 0.8	1.5 ± 1.0
Número de estructuras	8.9 ± 1.2	8.8 ± 2.0

EEM = error estandar de la media.

n = número de la muestra.

Las diferencias entre los grupos no son significativas (p>0.05).

## V DISCUSION

En el presente trabajo, se pudo observar que todas las ovejas que fueron sincronizadas y superovuladas manifestaron estro dentro de las primeras 24 h posteriores al momento del retiro de la esponja, lo cual coincide a lo informado por Dattena *et al* (1994) y López *et al* (1990).

En el presente estudio el 11.4% de las ovejas no respondió al tratamiento superovulatorio, porcentaje similar (8.6%) al informado por Buckrell *et al* (1989). Schiewe *et al* (1990), quienes al utilizar PMSG observaron que hay ovejas que intrínsecamente presentan una baja respuesta superovulatoria, en las que la hormona es incapaz de rescatar folículos destinados a tener atresia. Probablemente, las ovejas que no respondieron a la superovulación en el presente trabajo presentaban un fenómeno similar, por lo que tal vez necesitaban una dosis de FSH más elevada que la utilizada.

El promedio de cuerpos lúteos obtenido en respuesta a la superovulación fue similar al encontrado por otros autores (López *et al*, 1990; Scudamore *et al*, 1991; Dattena *et al*, 1994). Sin embargo, es menor a los obtenidos por Bondioli y Wright (1980), Cognie *et al* (1985) y Chesné *et al* (1987). Esta diferencia pudo deberse a que dichos investigadores utilizaron una dosis de FSH superior a la de este trabajo, ya que Bondioli y Wright (1980) obtuvieron un promedio de 12.7 ovulaciones por oveja utilizando 24 mg de FSH, Cognie *et al* (1985) 10.1 ovulaciones con 16 mg de FSH y Chesné *et al* (1987) 10.2 ovulaciones utilizando 16 mg de FSH.

En las ovejas del grupo de inseminación artificial intrauterina a las 12 h de detectado el estro no se obtuvieron embriones. Debido a que el estro se presentó en promedio 24 h después del retiro de las esponjas, las ovejas de este grupo fueron inseminadas aproximadamente 36 h después del retiro de las esponjas. Robinson *et al* (1989) tampoco recuperaron embriones al

inseminar ovejas intrauterinamente 36 h después del retiro de la esponja.

Lo anterior probablemente indica que la inseminación intrauterina 12 h después del inicio del estro es prematura, y que cuando se utiliza semen congelado en ovejas superovuladas la inseminación intrauterina deberá realizarse en un momento más cercano a la ovulación. Holst y Moore (1970) mencionan que es necesario evitar tanto la inseminación temprana como tardía.

Se ha informado que la viabilidad del semen congelado en el aparato genital de la oveja es menor que la del semen fresco (Evans y Maxwell, 1987; Walker *et al.*, 1989; Salamon y Maxwell, 1995). También es conocido que cuando se insemina intrauterinamente a ovejas superovuladas durante la fase temprana del ciclo estral (Robinson *et al.*, 1989) se deteriora tanto el transporte espermático como la viabilidad del semen. En la oveja la ovulación se produce alrededor de 30 horas después del inicio del estro (Walker *et al.*, 1986). Esto significa que al inseminarse 12 h después del inicio del estro aún faltaban 18 o más horas para la ovulación, lo que al parecer es un intervalo demasiado largo para el semen congelado. El inseminarse mas cerca del momento de la ovulación se logró una fertilización exitosa, por lo que en las ovejas del grupo de inseminación intratuterina a las 24 h de detectado el estro el número de embriones transferibles obtenidos en este trabajo fue superior al promedio encontrado por Walker *et al.* (1984), quienes utilizaron una metodología similar para la inseminación y menor cantidad de espermatozoides móviles (1 a 10 millones de espermatozoides móviles al descongelamiento por cuerno inseminado). Aunque existe poca información en cuanto a la dosis de semen congelado que debe utilizarse en la inseminación artificial intrauterina en ovejas superovuladas, en el presente trabajo el haber utilizado una dosis mayor se tradujo en una mayor cantidad de embriones transferibles recuperados.

Robinson *et al.* (1989) mencionan que hay una baja recuperación de embriones al realizar inseminación intrauterina a las 48 h de retirada la esponja, lo cual atribuyeron a la técnica de inseminación dado que la manipulación del útero y de los oviductos interfieren con el transporte de los embriones. Sin embargo, al día tres post-inseminación realizaron una

inseminar ovejas intrauterinamente 36 h después del retiro de la esponja.

Lo anterior probablemente indica que la inseminación intrauterina 12 h después del inicio del estro es prematura, y que cuando se utiliza semen congelado en ovejas superovuladas la inseminación intrauterina deberá realizarse en un momento más cercano a la ovulación. Holst y Moore (1970) mencionan que es necesario evitar tanto la inseminación temprana como tardía.

Se ha informado que la viabilidad del semen congelado en el aparato genital de la oveja es menor que la del semen fresco (Evans y Maxwell, 1987; Walker *et al.*, 1989; Salamon y Maxwell, 1995). También es conocido que cuando se insemina intrauterinamente a ovejas superovuladas durante la fase temprana del ciclo estral (Robinson *et al.*, 1989) se deteriora tanto el transporte espermático como la viabilidad del semen. En la oveja la ovulación se produce alrededor de 30 horas después del inicio del estro (Walker *et al.*, 1986). Esto significa que al inseminarse 12 h después del inicio del estro aún faltaban 18 o más horas para la ovulación, lo que al parecer es un intervalo demasiado largo para el semen congelado. El inseminarse mas cerca del momento de la ovulación se logró una fertilización exitosa, por lo que en las ovejas del grupo de inseminación intratuterina a las 24 h de detectado el estro el número de embriones transferibles obtenidos en este trabajo fue superior al promedio encontrado por Walker *et al.* (1984), quienes utilizaron una metodología similar para la inseminación y menor cantidad de espermatozoides móviles (1 a 10 millones de espermatozoides móviles al descongelamiento por cuerno inseminado). Aunque existe poca información en cuanto a la dosis de semen congelado que debe utilizarse en la inseminación artificial intrauterina en ovejas superovuladas, en el presente trabajo el haber utilizado una dosis mayor se tradujo en una mayor cantidad de embriones transferibles recuperados.

Robinson *et al.* (1989) mencionan que hay una baja recuperación de embriones al realizar inseminación intrauterina a las 48 h de retirada la esponja, lo cual atribuyeron a la técnica de inseminación dado que la manipulación del útero y de los oviductos interfieren con el transporte de los embriones. Sin embargo, al día tres post-inseminación realizaron una

laparotomía para examinar el número de cuerpos lúteos en los ovarios, lo cual sí interfiere con el transporte de los embriones. En el presente trabajo, una vez realizada la inseminación intrauterina se procedió a lavar los cuernos uterinos al día 6 post-inseminación, cuando los embriones ya habían descendido a los cuernos uterinos, lo cual posiblemente contribuyó a una mayor recuperación embrionaria.

Cabe hacer mención que en el presente trabajo no se revisaron los ovarios al momento de la inseminación intrauterina ya que se tiene evidencia de que esta manipulación interfiere con el transporte de los ovocitos\*.

Se ha informado que los cuerpos lúteos en regresión prematura constituyen un problema en la superovulación, pues ocurren frecuentemente y afectan la recuperación embrionaria (Schiewe *et al.*, 1990). En el presente trabajo se encontró un mayor número de cuerpos lúteos en regresión prematura y menor número de cuerpos lúteos normales en las ovejas en las que no se recuperaron embriones, tanto de los grupos de inseminación intrauterina a las 24 h del inicio del estro como en los de monta natural.

Es conocido que al utilizar eCG como tratamiento superovulatorio hay un reclutamiento y rescate de folículos que estaban destinados a sufrir atresia, sin embargo, dado que la vida media de la eCG en la circulación es muy larga, continúa reclutando folículos antrales, los cuales tienen una secreción suplementaria de estrógenos (Armstrong *et al.*, 1982; Jensen *et al.*, 1982; Hawk *et al.*, 1987) que afectan el desarrollo de la gestación, ya que provocan la regresión prematura del cuerpo lúteo (Schiewe *et al.*, 1990).

Aún cuando estos efectos son menos evidentes al utilizar FSH (Elsden *et al.*, 1978; Armstrong *et al.*, 1983), en el presente trabajo se observó un porcentaje relativamente elevado de cuerpos lúteos en regresión prematura, encontrándose que solo tenían este tipo de estructuras y no se obtuvieron embriones ni ovocitos, lo cual coincide con lo informado por

\* Comunicación personal. Flores-Foxwoth, G. Texas A & M University, College Station, Texas, USA.



Schiewe *et al* (1990).

La regresión prematura del cuerpo lúteo posterior a la estimulación hormonal exógena es una causa poco entendida de falla en la recuperación de embriones en ovejas y cabras superovuladas. La disfunción lútea en ovejas superovuladas es generalmente caracterizada por un alza pasajera y caída en las concentraciones circulantes de progesterona dentro de los cuatro días posteriores a la ovulación (Armstrong y Evans, 1984; Balcázar, 1995).

Como se mencionó anteriormente, la regresión prematura de los cuerpos lúteos aparentemente se debe a una excesiva producción de estrógenos ováricos a partir de folículos que se desarrollan en el ovario por efecto del tratamiento superovulatorio, pero no llegan a ovular (Battye *et al*, 1988; Schiewe *et al*, 1990; Driancourt y Fry, 1992).

Hay que recordar que para que se produzca la lisis del cuerpo lúteo se requiere que se establezca un patrón de secreción pulsátil de la  $PGF_2\alpha$  por parte del útero (Zarco *et al*, 1988). Aunque los mecanismos que regulan la secreción y síntesis de la  $PGF_2\alpha$  no están completamente claros se conoce que las hormonas esteroides ováricas (estradiol y progesterona) y la oxitocina tanto de origen lúteo como hipofisiario, juegan un papel sumamente importante en la generación de estos pulsos (Vallet *et al*, 1991; Garverick *et al*, 1992; Silvia y Raw, 1993).

El estradiol proveniente de los folículos (Baird *et al*, 1976; Silvia *et al*, 1992) al interactuar con sus receptores estimula la síntesis para receptores de oxitocina (McCracken *et al*, 1984). En este momento se comienza a liberar oxitocina de origen hipofisiario en forma pulsátil (Silvia *et al*, 1991), la interacción de esta oxitocina con su receptor ocasiona la liberación de prostaglandina  $F_2\alpha$  uterina (McCracken *et al*, 1984; Silvia *et al*, 1991). Las elevadas concentraciones de  $PGF_2\alpha$  a su vez estimula al cuerpo lúteo para que este libere más oxitocina (Moore *et al*, 1986), estableciéndose entonces un ciclo de retroalimentación positiva entre estas dos hormonas.

Probablemente el estradiol proveniente de los folículos que no se luteinizaron por efecto de la superovulación este estimulando la formación prematura de receptores para oxitocina, lo cual apoya la teoría de Carson *et al* (1981), quienes plantean la hipótesis de que los folículos pequeños considerados como "no estrogénicos" (menores a 2 mm de diámetro) que se desarrollan después de la ovulación, si producen pequeñas cantidades de estradiol, las cuales en conjunto son suficientes para desencadenar la síntesis de receptores para oxitocina en el útero y de esta manera desencadenar el proceso de luteólisis.

Parece existir una alta relación entre la presencia de cuerpos lúteos en regresión prematura con la sobrevivencia de los embriones, lo cual podría deberse a la alteración del ambiente uterino que se produce al reducirse los niveles de progesterona. Jaqueline *et al* (1989) mencionan que los cuerpos lúteos de corta duración no son la única causa de problemas de fertilidad, sino que se presenta una mortalidad embrionaria causada por un inapropiado medio ambiente uterino, además de una inhabilidad del embrión para producir sustancias luteotrópicas.

Aparentemente el disturbio hormonal que ocasiona la regresión prematura de los cuerpos lúteos está ya afectando a la gestación en etapas anteriores, alterando el transporte de gametos y la fertilización. Esto es sugerido por el hecho de que en los animales con cuerpos lúteos en regresión prematura no se encontraron embriones pero tampoco ovocitos.

En este trabajo, se observó que de las ovejas que tenían cuerpos lúteos normales en asociación con cuerpos lúteos en regresión prematura (17.14%) si se recuperaron embriones, mientras que la recuperación de embriones fue nula en aquellas que solamente tenían cuerpos lúteos en regresión prematura (17.14%). Schiewe *et al* (1990) mencionan que no se presenta la asociación de cuerpos lúteos normales con cuerpos lúteos en regresión prematura, pero tanto en este trabajo, como en el realizado por Rosas (1995)\*, se ha podido observar que ambos

\* Comunicación personal. Rosas, J. Departamento de Reproducción, Fac. Med. Vet. y Zoot., UNAM. México, D.F.

tipos de cuerpos lúteos pueden coexistir en el mismo animal. En ovejas con ambos tipos de cuerpos lúteos (normales y en regresión) es probable que los que se consideran normales se encuentren ya en proceso de regresión, por lo que no se puede descartar que el proceso sea de todo o nada.

En el presente trabajo se pudo apreciar que de acuerdo a lo descrito por Hunter *et al* (1986), los cuerpos lúteos normales eran de un color rojo brillante, prominentes, mientras que los cuerpos lúteos en regresión prematura eran pálidos, con escaso parénquima y de tamaño reducido.

En las ovejas que presentan cuerpos lúteos en regresión prematura se produce una elevación transitoria de progesterona en el día 3 del ciclo, la cual desciende hacia el día 4, alcanzando niveles basales al día 5 (Schiewe *et al*, 1990; Balcázar, 1995). También se ha observado que cuando ambos tipos de cuerpos lúteos se presentan en la misma oveja los niveles de progesterona también descienden en la misma forma\*, lo que apoyaría el concepto de que los que aún se observan normales en realidad ya iniciaron la regresión.

Schiewe *et al* (1990) mencionan que la presencia de cuerpos lúteos en regresión prematura es independiente del tratamiento de gonadotropinas y lo asocia más bien a la administración de la  $PGF_2\alpha$  exógena utilizada para la sincronización. Sin embargo, en el presente trabajo se pudo determinar que este efecto es producido por el tratamiento superovulatorio con FSH, ya que las ovejas no recibieron prostaglandinas. En este estudio se utilizó una dosis relativamente baja de FSH (15 mg) y aún así se presentaron los cuerpos lúteos de corta duración, por lo que no se puede afirmar que el exceso de estimulación folicular se deba a una dosis excesiva de la hormona utilizada para superovular.

En las hembras en las cuales se recuperaron embriones, tanto del grupo de monta natural como en el de inseminación intrauterina a las 24 h del inicio del estro, se presentaron

---

\* Comunicación personal. Rosas, J. Departamento de Reproducción, Fac. Med. Vet. y Zoot., UNAM. México, D.F.

**un mayor número de cuerpos lúteos normales y menor número de cuerpos lúteos en regresión, en comparación con las ovejas en las cuales se recuperaron únicamente ovocitos. Esto confirma la importancia de mantener una función lútea plena hasta el momento de la recuperación embrionaria.**

## VI CONCLUSIONES

En las ovejas inseminadas intrauterinamente a las 24 h después del inicio del celo se obtuvieron embriones (promedio  $5.2 \pm 1.9$ ), mientras que en las inseminadas a las 12 h del inicio del celo la recuperación fue nula. Esto demuestra la importancia de la detección del celo en ovejas superovuladas al utilizar semen congelado para poder inseminar en un momento cercano a la ovulación.

La inseminación intrauterina a las 12 h del inicio del celo probablemente fue prematura, lo que indica que la viabilidad del semen congelado está disminuida y no sobrevive por más de 12 horas en el aparato reproductor de la hembra.

No existió diferencia en el número de embriones producidos por las ovejas inseminadas intrauterinamente con semen congelado a las 24 h de la detección del celo y las servidas por monta natural, lo que demuestra que es posible aprovechar todas las ventajas de la inseminación artificial intrauterina con semen congelado en programas de superovulación y transferencia de embriones en ovejas.

La presencia de cuerpos lúteos en regresión prematura, o de vida corta, afecta la producción y recuperación de embriones.

En aquellas ovejas superovuladas que presentan únicamente cuerpos lúteos en regresión la recuperación embrionaria es nula, por lo que es importante realizar investigaciones para encontrar métodos que eviten la ocurrencia de regresión lútea prematura en ovejas superovuladas.

## VII LITERATURA CITADA

Alwan, S.F., Boland, M.P. and Gordon, I.: Superovulation and oocyte recovery in the ewe. Theriogenology, **29**: 1143-1148 (1988).

Armstrong, D.T., Pfitzner, A.P., Porter, K.J., Warnes, G.M., Janson, P.O. and Seamark, R.F.: Ovarian responses of anoestrous goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotropin. Anim. Reprod. Sci., **5**: 15-23 (1982).

Armstrong, D.T., Pfitzner, A.P., Warnes, G.M., Ralph, M.M. and Seamark, R.F.: Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. J. Reprod. Fertil., **67**: 395 - 401 (1983).

Armstrong, D.T. and Evans, G.: Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. J. Reprod. Fertil., **71**: 89-94 (1984).

Baird, D.T., Land, R.B., Scaramuzzi, R.J. and Wheeler, A.G.: Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe, the secretion of ovarian estradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin  $F_2\alpha$  throughout the oestrus cycle. J. Endocr. **69**: 275- 286 (1976).

Bálcazar, J.A.: Efecto de la suplementación alimenticia sobre la eficiencia reproductiva de corderas pelibuey inducidas a la pubertad con acetato de melengestrol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1992.

Bálcazar, J.A.: Efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo folicular, duración de la fase lútea y fertilidad de ovejas inducidas a ovular mediante la administración de HCG. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1985).

Barry, D.M., Van Nickerk, C.H., Coetzer, W.A., Robertson, M.S.: Superovulatory response and time of ovulation in sheep treated with FSH-p or PMSG followed by GnRH or hCG. Theriogenology, **29**: 217 (1988).

Battye, K.M., Fairclough, R.J., Cameron, A. and Trounson, A.D.: Evidence of prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). J. Reprod. Fert., **84**: 425 - 430 (1988).

Bondioli, K. and Wright, R.W.: Superovulation of progestagen synchronized ewes. Theriogenology, **13**: 89 (1980).

Boundy, T., Clarkon, M.J. and Winter, A.C.: Embryo transfer in sheep under practice conditions. Vet. Rec., **11**: 379 - 381 (1985).

Brito, I., Bálcazar, J.A., Valencia, J., Mejía, O. y Angulo, R.: Evaluación de los diluyentes utilizados para congelación de semen de carnero en pellets. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría. Torreón, Coahuila. 1995.

Buckrell, B.C., Gartley, C.J. and Johnson, W.H.: Results of a commercial sheep embryo transfer program. Theriogenology, **31**: 178 (1989).

Capehart, J.S., Bowen, M.J., Bassett, J.W., Shelton, J.M. and Kraemer, D.C.: A modified technique for the collection of uterine stage ovine embryos. Theriogenology, **21**: 227 (1984).

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

Cervantes, J., Ducoing, A., Flores, G. y Zarco, L.: Utilización del acetato de melengestrol y acetato de fluorogestrona para la inducción del estro en cabras prepúberes y en cabras adultas durante la estación de anestro. Memorias del V Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Zootecnistas y Técnicos en Caprinocultura. México, D.F., 1988.

Chesné, P., Colas, G., Cognié, Y., Guérin, Y. and Sévellec, C.: Lamb production using superovulation, embryo bisection and transfer. Theriogenology, **27**: 751-757 (1987).

Chupin, D., Combarous, Y. and Procureur, R.: Different effect of LH on FSH-induced superovulation in two breeds of cattle. Theriogenology, **23**: 184 (1985).

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

Crempien, Ch., Rojas, C. y Avendaño, J.: Efecto del tratamiento con progestágeno sintético sobre la sincronización de estros, concentración de partos y eficiencia reproductiva de ovinos. Agricultura Técnica, **44**: 347-351 (1984).

Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S. and Cappi, P.: Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Theriogenology, **42**: 237 - 239 (1994).

Davis, I.F., Kerton, D.J. and Mc.Phee, S.R.: Uterine artificial insemination in ewes. In: Reproduction in Sheep. Edited by Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. 306 - 309. Cambridge Univ. Press, Sidney, Australia, 1984.

Driancourt, M.A. and Fry, R.C.: Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. Anim. Reprod. Sci., **27**: 279-292 (1992).

Elsden, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E.: Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mares' serum gonadotropin. Theriogenology, **9**: 17 - 26 (1978).

Evans, G. and Armstrong, D.T.: Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. J. Reprod. Fertil., **70**: 47 - 53 (1984).

Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Ed. Butterworths, Sidney, Australia, 1987.

Fukui, Y. and Roberts, E.M.: Sperm transport after non-surgical intrauterine insemination with frozen semen in ewes treated with prostaglandin F-2 alfa. J. Reprod. Fertil., 51: 141-143 (1977).

García, E.: Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1981.

Garverick, H.A., Moser, M.J., Keisler, D.H., Hamilton, S.A., Roberts, R.M. and Smith, M.F.: Luteal function after intrauterine infusion of recombinant bovine interferon- $\alpha$  into postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. J. Reprod. Fertil., 94: 319 - 325 (1992).

Hackett, A.J., Lagfort, G.A. and Robertson, H.A.: Fertility of ewes after synchronisation of estrus with prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and artificial insemination. Theriogenology, 15: 4 - 6 (1981).

Hafez, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5a. ed. Interamericana, México, D.F., 1987.

Hawk, H.W., Cooper, B.S. and Conley, H.H.: Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. Theriogenology, 28: 139 - 153 (1987).

Herrera, H., Feldman, S., Zarco, L., Valencia, M., Ortiz, H. y Angeles, C.: Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  en diferentes días del ciclo estral de la borrega. Vet. Méx. 21: 143 - 147 (1990).

Holst, P.J. and Moore, N.W.: Control of oestrus and ovulation by progesterone and chronolone administered either intramuscular or intravaginally and subsequent fertility. Aust. J. Agric. Res., 21: 371 - 382 (1970).

Hunter, M.G., Southee, J.A., McLeod, B.J. and Haresing, W.: Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anoestrous ewes. J. Reprod. Fertil., 76: 349 - 363 (1986).

Jabbour, H.N., Evans, G., and Moore, N.W.: Fertilization in superovulated ewes following insemination with different doses of fresh or frozen semen. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol., 20: 92 (1988).

Jaqueline, M., Wallace, J., Robinson, J.J. and Aitken, R.P.: Does inadequate luteal function limit the establishment of pregnancy in the early post-partum ewe?. J. Reprod. Fertil., 85: 229 - 240 (1989).

Jensen, A.M., Greve, T., Madej, A. and Edqvist, L.E.: Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  treated cow. Theriogenology, 18: 33 - 44 (1982).

Killeen, I.D. and Caffery, G.J.: Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. Aust. Vet. J., 59 (1982).

Kim, F.B., Thirkell, E.J. and Williams, H.L.L.: The effect of cervical and laparoscopic artificial insemination on plasma cortisol concentration and heart rate in sheep. Sheep Veterinary Society. Proceedings of Meetings, 16: 119 - 124 (1992).



Kraemer, D.C.: Embryo collection and transfer in small ruminants. Theriogenology, **31**: 141-148 (1989).

Krishner, R.L., Gwazdauskas, F.C., Page, R.L., Russell, C.G., Canseco, R.S., Sparks, A.E.T., Velandar, W.H., Johnson, J.L. and Pearson, R.E.: Ovulation rate, zygote recovery and follicular populations in FSH-superovulated goats treated with PGF<sub>2</sub> alfa and/or GnRH. Theriogenology, **41**: 491-498 (1994).

Lightfoot, R.J. and Salomon, S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fertil., **22**: 385-398 (1970a).

Lightfoot, R.J. and Salomon, S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. II. The effect of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. J. Reprod. Fertil., **22**: 399-408 (1970b).

Lopez Sebastian, A., Cognie, Y., Cocero, M.J., De la Puente, J. and Poulin, N.: Effect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. Theriogenology, **34**: 175-181 (1990).

Maxwell, W.M.C., Curnock, R.M., Logue, D.N. and Reed, H.C.B.: Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws, a preliminary report. Theriogenology, **14**: 82-89 (1980).

Maxwell, W.M.C. and Butler, L.G.: Intra-uterine insemination of ewes with frozen semen. J. Agric. Sci. Camb., **102**: 233-235 (1984).

Maxwell, W.M.C. and Hewitt, L.J.: A comparison of vaginal, cervical an intrauterine insemination of sheep. J. Agric. Sci. Camb., **106**: 191-193 (1986).

Maxwell, W.M.C., Evans, G., Rhodes, S.L., Hillard, M.A. and Bindon, B.M.: Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev., **5**: 57-63 (1993).

McCraken, J.A., Scharamm, W., Barcikowski, B. and Wilson, L.: The identification of prostaglandin F<sub>2</sub>α as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. Acta. Vet. Scand. Suppl., **77**: 77 - 88 (1981).

McCraken, J.A., Schams, W. and Okulicz, W.C.: Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF<sub>2</sub>α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy. Anim. Reprod. Sci., **7**: 31 - 55 (1984).

McKelvey, W.A.C., Robinson, J.J. and Aitken, R.P.: The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. Theriogenology, **24**: 519-535 (1985).

McKelvey, W.A.C., Robinson, J.J., Aitken, R.P. and Robertson, I.S.: Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. Theriogenology, **25**: 855-865 (1986).

McKelvey, W.A.C.: Laparoscopic artificial insemination and embryo transfer. Current status in the UK: new developments and associated research. Sheep Veterinary Society Proceedings of Meetings, **16**: 37-41 (1992).

McNatty, K.P., Gibb, M., Dobson, C., Ball, K., Custer, J., Heath, D. and Thurley, D.C.: Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. J. Reprod. Fertil., **65**: 111 - 123 (1982).

Mejía, V.O.: Efecto del líquido folicular equino en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1995).

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

Newman, A.: Development of follicles in the mammalian ovary. International Review of Ovology, **124**: 44 - 101 (1991).

Quirke, J.F.: Regulation of puberty and reproduction in female lambs: A review. Livestock Production Science, **8**: 37 - 53 (1981).

Quispe, G.T., Zarco, L., Valencia, J. and Ortíz, A.: Estrus synchronization with elengestrol acetate in cyclic ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. Theriogenology, **41**: 1385 - 1392 (1994).

Rainio, V.: PMSG-dose in Finnsheep embryo production. Theriogenology, **35**: 261 (1991).

Rival, M.D., Chenoweth, P.J. and McMicking, L.L.: Semen deposition and fertility in ovine artificial breeding programmes. In: Reproduction in sheep. Ed. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. 301-303 Cambridge University Press, Sidney, Australia, 1984.

Robinson, T.J., Wallace, J.M. and Aitken, R.P.: Fertilization and ovum recovery rates in superovulated ewes following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different times after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns. J. Reprod. Fertil., **87**: 771-782 (1989).

Ruttle, J., Lucero, S., Key, D., Daniels, M., Rodríguez, F. and Yim, H.S.: Ovine estrus synchronization and superovulation using norgestomet B and follicle stimulating hormone-pituitary. Theriogenology, **30**: 421 - 427 (1988).

Salamon, S. and Lightfoot, R.J.: Fertilization and embryonic loss in sheep after insemination with deep frozen semen. Nature, **216**: 194-195 (1967).

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C.: Frozen storage of ram semen. I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Reprod. Sci., **38**: 185 - 249 (1995).

Schiewe, M.C., Bush, M., Stuart, L.S., and Wildt, D.E.: Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. Theriogenology, **22**: 675-683 (1984).

Schiewe, M.C., Howard, J.G., Goodrowe, K.L., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F<sub>2α</sub> synchronization is compromised by premature luteal regression. Theriogenology, **34**: 3 (1990).

Scudamore, C.L., Robinson, J.J. and Aitken, R.P.: 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 (1991).

Scudamore, C.L., Robinson, J.J., Aitken, R.P. and Robertson, I.S.: The effect of method of oestrous synchronisation on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. Anim. Reprod. Sci., **34**: 127-133 (1993).

Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W. and Wilson, Jr.L.: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin  $F_2\alpha$  during luteolysis in ruminants. Biol. Reprod., **45**: 655 - 663 (1991).

Silvia, W.J., Raw, R.W., Aldrich, S.L. and Hayes, S.L.: Uterine secretion of prostaglandin  $F_2\alpha$  in response to oxytocin in ewes: Changes during the oestrus cycle and early pregnancy. Biol. Reprod., **85**: 11 - 15 (1992).

Silvia, W.J. and Raw, R.E.: Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin  $F_2\alpha$  from the ovine uterus by ovarian steroids. J. Reprod. Fertil., **98**: 341 - 347 (1993).

Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., James, R.W. and Tervit, H.R.: The application of progesterone-containing CIDR™ devices to superovulated ewes. Theriogenology, **33**: 1297 - 1305 (1990).

Trejo, A.: Control de la reproducción caprina en producción de caprinos. A.G.T., Editor S.A., México, 1986.

Triola, M.F.: Elementary Statistics. 3th ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, 1986.

Valencia, J.: La inseminación artificial en ovinos. En: Memorias Curso Actualización "Bases de la Cría Ovina". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia / Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Universidad Nacional Autónoma de México, Pachuca, Hidalgo, (1987).

Vallet, J.L., Lamming, G.E. and Batten, M.: Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. J. Reprod. Fertil., **90**: 625 - 634 (1991).

Walker, S.K. and Warnes, G.M.: Artificial insemination and transfer of embryos by laparoscopy. In Reproduction in Sheep. Edited by Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. 306 - 309. Cambridge Univ. Press, Sidney, Australia, 1984.

Walker, S.K., Smith, D.H. and Seamark, R.F.: Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. J. Reprod. Fertil., **77**: 135 - 142 (1986).

Walker, S.K., Smith, D.H., Frensham, A., Ashman, R.J. and Seamark, R.F.: The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. Theriogenology, **31**: 741-52 (1989).

Wollen, T.S., Schultz, R.H. and Newkirk, H.L.: Use and handling of drugs and biologicals in embryo transfer. *Theriogenology*, **23**: 31-43 (1985).

Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Quirke, J.F., Kindahl, H. and Bradford, G.: Release of prostaglandin  $F_2\alpha$  and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrus cycles of different lengths. *J. Reprod. Fertil.* **83**: 517 - 526 (1988).