



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

EFEECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE bST CINCO DÍAS ANTES DEL  
RETIRO DE LA ESPONJA DE FGA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO  
TEMPRANO DE OVEJAS SUPEROVULADAS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ARNULFO MONTERO PARDO**

TUTOR:

DR. JOEL HERNÁNDEZ CERÓN

COMITÉ TUTORAL:

DR. CARLOS F. ARÉCHIGA FLORES

DR. JAVIER J. VALENCIA MENDEZ

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

## DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

**Arnulfo Montero Pardo**

## **DEDICATORIAS**

### **A mis abuelos:**

Silvino, Emeria e Irinea por todas sus enseñanzas

### **A mis padres:**

M. Guadalupe Pardo e Isidro Montero Partida por todo su apoyo y por enseñarme que en la vida nada es imposible de lograr.

### **A mis hermanos:**

Xolyanetzin y Ulises por todo su cariño y apoyo

### **A mis hijos:**

Frida y Fernando por llenar de alegría mi vida

### **A mis amigos del Departamento de Reproducción:**

Carolina, Toño, Susana, Ana, Gissel, Memo, Beatriz, Brenda, Rosita, Stephanie, Mariana Paty, Abigail, Liliana, Omar, Gilberto, Cecilia, Tobebe, Alonso, Armando, Marcos.

### **A los profesores del Departamento de Reproducción:**

Dra. Páramo, Dr. Galina, Dr. Porras, Dr. Hernández, Dr. Perera, Dr. Balcazar, Dr. Gutiérrez, Dr. Zarco, Dra. Clarita, Dra. Rangel, Dr. Valencia.

### **A los profesores de la Universidad Autónoma de Sinaloa**

Dr. Leonardo Almeida y Dr. Juan José Gamboa por su valiosa ayuda

### **A mis amigos durante mis estudios de Maestría:**

Ubaldo, Alvaro, Christian, Miguel.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme lograr un gran sueño.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN222305.

A los miembros de mi comité tutorial, los doctores Joel Hernández Cerón, Carlos F. Aréchiga Flores y J. Javier Valencia Méndez. Gracias por la paciencia que me tuvieron durante la realización del proyecto. De igual manera, quiero agradecer a los doctores Carlos G. Gutiérrez Aguilar y Luis A. Zarco Quintero por las valiosas aportaciones al presente trabajo.

Al personal docente del CEIPSA, especialmente a la MVZ Miriam Ramírez por su apoyo, tiempo y conocimientos.

A Clara Murcia y Gerardo Perera, por el apoyo en las determinaciones hormonales.

A Susana Rojas y Ana D. Rodríguez, por el apoyo en el conteo celular de los embriones.

A Miriam, Ruth, Manuel, Stephanie y Ubaldo, por su apoyo en el manejo de los animales.

A Javier Hernández, por su apoyo en la colección embrionaria.

Después de escalar una montaña muy alta,  
descubrimos que hay muchas montañas por escalar.

**Nelson Mandela**

## CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN.....	I
DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	VIII
1.INTRODUCCION.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	2
2.1 Hipótesis.....	2
2.2 Objetivo.....	2
3 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1 Prolificidad.....	3
3.1.1 Tasa de ovulación.....	3
3.1.1.1 Desarrollo folicular.....	3
3.1.1.1.1 Crecimiento preantral .....	4
3.1.1.1.2 Crecimiento antral.....	5
3.1.1.2 Factores que determinan la tasa de ovulación.....	8
3.1.1.2.1 Genética.....	8
3.1.1.2.2 Edad de la hembra.....	8
3.1.1.2.3 Nutrición .....	9
3.1.1.3 Métodos utilizados para incrementar la tasa de ovulación.....	10
3.1.1.3.1 Métodos Nutricionales.....	10
3.1.1.3.2 Métodos Hormonales.....	12
3.1.1.3.3 Métodos Genéticos.....	16
3.1.2 Sobrevivencia embrionaria.....	16

3.1.2.1 Desarrollo embrionario temprano.....	16
3.1.2.2 Factores que afectan la sobrevivencia embrionaria.....	18
3.1.2.2.1 Genética.....	18
3.1.2.2.2 Edad de la hembra.....	19
3.1.2.2.3 Nutrición .....	19
3.1.2.2.4 Factores endocrinos.....	21
3.1.2.2.5 Tasa de ovulación.....	21
3.1.2.2.6 Tipo de ovulación.....	22
3.1.2.2.7 Temperatura.....	22
3.1.2.3 Función lútea y desarrollo embrionario.....	22
3.1.2.4 Mortalidad embrionaria.....	24
3.1.2.5 Estrategias para reducir la muerte embrionaria.....	26
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
4.1 Localización.....	29
4.2 Animales .....	29
4.3 Determinación del número de células de los embriones.....	31
4.4 Muestreo sanguíneo y determinaciones hormonales.....	31
4.5 Análisis estadístico.....	32
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSIÓN.....	39
7. LITERATURA CITADA.....	44

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema de superovulación, administración de bST, toma de muestras sanguíneas y colección de embriones en ovejas tratadas con 125 mg de somatotropina bovina (grupo bST) o con 1 ml de solución salina fisiologica (grupo testigo) 5 días antes del retiro de la esponja de FGA.	30
<b>Cuadro 1.</b> Estructuras totales, porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones transferibles y blastocistos de ovejas tratadas con somatotropina bovina cinco días antes del retiro de la esponja.	33
<b>Figura 2.</b> Número de células de los embriones en la etapa de blastocisto ( $\pm$ error estándar), en ovejas tratadas con o sin 125 mg de bST 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno.	34
<b>Figura 3.</b> Concentraciones plasmáticas de IGF-I ( $\pm$ error estándar), en ovejas tratadas ó no con 125 mg de bST (flecha) 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno.	35
<b>Figura 4.</b> Concentraciones plasmáticas de insulina ( $\pm$ error estándar), en ovejas tratadas ó no con 125 mg de bST (flecha) 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno.	36
<b>Figura 5.</b> Concentraciones plasmáticas de progesterona ( $\pm$ error estándar), en ovejas tratadas o no con 125 mg de bST 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno.	37
<b>Figura 6.</b> Concentraciones de progesterona durante el ciclo estral en una oveja con fase lútea normal.	38

**Figura 7.** Concentraciones de progesterona en una oveja con regresión prematura del cuerpo lúteo. 38

## RESUMEN

**Efecto de la administración de bST cinco días antes del retiro de la esponja de FGA en el desarrollo embrionario temprano de ovejas superovuladas.** Montero PA, Hernández-Cerón J, Aréchiga FCF, Valencia MJJ. Se probó la hipótesis de que la administración de bST incrementa las concentraciones plasmáticas de IGF-I, insulina y progesterona, mejorando el desarrollo de los embriones en ovejas superovuladas. Se sincronizó el estro de ovejas de la raza Pelibuey y Suffolk (n = 32), con esponjas con FGA y se superovularon con FSH. Cinco días antes de retirar el progestágeno, al grupo bST (n = 16) se le administró por vía subcutánea 125 mg de bST (Lactotropina<sup>®</sup>, Laboratorio Elanco). El grupo testigo (n = 16) recibió 1 ml de solución salina fisiológica en lugar de bST. Se detectó el estro cada 2 h y a las hembras se les dio monta con un semental de la misma raza cada 8 horas, mientras estuvieron receptivas. El día 6.5 del ciclo (día 0 = día de la monta) los embriones se colectaron mediante laparotomía media ventral. Los embriones se evaluaron mediante microscopía estereoscópica, se fijaron en paraformaldeído al 4 % en PBS y se determinó el número de células mediante la tinción con Hoechst 33342. En 8 animales de cada grupo se colectaron muestras de sangre a partir del día de la inyección de bST hasta el día de la colección embrionaria. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de IGF-I, insulina y progesterona. El porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones transferibles, en estado de mórula y blastocisto se compararon entre grupos mediante una regresión logística. El número de células teñidas de los embriones en estado de blastocistos se compararon entre grupos utilizando un Análisis de Varianza. Las concentraciones de IGF-I, insulina y progesterona se analizaron por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas por el procedimiento Mixed (REML) del paquete estadístico SAS (SAS, 1988). El porcentaje de óvulos fertilizados fue mayor ( $P < 0.001$ ) en el grupo bST (85.7) que en el grupo testigo (62.0), el porcentaje de embriones transferibles fue similar ( $P > 0.83$ ) en ambos grupos (bST = 88.5 vs testigo = 87.5); sin embargo, una proporción mayor ( $P < 0.001$ ) de los embriones alcanzó la etapa de blastocisto en las ovejas tratadas con bST (77.6) en comparación con las testigo (48.5), asimismo, los blastocistos de las ovejas del grupo bST tuvieron más células ( $88.9 \pm 3.7$ ) que los blastocistos del grupo testigo ( $76.1 \pm 3.7$ ) ( $P < 0.009$ ). Las concentraciones de IGF-I e insulina fueron más altas ( $P < 0.001$ ) en las ovejas que recibieron bST que en las ovejas del grupo testigo y las concentraciones de progesterona fueron similares entre grupos ( $P > 0.49$ ). Se concluye que la inyección de bST cinco días antes del retiro del progestágeno incrementó el porcentaje de óvulos fertilizados y la proporción de embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto, lo cual se asoció con un incremento de las concentraciones de IGF-I e insulina.

**Palabras clave:** Somatotropina, blastocistos, fertilización, ovejas, IGF-I, Insulina.

## ABSTRACT

**Effect of the treatment with bST five days before the end of progestin synchronization increases the proportion of blastocyst in the superovulated ewe.** Montero PA, Hernández-Cerón J, Aréchiga FCF, Valencia MJJ. In this study, we tested the hypothesis that a single dose of bST 5 days before the end of progestagen treatment increases the proportion of fertilized oocytes and embryo development in superovulated sheep. Thirty two Pelibuey and Suffolk sheep were used. Estrus was synchronised using vaginal sponges impregnated with FGA (Chronogest, Intervet, México) during 9 d and superovulation was performed with FSH. Five days before the end of progestagen treatment half of the sheep were injected with 125 mg bST (n = 16; Lactotropina<sup>®</sup>, Laboratorio Elanco) or saline solution (control; n = 16). Estrus was detected every 2 h and estrous ewes were mated with a fertile ram every 8 h whilst in estrus. Embryos were recovered on day 6.5 of the cycle (estrus = day 0) by mid-ventral laparotomy. Embryos were assessed microscopically and fixed in 4% paraformaldehyde. They were stained with Hoechst 33342 and their cells counted. In addition, blood samples were collected from 8 sheep per group, starting on the day of bST treatment and ending on the day of embryo recovery to determine IGF-I, insulin and progesterone plasma concentrations. Proportions of cleaved and transferable embryos in the morula and blastocyst stage were compared between groups by logistic regression. Cell number was analyzed by ANOVA and IGF-I, insulin and progesterone plasma concentrations by repeated measurements ANOVA. The proportion of cleavage was greater (P<0.001) in the bST (85.7%) than in the control group (62.0%) Percentage of transferable embryos were similar between females of the bST and control groups (P>0.83; bST = 88.5 vs control = 87.5). However, the proportion of embryos reaching the blastocyst stage (bST = 77.6% vs. control = 48.5%) and the number of cells within the embryos (bST = 88.9±3.7 vs. control = 76.1±3.7) were higher (P<0.01) in the bST treated sheep. Plasma concentrations of IGF-I and insulin were higher (P <0.001) in bST treated females. No differences were observed in progesterone concentrations (P>0.49) between groups of animals. It is concluded that bST treatment before the end of the progestagen treatment increases the proportion of fertilized ova and the rate of embryos reaching the blastocyst stage in the superovulated sheep. This response is associated with an increase in IGF-I and insulin concentrations

Key words: bST, blastocyst, cleavage, sheep, IGF-I, Insulin.

## 1. INTRODUCCIÓN

La muerte embrionaria temprana es la principal causa de las pérdidas de gestaciones en los animales domésticos. En la oveja se ha observado que entre el 20 y el 30% de los embriones mueren en los primeros 13 días postfertilización (Nancarrow, 1994). En los bovinos la administración de bST al momento de la inseminación ha favorecido la sobrevivencia embrionaria y el porcentaje de concepción (Moreira *et al.*, 2000; Morales-Roura *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004). Asimismo, en ovejas superovuladas el tratamiento con la hormona del crecimiento (bST) incrementa la proporción de embriones transferibles (Cognie *et al.*, 1992; Folch *et al.*, 2001) y aumenta la proporción de embriones en fases adelantadas de desarrollo al momento de la recolección (Rosas *et al.*, 1995). Recientemente, Carrillo *et al.* (2006) observaron que la administración de 125 mg de bST cinco días antes del retiro de una esponja impregnada con FGA, incrementó la prolificidad y la fertilidad en ovejas. El mecanismo de acción por el cual la bST mejora la fertilidad y prolificidad no es claro; sin embargo, las evidencias indican que puede estar relacionado con efectos directos de la hormona del crecimiento o indirectos, a través del IGF-I, sobre la maduración del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (De la Sota *et al.*, 1993; Morales-Roura *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002<sup>a</sup>). Así, en los bovinos la bST y el IGF-I aumentan la proporción de ovocitos fertilizados y el porcentaje de embriones que llegan a la etapa de blastocistos (Izadyar *et al.*, 1998<sup>a</sup>; Moreira *et al.*, 2002<sup>a</sup>, 2002<sup>b</sup>). Además, el IGF-I disminuye los efectos negativos de diversos factores ambientales sobre el desarrollo embrionario (Jousan *et al.*, 2004). Por otra parte, la insulina también favorece el desarrollo embrionario y aumenta la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto (Augustin *et al.*, 2003). En bovinos, después de la administración de bST se ha observa un incremento en las concentraciones de insulina (Gong *et al.*, 1993; Gulay *et al.*, 2004), por lo cual ésta hormona también puede estar influyendo en el mejoramiento de la fertilidad observada en animales tratados con bST.

Por lo anterior, el propósito del presente trabajo, fue evaluar el efecto de la inyección de bST 5 días antes del retiro de la esponja intravaginal con FGA sobre el desarrollo embrionario temprano de ovejas superovuladas

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

### **2.1 HIPÓTESIS**

- La administración de bST incrementa las concentraciones plasmáticas de IGF-I, insulina y progesterona, mejorando el desarrollo de los embriones en ovejas superovuladas.

### **2.2 OBJETIVO**

- Determinar si la administración de somatotropina cinco días antes del retiro de la esponja intravaginal con FGA incrementa las concentraciones plasmáticas de IGF-I, insulina, progesterona y mejora el desarrollo de los embriones en ovejas superovuladas.

## **3. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **3.1 PROLIFICIDAD**

La prolificidad o fecundidad se define como la capacidad de una población para producir descendencia numerosa y se puede expresar como el número de crías por parto o crías por hembra por año (Devendra y Burns, 1983). La prolificidad es uno de los principales parámetros que determina la eficiencia reproductiva en las empresas agropecuarias dedicadas a la producción de corderos. La prolificidad es determinada principalmente por la tasa de ovulación y la sobrevivencia embrionaria.

#### **3.1.1 TASA DE OVULACIÓN**

La tasa de ovulación se define como el número de ovulaciones que tienen un grupo de hembras en un determinado ciclo estral.

La oveja y la cabra se distinguen de los otros herbívoros domésticos, porque son capaces de tener ovulaciones múltiples. El aumento en la tasa de ovulación se relaciona con un incremento de la proporción de partos múltiples. En estudios realizados en ovejas se ha determinado que la prolificidad guarda una relación directa con la tasa de ovulación (Mahieu *et al.*, 2004), es decir, que las razas que tienen una tasa de ovulación alta también tienen una mayor prolificidad.

##### **3.1.1.1 DESARROLLO FOLICULAR**

El desarrollo folicular ó foliculogénesis es el proceso por medio del cual los folículos ováricos crecen y se desarrollan. Comienza con la formación de folículos primordiales que en algún momento de la vida reproductiva comenzarán a crecer hasta ovular, o bien, sufrirán atresia.

En rumiantes se ha estimado que la foliculogénesis dura entre 4 y 6 meses (Campbell *et al.*, 2003) y que sólo el 0.1-0.2% de los folículos presentes al nacimiento llegan a ovular (Webb *et al.*, 2003).

En los rumiantes, los folículos en diferentes etapas de desarrollo se encuentran alojados en la corteza ovárica. Los folículos primordiales son microscópicos, representan el estado más pequeño e inmaduro de los folículos. Están formados por una capa de células aplanadas que rodea al ovocito. Los folículos primordiales comienzan su desarrollo bajo el estímulo de diversos factores intraováricos y hormonales (McGee y Hsueh, 2000); las células aplanadas comienzan a dividirse y cambian morfológicamente para adquirir una forma cuboidal, dando origen al folículo primario. Las células cuboidales se multiplican formando dos o más capas, ésta estructura recibe el nombre de folículo secundario. En este estadio se comienza a observar una capa delgada translúcida de mucopolisacáridos que recubre al ovocito y recibe el nombre de zona pelúcida. El folículo terciario continúa su crecimiento y cuando llega al estado preovulatorio se conoce como folículo de Graaf. En pequeños rumiantes se ha estimado que, independientemente del estado fisiológico en que se encuentre el animal, en el ovario existen entre 12,000 y 86,000 folículos preantrales y entre 50 y 400 folículos antrales, de los cuales de 10 a 40 son visibles en la superficie ovárica (Rubianes, 2000).

Para su estudio, el desarrollo folicular se ha dividido en dos etapas: una independiente de gonadotropinas (basal) y otra dependiente de ellas (tónica). En la etapa basal se ha identificado un crecimiento lento que dura aproximadamente 130 días y un crecimiento rápido que dura entre 25 y 35 días, en el cual se forma el antro. La etapa tónica dura de 3 a 5 días y en ella el folículo madura completamente (Lindsay *et al.*, 1993).

#### **3.1.1.1.1 Crecimiento preantral**

El crecimiento preantral se define como el proceso que sufre un folículo desde que es primordial hasta que se forma el antro. Esta etapa ocupa la mayor parte de la foliculogénesis. Comienza con un reclutamiento inicial (McGee y Hsueh, 2000), en el cual los folículos primordiales que se encuentran detenidos en su desarrollo reciben algún tipo de señal y comienzan a crecer, mientras que el resto de los folículos permanece sin cambios. Se ha propuesto que esta señal consiste en un estímulo proporcionado por

hormonas metabólicas y/o factores intraováricos como la insulina, IGF-I, Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), Hormona anti-Mülleriana (AMH), Factor o Proteína Morfogénica Ósea (BMP-15), Factor de Crecimiento Diferenciante (GDF-9), Factor de Crecimiento Transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), activina, factor kit-C, factor Steel, estrógenos y andrógenos, entre otros (Fortune, 2003).

#### **3.1.1.1.2 Crecimiento antral**

Los folículos antrales están compuestos por tres capas diferentes de células: teca externa, teca interna y granulosa. La teca externa es tejido conectivo que rodea y da soporte al folículo. Las células de la teca interna se localizan inmediatamente después de la teca externa y bajo el estímulo de la LH producen andrógenos. Entre las células de la teca interna y de la granulosa existe una membrana basal. Las células de la granulosa responden al estímulo de la FSH y producen principalmente estrógenos e inhibina. Entre las células de la granulosa existe una cavidad llena de fluido. El crecimiento antral abarca desde la formación del antro hasta la ovulación o atresia.

Mediante el uso de ultrasonografía se ha logrado determinar que el crecimiento antral en rumiantes ocurre en forma de oleadas (Ginther y Kot, 1994). Las oleadas foliculares se presentan aún antes de la pubertad, en etapas tempranas de gestación, durante el anestro estacional y a lo largo del ciclo estral. En ovejas y cabras, las ondas foliculares emergen cada 4 ó 5 días y están compuestas por un grupo de folículos reclutados (cohorte) de aproximadamente 2 a 3 mm, de los cuales alguno(s) crecerá(n) hasta un diámetro de 4-7 mm de diámetro y ovularán, mientras que el resto sufrirá atresia (Bartlewski *et al.*, 1999).

Entre una ovulación y la siguiente pueden presentarse entre 2 y 5 ondas foliculares. El patrón predominante es de 3 ondas que emergen respectivamente alrededor de los días 0, 6 y 11 del ciclo estral ovino (Rubianes, 2000). Se han reportado algunos factores que afectan el número de ondas por ciclo. Durante la transición entre el anestro estacional y la estación reproductiva los ciclos interovulatorios son más largos o más cortos que lo normal y por lo tanto tienen más o menos ondas foliculares (Ginther *et al.*, 1995).

Existen cuatro etapas en el crecimiento antral: reclutamiento, selección, dominancia y atresia. La etapa de reclutamiento se caracteriza por un pico transitorio de FSH seguido de la emergencia de una cohorte de folículos (Webb *et al.*, 2003). El pico transitorio de

FSH estimula la proliferación celular de los folículos antrales pequeños, en los cuales se incrementa la expresión de las enzimas citocromo P450 SCC y citocromo P450 aromataasa (Garverick *et al.*, 2002).

En la etapa de selección, una parte de los folículos reclutados es seleccionada para continuar su desarrollo. Dos de las principales acciones de la FSH sobre las células de la granulosa son la inducción de la actividad de la aromataasa, que conlleva a un aumento en las concentraciones periféricas de estrógenos, y la inducción de receptores para LH (LHr), proceso necesario para el establecimiento de la dominancia (Garverick *et al.*, 2002).

Conforme los folículos seleccionados crecen, producen cantidades cada vez mayores de inhibina-A y estradiol, las cuales ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de FSH a nivel de la hipófisis (Bleach *et al.*, 2001). Simultáneamente, la expresión de LHr permite que los folículos en maduración reduzcan su dependencia a FSH y puedan responder a LH. Este mecanismo permite la maduración folicular en presencia de concentraciones bajas de FSH, las cuales no pueden soportar el desarrollo de los folículos subordinados debido a que estos últimos no poseen LHr. En ovejas, los folículos comienzan a mostrar LHr cuando miden aproximadamente 3.5 mm de diámetro (Campbell *et al.*, 2003).

Aún no está claro qué es lo que determina que un folículo se convierta en dominante o subordinado. Se ha propuesto que la adquisición de LHr en las células de la granulosa es lo que diferencia a los folículos dominantes de los subordinados (Bao *et al.*, 1997). También se ha observado que los folículos dominantes tienen un lecho vascular más grande por acción de factores angiogénicos como el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEFG), por lo que se ha propuesto que también tienen un suministro mayor de gonadotropinas con respecto a los folículos subordinados (Barboni *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha determinado un papel esencial de los componentes del sistema IGF en el establecimiento de la dominancia. De acuerdo con Nicholas *et al.* (2002), existe una mayor disponibilidad y acción de IGF-I en los folículos dominantes debido a que las concentraciones intrafoliculares de proteínas ligadoras de IGF (IGFBP-2, IGFBP-3 e IGFBP-4) son menores, lo que indica que la disponibilidad de IGF-I es más importante que su concentración folicular.

La atresia folicular se produce en la mayoría de los folículos inicialmente reclutados y ocurre mediante apoptosis de las células somáticas y del ovocito. Aunque se acepta que la atresia puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular, en estudios recientes se ha determinado que no se presenta con la misma intensidad en todos los estadios del desarrollo folicular. La mayoría de los folículos se vuelven atrésicos en la octava a novena generación de las células de la granulosa. Antes de este estado, los folículos pueden desarrollarse en presencia de cantidades basales de gonadotropinas, hormonas metabólicas y factores de crecimiento. Sin embargo, cuando los folículos alcanzan la octava a novena generación de las células de la granulosa, requieren que las concentraciones de tales hormonas y factores aumenten (Hirshfield, 1991). Al realizar estudios *in vitro*, se observó que el porcentaje de células de la granulosa en apoptosis disminuyó de 70 al 10% cuando se añadió FSH e IGF-I al medio de cultivo. Los resultados del estudio sugieren que la FSH incrementa el desarrollo de folículos medianos al suprimir la apoptosis de las células de la granulosa mediante un incremento en la producción de IGF-I (Yu *et al.*, 2003).

Estudios recientes han mostrado que tanto en el crecimiento preantral como en el antral existe un efecto sinérgico entre la acción de los factores de crecimiento y la de gonadotropinas, que modulan la sobrevivencia proliferación y diferenciación de las células foliculares, y aseguran el crecimiento de folículos pequeños al aumentar la mitosis de las células de la granulosa. El crecimiento preantral puede llevarse a cabo aún en ausencia de gonadotropinas (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha comprobado una disminución del reclutamiento inicial de folículos en ovejas hipofisectomizadas (Dufour *et al.*, 1979). Un modelo de desarrollo folicular propuesto por Zeleznik (2004) hipotetiza que la FSH estimula el desarrollo y/o reduce la atresia de folículos preantrales. Por otra parte, aunque el crecimiento antral es dependiente de las concentraciones de gonadotropinas, también se ha demostrado que es influido por la insulina y el IGF-I. La insulina y el IGF-I pueden actuar incrementando el crecimiento, la síntesis de estradiol y la respuesta a FSH en células de la granulosa de rumiantes y su ausencia incrementa la atresia folicular (Silva y Price, 2002).

### **3.1.1.2 FACTORES QUE DETERMINAN LA TASA DE OVULACIÓN**

#### **3.1.1.2.1 Genética**

La tasa de ovulación potencial se controla genéticamente en una determinada especie o raza, lo cual ha sido promovido por las adaptaciones fisiológicas al ambiente (Hunter *et al.*, 2004) y mutaciones (Juengel *et al.*, 2004).

El proceso de selección natural juega un papel importante en las características reproductivas de las diferentes razas. Mediante este proceso se fijan a través de los años, características que representan una ventaja para la sobrevivencia. Por otra parte, el proceso de adaptación a los diferentes ambientes ha propiciado que exista un rango muy amplio en la tasa de ovulación y la prolificidad en razas de ovinos y caprinos. En ovejas se han identificado algunas razas con tasa de ovulación alta. Estas razas se pueden dividir en dos grupos. En el primer grupo la selección folicular está determinada por la acción aditiva de diferentes genes, e incluye las razas Romanov y Finish Landrace, mientras que en el segundo grupo la tasa de ovulación está controlada por un sólo gen mayor, e incluye las razas Boorola, Inverdale y Hanna, entre otras (Lindsay and Pearce, 1984).

#### **3.1.1.2.2 Edad de la hembra**

En cualquier raza la tasa de ovulación y, por consiguiente, la prolificidad en las hembras primíparas es baja. Sin embargo, conforme alcanza la madurez, aumenta el número de crías. El pico en la tasa de ovulación y prolificidad es alcanzado cuando los animales tienen entre 3 y 6 años de edad y luego declina gradualmente (Jainudeen y Hafez, 1993). En un estudio realizado en ovejas Rambouillet, la tasa de ovulación fue de 1.08 para los animales de 2 años y de 1.66 para los de 5 (Schoenian y Burfening, 1990). La tasa de ovulación baja en animales jóvenes lo cual evita gestaciones múltiples cuando aún no se han desarrollado completamente y, de esta manera, disminuyen los riesgos que corren la madre y las crías. El incremento en la prolificidad en animales adultos puede deberse al incremento de la tasa de ovulación y/o a la disminución de las pérdidas prenatales.

### 3.1.1.2.3 Nutrición

A pesar de que el potencial de prolificidad se determina genéticamente, la tasa de ovulación y la prolificidad también son altamente afectadas por la nutrición. Los animales alimentados de manera óptima expresan su potencial genético, en cambio, aquellos con una nutrición deficiente no la manifiestan. Por ejemplo, la subalimentación retrasa la llegada a la pubertad en todas las especies y reduce la tasa de ovulación en cabras (Mani *et al.*, 1992). La tasa de ovulación se ha incrementado manipulando la alimentación en periodos críticos de crecimiento folicular. Por lo tanto, es posible incrementar el número de crías obtenidas por parto mediante la implementación de prácticas de alimentación adecuadas.

En ovejas y cabras la tasa de ovulación y el peso corporal se relacionan de manera estrecha. Se ha determinado que la nutrición influye en la tasa de ovulación mediante dos efectos: efecto estático y efecto dinámico (Coop, 1966). El efecto estático está dado por el peso corporal de la hembra al momento de la monta. Se ha observado que cuando las hembras no alcanzan un peso corporal mínimo, el potencial de la tasa de ovulación no es expresado. En contraparte, a medida que las hembras sobrepasan el peso corporal mínimo, la tasa de ovulación deja de aumentar de manera gradual, lo que indica que se ha alcanzado el potencial genético. El efecto dinámico es ejercido por el aumento del peso corporal durante el empadre debido a un nivel de alimentación alto (Lindsay *et al.*, 1993). Bajo esta situación, el aumento de peso corporal y la tasa de ovulación se correlacionan de manera positiva, es decir, a medida que aumenta el peso corporal, también lo hace la tasa de ovulación. Sin embargo, el mayor incremento de la tasa de ovulación se obtiene en animales de condición corporal moderada que se encuentran ganando peso al momento de la monta (Downing y Scaramuzzi, 1991). En estudios recientes se ha logrado reducir el flushing a periodos de 4-6 días (Gutiérrez *et al.*, 2000; Viñoles *et al.*, 2005), e incluso a una sola administración cuando se utilizan soluciones glucogénicas (Rodríguez Iglesias *et al.*, 1996; Martínez, 2004). Debido a esto, se ha propuesto que existe un efecto agudo de la nutrición sobre la tasa de ovulación (Lindsay *et al.*, 1993), el cual es mediado a nivel intraovárico por hormonas metabólicas y/o factores de crecimiento (Downing *et al.*, 1995<sup>a</sup>; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004).

### **3.1.1.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA INCREMENTAR LA TASA DE OVULACIÓN**

Con el incremento de la tasa ovulatoria se busca aprovechar la capacidad genética de la hembra para tener partos múltiples de manera fisiológica. Bajo condiciones de manejo óptimas, los pequeños rumiantes tienen la capacidad de criar de manera eficiente 2 o 3 crías. Sin embargo, los partos múltiples de más de 3 crías son indeseables debido a la alta mortalidad de las crías en los primeros días de vida. Por otra parte, el aumento de la tasa de ovulación también se ha utilizado para aprovechar el potencial genético de las hembras de alta productividad mediante transferencia embrionaria (Aguilar, 2006). Existen diversos métodos que permiten incrementar la tasa ovulatoria, entre los que destacan los nutricionales y hormonales.

#### **3.1.1.3.1 Métodos Nutricionales**

Aunque la suplementación de energía y proteína en la dieta incrementa la tasa de ovulación en ovejas (Abecia *et al.*, 1997), las infusiones intravenosas de glucosa también lo hacen (Downing *et al.*, 1995<sup>a</sup>), lo que indica que la energía es el principal componente de la dieta que determina la tasa de ovulación en pequeños rumiantes.

Un incremento en el suplemento de energía puede estimular el desarrollo folicular e incrementar la tasa de ovulación en ovejas (Downing *et al.*, 1995<sup>a</sup>). Este conocimiento ha sido utilizado de manera práctica, incrementando el aporte energético en la dieta durante periodos estratégicos para aumentar la tasa de ovulación, manejo conocido como flushing.

Se han utilizado diversos tratamientos de flushing en ovejas, como la sobrealimentación (Viñoles *et al.*, 2005), suplementación con grano de lupina (Downing *et al.*, 1995<sup>b</sup>), infusiones intravenosas de glucosa y glucosamina (Downing *et al.*, 1995<sup>a</sup>, Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004), infusiones intravenosas de aminoácidos de cadena ramificada (Downing *et al.*, 1995<sup>c</sup>) y la administración oral de soluciones glucogénicas (Gutiérrez *et al.*, 2000; Martínez, 2004)

El mecanismo por el cual el flushing incrementa la tasa de ovulación aún no se comprende completamente, ya que los estudios realizados en bovinos y ovinos, sugieren que el flushing no altera el patrón de secreción de gonadotropinas. Sin embargo, se asocia con un incremento en las concentraciones de glucosa (Gutiérrez *et al.*, 1997<sup>a</sup>, Downing *et*

*al.*, 1995<sup>a</sup>, Viñoles *et al.*, 2005). En un estudio realizado en ovejas cateterizadas en la vena ovárica se logró determinar que la glucosa es la principal fuente de energía para el ovario (Rabiee *et al.*, 1997), lo que sugiere que el incremento en el suministro de glucosa al ovario podría ser el estímulo que incrementa la tasa de ovulación.

La energía en la dieta estimula la esteroidogénesis en los folículos reclutados y seleccionados. Las ovejas sometidas a flushing presentan más folículos positivos a aromatasa y concentraciones mayores de estradiol (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002). También se ha observado que hay una mayor cantidad de folículos reclutados en los animales tratados (Viñoles *et al.*, 2005).

Una consecuencia fisiológica del incremento de los niveles de glucosa en la dieta es el incremento de la insulina circulante. Se ha propuesto que la respuesta al estímulo nutricional es mediada por el aumento de los niveles de insulina, el cual aumenta la utilización de glucosa a nivel ovárico, provocando un incremento de la tasa de ovulación (Downing *et al.*, 1995<sup>b</sup>). Algunos estudios han demostrado que los niveles mayores de glucosa e insulina en sangre se relacionan con una cantidad mayor de folículos capaces de responder a la acción de las gonadotropinas (Gutiérrez *et al.*, 1997<sup>a</sup>, Viñoles *et al.*, 2005). Asimismo, la glucosa y glucosamina estimulan la capacidad esteroidogénica de los folículos mediante un aumento en la actividad del IGF-I. Por otra parte, la insulina tiene un efecto mitogénico en las células de la granulosa (Gutiérrez, 1997<sup>b</sup>). Williams *et al.* (2001), proponen 3 mecanismos por medio de los cuales la glucosa e insulina pudieran afectar la función folicular 1) Los cambios en la disponibilidad de glucosa alteran la capacidad esteroidogénica de las células foliculares. 2) Alteración en la expresión de transportadores de glucosa en los tejidos ováricos (mediada por insulina), que incrementa la utilización de glucosa. 3) Los cambios de glucosa e insulina en la circulación llevan a un incremento en el consumo de glucosa, que altera la capacidad esteroidogénica y afecta la expresión de transportadores de glucosa.

La glucosa entra a las células por medio de una gran familia de transportadores de glucosa (GLUT-1 a GLUT-12). En ovarios de ovejas se han identificado GLUT-1 y GLUT-4 (Williams *et al.*, 2001). El GLUT-1 se localiza en la membrana plasmática y GLUT-4 se encuentra almacenado en vesículas intracitoplasmáticas de las células foliculares. Se ha observado que GLUT-1 promueve el uso de la glucosa a nivel basal, mientras que GLUT-4

permite la utilización de glucosa estimulada por la insulina mediante la translocación de las vesículas que lo contienen hacia la membrana plasmática de la célula, lo que resulta en un incremento en el transporte de glucosa de 10 a 20 veces más.

### **3.1.1.3.2 Métodos Hormonales**

#### **Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) y FSH**

La administración de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) y FSH son métodos empleados para incrementar la tasa de ovulación, ya que ambas hormonas promueven el desarrollo de los folículos medianos y grandes (Lindsay, 1991).

Debido a su bajo costo, la eCG es la gonadotropina más utilizada en los tratamientos de sincronización e inducción de estros en pequeños rumiantes. La aplicación de 300-400 UI de eCG en la parte final de un tratamiento con progestagenos para sincronizar estros, incrementa la tasa de ovulación y la prolificidad en ovejas (Boscos *et al.*, 2002) y cabras (Ahmed *et al.*, 1998). Asimismo, la administración de 1,000-1,500 UI de eCG induce una respuesta superovulatoria en ovejas y cabras (Trejo, 1986; Saharrea *et al.*, 1998). En las hembras superovuladas con eCG se observa una mayor proporción de animales con regresión prematura de cuerpos lúteos y una menor cantidad de embriones transferibles (Espinosa-Márquez *et al.*, 2004). La eCG es una hormona altamente glicosilada, lo que provoca que tenga una vida media larga. De esta manera, los efectos gonadotrópicos de la eCG se siguen produciendo aún después de la ovulación e inducen otro reclutamiento indeseable de folículos, los cuales producen concentraciones de estrógenos mayores a las concentraciones fisiológicas observadas en los primeros días de gestación, lo cual afecta adversamente el desarrollo de los embriones.

La FSH se utiliza menos, debido a su alto costo. Las dosis de FSH generalmente se expresan en miligramos Armour, que es una unidad de actividad de una prueba biológica equivalente a 10 a 14  $\mu\text{g}$  de FSH pura. Durante el tratamiento para sincronizar el estro, la aplicación de una sola dosis de aproximadamente 10 mg de FSH al retirar la fuente de progestágeno, es suficiente para promover el crecimiento de folículos antrales y garantizar de manera satisfactoria la fertilidad en el estro subsiguiente (Boscos *et al.*, 2002). Debido a la vida media corta de la FSH, se han desarrollado tratamientos de superovulación que

implican la administración de 6-8 dosis decrecientes, aplicadas a intervalos regulares, comenzando desde 72-24 h antes de retirar la fuente de progestágeno.

En ovejas tratadas con FSH hay una mayor eficiencia en la recuperación de embriones comparadas con aquellas tratadas con eCG (Chagas e Silva *et al.*, 2003), lo que se asocia a un menor número de folículos persistentes presentes al momento del lavado. Por lo tanto, se puede concluir que, la aplicación de FSH requiere de un mayor manejo en comparación con la aplicación de eCG, aunque se obtienen mejores resultados utilizando la primera.

### **Somatotropina**

La somatotropina bovina es una proteína lineal simple compuesta de 191 aminoácidos y producida por la hipófisis anterior (Grotsky 1979), con un peso molecular de 22 kDa. Su estructura cuaternaria esta formada por 4 hélices y desde el punto de vista funcional tiene 2 dominios, el somatogénico y el lactogénico (Van der Walt, 1994). Aunque existe especificidad de especie, se ha visto experimentalmente que las hormonas de crecimiento de algunas especies tienen actividad biológica en especies diferentes a la propia, como en el caso de la hormona bovina, que estimula el crecimiento en ratas y ovejas (Bernal 1990).

La somatotropina en forma general actúa sobre la síntesis de proteínas, incrementando la retención de nitrógeno y de fósforo en el organismo, aumentando el transporte de los aminoácidos hacia el interior de la célula y estimulando la síntesis de los ácidos nucleicos. Además, la hormona del crecimiento estimula la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo, lo que se traduce en la movilización de las reservas de grasa (McCutcheon and Bauman, 1986). Estimula también la gluconeogénesis en el hígado, aumentando el aporte de glucosa a la circulación y por lo tanto a las células, y finalmente ayuda a la retención de sodio, potasio, magnesio y cloro (Turner y Bagnara 1976).

Muchos de los efectos metabólicos de la somatotropina se llevan a cabo de manera directa, pero otros los realiza de manera indirecta a través de las somatomedinas, las cuales son producidas principalmente en el hígado, por estimulación de la somatotropina (Lucy, 2000).

Las somatomedinas o factores de crecimiento son proteínas de peso molecular menor a 30 kDa, las cuales actúan principalmente como hormonas parácrinas o autócrinas en diferentes tejidos (Davis *et al.*, 1994).

En los bovinos la mayor parte de los receptores para somatotropina bovina (bST) se encuentran localizados en el hígado, donde la unión de la bST con sus receptores induce la síntesis y secreción de factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF). Sin embargo, los IGF también se producen en el útero y los ovarios (Eckery *et al.*, 1997, De la Sota *et al.*, 1993). El tratamiento con GH recombinante (bST) en vacas no lactantes y lactantes en balance energético positivo resulta en mayores concentraciones de glucosa, insulina, colesterol, bST e IGF-1 en plasma, así como en un aumento en la producción láctea (Gong *et al.*, 1993<sup>a</sup>; Gulay *et al.*, 2004). Se sabe que la administración de bST en vacas altera la dinámica folicular. Por ejemplo, en vacas lactando, el tratamiento con bST durante la primera onda folicular provocó un aumento en el número de folículos de 6 a 9 mm (De la Sota *et al.*, 1993).

La aplicación de bST (320 mg) aumenta las concentraciones periféricas de GH dentro de las primeras 24 horas de la aplicación (Gong *et al.*, 1993<sup>a</sup>), y permanecen significativamente altas durante 7 días. El incremento en las concentraciones de GH es seguido a las pocas horas por un incremento en los niveles periféricos de IGF-I, los cuales se mantienen elevados hasta por 8 días (Gong *et al.*, 1993<sup>b</sup>). El incremento en el número de folículos pequeños se detecta aproximadamente 24 horas después del aumento en las concentraciones periféricas de GH, IGF e insulina (Gong *et al.*, 1993<sup>a</sup>). Se ha visto que el tratamiento con bST tiene un efecto sobre el número de folículos medianos y grandes presentes en cada onda folicular (De la Sota *et al.*, 1993). Con la finalidad de explorar el posible efecto de la bST sobre la foliculogénesis y la tasa de ovulación, Gong *et al.*, (1993<sup>b</sup>), aplicaron diariamente 25 mg de bST durante 2 ciclos estrales en vacas, y encontraron que el grupo tratado tuvo concentraciones más altas de GH e IGF-I que el testigo durante todo el tratamiento. También detectaron un aumento en la población de folículos antrales de 2 a 5 mm y asumieron que esto podría deberse directamente al aumento en las concentraciones de IGF-I, ya que el tratamiento con bST no tuvo efectos sobre las concentraciones de FSH, LH, progesterona o estradiol.

Tampoco puede descartarse un efecto directo de la somatotropina en el folículo, ya que los tratamientos con bST incrementan las concentraciones periféricas de GH durante todo el periodo de tratamiento (Gong *et al.*, 1991).

No se ha encontrado un aumento en la tasa ovulatoria en diferentes estudios en los que se ha administrado bST al momento de la inseminación en bovinos (Herrler *et al.*, 1994). Tampoco se encontraron efectos sobre la tasa ovulatoria en cabras tratadas con 100 mg de bST cinco o diez días antes del retiro de esponjas de acetato de fluorogestona (Domínguez *et al.*, 2001). En las ovejas poco se ha documentado acerca de los efectos que la aplicación de somatotropina tiene en la reproducción; en observaciones hechas en Nueva Zelanda se encontró que las ovejas a las que les fue administrada bST (5 mg) diariamente por 17 días, tuvieron mayores concentraciones de IGF-I, que se mantuvieron durante el periodo de tratamiento de bST, pero este incremento no tuvo relación con la tasa ovulatoria (Davis *et al.*, 1990). En otro estudio hecho en EEUU con ovejas sometidas a un esquema superovulatorio a las que se le administró bST (3 mg) diariamente por 13 días antes del estro, se observó que tampoco se mejoró la respuesta superovulatoria ni la tasa ovulatoria (Eckery *et al.*, 1994). En otro estudio en el cual se aplicó bST (12.5) diariamente por 7 días a partir del día 5 de la sincronización del estro, Gong *et al.*, (1996) encontró que el tratamiento mejoró significativamente el desarrollo de los folículos ováricos en estados dependientes de gonadotropinas (2.1 a 3.0 mm), lo que se asoció con un incremento en las concentraciones periféricas de IGF-I e insulina; sin embargo, tampoco encontraron un aumento en la tasa ovulatoria.

### **3.1.1.3.3 Métodos Genéticos**

Las razas actuales de ovejas y cabras han sido moldeadas por las adaptaciones fisiológicas a los cambios del ambiente y por la selección artificial a la que han sido sometidas, lo que ha ocasionado que los ecotipos se diversifiquen (Cueto *et al.*, 2006). Sin embargo, las características reproductivas como la tasa de ovulación y la prolificidad, se han basado en la selección artificial que el hombre ha realizado en las diferentes razas, lo que ha propiciado que dichas características sean mayores a las expresadas por sus antecesores silvestres.

El criterio de selección inicial para las hembras se basó en la prolificidad, cuya heredabilidad es de 0.16 (Gong y Webb, 1996). Sin embargo, los avances fueron lentos porque esta característica es únicamente estimable en hembras en edad reproductiva que han concebido y mantenido la gestación (Waldron y Thomas, 1992).

Posteriormente se determinó que la tasa de ovulación es la principal variable ligada a la variación genética en la prolificidad (Hanrahan, 2003). La selección con base en la tasa de ovulación ha tenido avances más rápidos porque la tasa de ovulación tiene una gran variabilidad genética y, además, puede ser determinada antes del parto y no depende de la concepción ni de la gestación exitosa (Waldron y Thomas, 1992). El rango de heredabilidad para la tasa de ovulación en ovejas va de 0.07 a 0.50, con una media de 0.29 (Lindsay, 1991). La identificación de genes mayores involucrados en la determinación de la tasa de ovulación ha permitido implementar estrategias de cruzamientos entre los portadores y los no portadores de dichos genes, dando como resultado un avance genético más rápido (Davis, 2005).

### **3.1.2 SOBREVIVENCIA EMBRIONARIA**

#### **3.1.2.1 Desarrollo embrionario temprano**

Después de su formación, el cigoto sufre una serie de divisiones mitóticas, proceso conocido como segmentación. La primera división genera un embrión de dos células, las cuales son llamadas blastómeros. Los blastómeros sufren divisiones subsiguientes dentro de la zona pelúcida, sin pasar por la fase de crecimiento en cada ciclo celular, lo que provoca que el embrión siga manteniendo su tamaño a pesar de tener cada vez un mayor número de células. Los blastómeros de las etapas de 2 a 8 células son totipotenciales, lo que significa que a partir de ellos se puede originar cualquier tipo de célula especializada. Por otra parte, el material genómico del embrión se expresa a partir de la etapa de 8 células (Crosby *et al.*, 1988), lo que quiere decir que antes de ese estado la síntesis de proteínas se lleva a cabo con el RNA materno y los ribosomas que provienen del ovocito.

Cuando los blastómeros ya no se pueden contar de manera precisa el embrión es llamado mórula. Las células de la mórula que ocupan la parte externa se compactan más

que las del centro y se comienzan a separar en dos poblaciones diferentes: células externas y células internas. El ambiente uterino juega un papel muy importante en este proceso. En estudios *in vitro* se ha observado que el aislamiento del embrión provoca trastornos en el establecimiento de ambas poblaciones celulares (Kaye y Gardner, 1999). Las células internas desarrollan uniones de hendidura que permiten la comunicación intercelular, mientras que las células externas desarrollan uniones tipo estrechas que alteran la permeabilidad celular. Las células externas de la mórula tienen una bomba activa de sodio, la cual bombea iones de sodio a la porción central. Conforme la fuerza iónica aumenta adentro, el agua difunde a través de la zona pelúcida, al interior del embrión y comienza a formar una cavidad llena de fluido (blastocele).

Cuando se detecta la presencia de una cavidad el embrión es denominado blastocisto. En el blastocisto se pueden reconocer dos tipos de células: la masa celular interna y el trofoblasto. La masa celular interna dará origen al embrión, mientras que el trofoblasto al corion. Conforme el blastocisto crece la zona pelúcida se comienza a debilitar. El crecimiento y la acumulación del fluido dentro del blastocisto, la producción de enzimas proteolíticas por las células del trofoblasto y las contracciones intermitentes del blastocisto, son factores que incrementan la presión y causan la ruptura de la zona pelúcida, proceso conocido como eclosión o liberación (Senger, 2003).

### **3.1.2.2 Factores que afectan la sobrevivencia embrionaria**

La sobrevivencia embrionaria es otro de los factores que determina la prolificidad. En ovejas se ha estimado que solo 70 a 80 % de los óvulos fertilizados llegan al término de la gestación, ocurriendo la mayor parte de las pérdidas embrionarias durante el primer mes (Hanrahan, 2003). La mayoría de los estudios sobre sobrevivencia embrionaria realizados en ovejas y cabras se basan en la diferencia individual existente entre la tasa de ovulación y el número de crías nacidas por hembra.

El desarrollo del embrión depende del potencial intrínseco de este y de un ambiente uterino adecuado. Dado que el embrión deriva de los gametos, los defectos en la formación o desarrollo tanto del ovocito como del espermatozoide pueden disminuir la sobrevivencia embrionaria. También es probable que ocurra una mortalidad embrionaria debido a defectos genéticos ocurridos durante etapas muy tempranas del desarrollo (Edey, 1969); sin

embargo, la mayor parte de las pérdidas embrionarias se debe a condiciones ambientales adversas.

Los principales factores que determinan la sobrevivencia embrionaria son: genéticos, edad de la hembra, nutrición, tasa de ovulación, tipo de ovulación, temperatura, tóxicos y enfermedades.

#### **3.1.2.2.1 Genética**

Los embriones genéticamente anormales contribuyen con una proporción constante de pérdidas prenatales. En diversos estudios realizados en ovejas se ha estimado que las pérdidas embrionarias por anomalías genéticas pueden alcanzar un porcentaje mayor al 15% (Nancarrow, 1994).

La variabilidad genética para la sobrevivencia embrionaria es muy baja en pequeños rumiantes. Sin embargo, existen algunas diferencias detectadas entre las diferentes razas, e incluso, entre las líneas de una misma raza. Se ha determinado que las ovejas Merino con baja tasa de ovulación son capaces de albergar una cantidad de embriones igual a la que albergan las ovejas con alta tasa de ovulación, sin que se incremente la mortalidad embrionaria (Bindon *et al.*, 1971). Por otra parte, el cruzamiento de razas prolíficas, como Finnish Landrace y Boorola, con ovejas menos prolíficas, tiene un efecto positivo en la capacidad uterina de las crías, lo que indica un efecto de cruzamiento (Meyer *et al.*, 1983).

Esto sugiere que las diferencias en sobrevivencia embrionaria, más que relacionarse con la tasa de ovulación, están relacionadas principalmente con la eficiencia uterina que existe entre las diferentes razas y sus cruces (Michels *et al.*, 1998).

#### **3.1.2.2.2 Edad de la hembra**

La edad de la hembra también influye en la sobrevivencia embrionaria. Se ha observado que las ovejas primíparas tienen más pérdidas embrionarias que las adultas. Al comparar las pérdidas embrionarias de ovejas primíparas y maduras con gestación simple, se observaron que estas fueron menores en las ovejas maduras (Kleemann y Walter, 2005). Se han realizado varios estudios en ovejas para explicar este comportamiento reproductivo. Lane *et al.* (1993) compararon el transporte y distribución de espermatozoides después de la inseminación artificial, en ovejas maduras y ovejas de primer y tercer estros. Ellos

recuperaron un porcentaje mayor de espermatozoides de la parte anterior del aparato reproductor de las ovejas maduras y ovejas de primer y tercer estro. Sin embargo, el transporte y distribución de los espermatozoides no parece ser uno de los factores limitantes que regulan la fertilidad en ovejas primíparas. La calidad de los embriones y el ambiente uterino en ovejas primíparas y maduras también han sido evaluados. Los resultados indican que los embriones de ovejas primíparas tienen un potencial intrínseco bajo para desarrollarse en el útero de ovejas primíparas y adultas. Por otra parte, también se han logrado determinar condiciones no óptimas en el útero de las ovejas jóvenes, las cuales tienen un efecto de deterioro sobre el embrión (Quirke y Hanrahan, 1977). Por lo tanto, se puede concluir que la menor sobrevivencia embrionaria en las hembras primíparas, se debe a que estas aún no han alcanzado la madurez plena de los sistemas que controlan la actividad reproductiva y, por tanto, son más susceptibles a padecer pérdidas embrionarias.

#### **3.1.2.2.3 Nutrición**

El metabolismo energético del embrión es bajo inicialmente, y depende de la fosforilación oxidativa para la generación de ATP. Durante el desarrollo temprano, el embrión muestra preferencia por el piruvato como fuente primaria de energía (Leese y Barton, 1984). El consumo de glucosa y su transformación a lactato es bajo en las primeras divisiones, pero se incrementa durante la etapa de mórula. El consumo celular de glucosa es facilitado por algunos transportadores. En embriones bovinos se ha detectado la presencia de RNAm que codifica para los transportadores de glucosa GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4 y GLUT-8 (Sinclair *et al.*, 2003). El GLUT-1 y GLUT-3 proveen de una captación basal de glucosa, mientras que el GLUT-4 y GLUT-8 proveen de una captación de glucosa estimulada por insulina. Por tanto, la insulina puede jugar un papel importante en el desarrollo embrionario temprano, regulando el consumo de glucosa. El incremento en los niveles de glucosa inducido por la dieta estimula la secreción materna de insulina. Varios estudios han demostrado un efecto positivo de la insulina sobre el desarrollo embrionario temprano. La adición de insulina al medio de cultivo incrementa la tasa de segmentación y la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto, y disminuye la cantidad de cuerpos apoptóticos en embriones de bovino (Byrne *et al.*, 2002; Augustin *et al.*, 2003). Se ha sugerido que la insulina actúa en los embriones como un factor de sobrevivencia,

bloqueando la apoptosis (Byrne *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha observado que las concentraciones altas de insulina e IGF-I desencadenan la apoptosis en embriones de ratón (Chi *et al.*, 2000), lo que sugiere que los efectos adversos de las altas concentraciones de insulina son provocados por la internalización de sus receptores, dando como resultado que se suprima la captación celular de glucosa estimulada por esta hormona.

Los efectos de la nutrición sobre el desarrollo embrionario temprano han sido abordados en innumerables investigaciones. Se ha observado que los extremos en el plano nutricional afectan de manera adversa el crecimiento y la sobrevivencia de los embriones en varias especies.

Los estados de desnutrición comprometen el crecimiento e incrementan las pérdidas embrionarias (Rhind *et al.*, 1989). Un bajo plano de nutrición puede retardar el desarrollo embrionario, comprometiendo la sobrevivencia del embrión en periodos críticos (Rhind *et al.*, 1989; Abecia *et al.*, 1997). Aparentemente, las ovejas jóvenes y viejas con condición corporal baja son más susceptibles a padecer pérdidas embrionarias. En cambio, las ovejas con buena condición corporal requieren de un periodo de desnutrición severo para sufrir una reducción en la sobrevivencia embrionaria (Nancarrow, 1994).

La sobrealimentación incrementa las pérdidas embrionarias. Este efecto se ha tratado de explicar en función del flujo sanguíneo hepático durante los periodos de sobrealimentación y la tasa de degradación de la progesterona circulante. Se ha observado que el flujo sanguíneo hepático aumenta en ovejas sobrealimentadas (Bensadoun y Reid, 1962). Parr *et al.* (1987) hipotetizaron que la disminución de la sobrevivencia embrionaria en hembras sobrealimentadas, es causada por los aumentos del flujo sanguíneo y la degradación hepática de la progesterona circulante. Otra posibilidad latente es que las altas concentraciones de glucosa e insulina provocadas por la sobrealimentación, sean tóxicas para el embrión (De Hertogh *et al.*, 1991; Chi *et al.*, 2000).

#### **3.1.2.2.4 Factores endocrinos**

Cuando la ovulación no ha sido precedida por un periodo de exposición a progesterona es frecuente que se formen cuerpos lúteos de corta duración, que entran en regresión después del día 4 (Hunter, 1991). Este fenómeno es conocido como regresión prematura del cuerpo lúteo. La regresión prematura del cuerpo lúteo se presenta de manera natural después de la

primera ovulación ya sea en la pubertad, estación reproductiva o postparto (Aréchiga-Flores *et al.*, 2004).. También es frecuente en tratamientos de inducción de la ovulación en los que se utiliza GnRH (Garverick *et al.*, 1992). La regresión prematura del cuerpo lúteo puede ser una causa de infertilidad en pequeños rumiantes.

#### **3.1.2.2.5 Tasa de ovulación**

La tasa de ovulación se relaciona de manera inversa con la sobrevivencia embrionaria. Existen evidencias que muestran que la oportunidad de que un embrión sobreviva, disminuye conforme la tasa de ovulación se incrementa. Los valores de sobrevivencia embrionaria estimados en ovejas con 1, 2 y 3 ovulaciones, fueron 81, 76 y 66 %, respectivamente (Kelly, 1984). Por otra parte, Kleemann y Walker (2005) observaron una sobrevivencia embrionaria de 83.4 y 56.2% para las ovejas con ovulaciones simples y dobles, respectivamente.

#### **3.1.2.2.6 Tipo de ovulación**

Tomando como criterio el sitio de ovulación, las ovulaciones se pueden clasificar como unilaterales o bilaterales. Las unilaterales se presentan cuando 2 o más ovulaciones ocurren en un solo ovario, mientras que en las bilaterales, las ovulaciones ocurren en ambos ovarios. En ovejas y cabras se ha observado que cuando ocurren ovulaciones unilaterales, existe migración transuterina de los embriones (Nephew *et al.*, 1992; Anwar y Ahmad, 1999). Mediante la migración transuterina, los embriones se distribuyen de manera equitativa dentro del útero. Edey (1969) propuso que la probabilidad de sobrevivencia es mayor en los embriones que no migran que en aquellos que si lo hacen. Las ovejas con ovulación bilateral tienden a mostrar valores de sobrevivencia embrionaria más altos (Scaramuzzi y Downing, 1997; Wilkins, 1997). Esto indica un riesgo ligero de muerte embrionaria durante la migración del embrión.

#### **3.1.2.2.7 Temperatura**

Las altas temperaturas al momento de la monta, afectan la fertilización y la sobrevivencia embrionaria. Se ha observado que los embriones en etapa de segmentación, son más sensibles a las altas temperaturas (Thwaites, 1967). También se observó que cuando el

estrés calórico se produce inmediatamente después de que ocurre la fertilización se incrementa la proporción de embriones anormales. El mecanismo por el cual el estrés calórico induce mortalidad embrionaria no está completamente comprendido. Sin embargo, en bovinos se ha observado una disminución del peso del embrión (Biggers *et al.*, 1987) y de la producción de IFN- $\tau$  en el día 17 (Putney *et al.*, 1988). Probablemente el tamaño pequeño de los embriones influya negativamente en su capacidad para producir las señales bioquímicas que previenen la lisis del cuerpo lúteo.

### **3.1.2.3 Función lútea y desarrollo embrionario**

Durante el desarrollo embrionario temprano la sobrevivencia del embrión depende de la función adecuada del cuerpo lúteo. Las hormonas que mantienen el crecimiento y/o funcionamiento del cuerpo lúteo son llamadas hormonas luteotrópicas e incluyen a la LH, GH, prolactina e IGF-I. En un estudio con ovejas hipofisectomizadas se observó que sólo cuando se reemplazaron la LH y GH, todos los parámetros de la función lútea aumentaron a niveles similares a los de las ovejas con hipófisis intacta. De esta manera, la LH y GH son necesarias para el desarrollo y funcionamiento lúteo en ovejas. También se sabe que las células lúteas chicas y grandes difieren en sus tasas basales de secreción de progesterona, ya que las células lúteas grandes (LLC) producen de 2 a 40 veces más progesterona que las células lúteas chicas (SLC) sin estimular. Las concentraciones fisiológicas de LH no aumentan la secreción de progesterona obtenida de LLC humanas, bovinas o porcinas. Sin embargo, esas células producen muy altos niveles basales de progesterona y se ha sugerido que el sistema PKA (proteína cinasa A) puede estar fundamentalmente activado en este tipo celular. Se ha calculado que las LLC producen >80 % de progesterona lútea total, secretada durante la fase lútea media del ciclo estral en la oveja. Los receptores para GH y el RNAm que codifica los receptores de GH han sido identificados en tejido lúteo de ovino, bovino y rata. La hormona de crecimiento puede tener un efecto directo sobre la función lútea a través de la unión a su receptor y por la activación de la tirosina cinasa asociada a membrana JAK2 (Janus Kinase 2), los receptores del IGF y la GH se han localizado en las LLC; así, la GH y el IGF-I pueden ser importantes para mantener los altos niveles basales de progesterona (Niswender *et al.*, 2000).

Se ha demostrado un mayor desarrollo en los embriones de ovejas tratadas con progesterona durante los primeros 3 días de gestación (Kleemann *et al.*, 1994). Este efecto

puede ocurrir por un estímulo en la secreción de las glándulas endometriales y un aumento en la expresión de factores de crecimiento y sus receptores en endometrio (Barnes, 2000). En ausencia de uniones anatómicas el desarrollo embrionario temprano depende de los nutrientes, hormonas y factores de crecimiento presentes en el medio uterino. Se ha observado que la progesterona altera la expresión en el endometrio de algunas proteínas del complejo IGF y del receptor de insulina. Así por ejemplo, la insulina e IGF-I modifican el metabolismo celular embrionario, incrementando la proliferación y la diferenciación celular (Kaye y Gardner, 1999). La insulina desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario temprano; en embriones bovinos cultivados *in vitro* ejerce un efecto mitogénico y antiapoptótico (Augustin *et al.*, 2003), lo que resulta en un aumento en la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto.

#### **3.1.2.4 Mortalidad embrionaria**

La muerte embrionaria es la principal causa de la pérdida de gestaciones en los animales domésticos. En la oveja se ha observado que 20 a 30% de los embriones mueren en los primeros 13 días post-fertilización, debido a factores genéticos y ambientales (Nancarrow, 1994).

Se ha visto una elevada mortalidad embrionaria entre la fertilización y el momento del reconocimiento materno de la gestación (Lamming *et al.*, 1989; Dunne *et al.*, 2000), por lo que en muchos casos el animal que estuvo gestante retorna al estro en un periodo equivalente a la longitud normal del ciclo estral, dando la apariencia de nunca haber estado gestante.

Se han descrito varias etapas críticas para el desarrollo y la sobrevivencia embrionaria. En cada una de ellas se han postulado posibles causas de falla, muchas de las cuales están relacionadas con alteraciones en la función lútea. Entre las causas que se han descrito se incluyen: Las alteraciones en el ritmo de elevación de las concentraciones de progesterona durante las etapas iniciales del ciclo estral, la deficiencia relativa de progesterona durante la fase lútea, el retraso en el desarrollo embrionario, la producción insuficiente de IFN- $\tau$  por parte del embrión y la regresión prematura del cuerpo lúteo. En muchos casos existe asociación entre dos o más de estas alteraciones, por lo que no es posible hacer una separación estricta de las diversas patologías. La deficiencia de progesterona está

involucrada en la mortalidad que se produce en diversos momentos de la gestación. Así, juega un papel en la mortalidad que se produce:

- antes del día 6 en animales que durante el ciclo previo tuvieron folículos persistentes.
- entre el día 4 y el día 9 debido a la regresión prematura del cuerpo lúteo por secreción anticipada de  $\text{PGF}_2\alpha$
- entre el día 14 y 19, por fallas en el reconocimiento materno de la gestación, que se asocian directa o indirectamente con deficiencias en la producción de progesterona durante la fase lútea temprana y tardía.
- entre el día 28 y 42 de gestación, a causa de fallas en la implantación y placentación, también asociadas con deficiencias en la producción de progesterona (Inskeep, 2004).

Durante el desarrollo embrionario temprano, la sobrevivencia del embrión depende de la función adecuada del cuerpo lúteo. Se ha demostrado un mayor desarrollo en los embriones de ovejas tratadas con progesterona durante los primeros 3 días de gestación (Kleemann *et al.*, 1994). Este efecto ocurre por un estímulo en la secreción de las glándulas endometriales y un aumento en la expresión de factores de crecimiento y sus receptores en endometrio (Barnes, 2000). En ausencia de uniones anatómicas, el desarrollo embrionario temprano depende de los nutrientes, hormonas y factores de crecimiento presentes en el medio uterino. Se ha observado que la progesterona altera la expresión en el endometrio de algunas proteínas del complejo IGF-I y del receptor de insulina. Así por ejemplo, la insulina e IGF-I modifican el metabolismo celular embrionario.

Las interacciones entre el útero materno y el producto en desarrollo son esenciales para lograr el desarrollo normal del blastocisto y una gestación exitosa (Zarco *et al.*, 1994). La familia de los factores de crecimiento parecidos a la insulina parece funcionar como mediadores clave del desarrollo coordinado del útero y del producto durante la gestación temprana, por virtud de su habilidad de influir, directa o indirectamente, en la síntesis y secreción de proteínas secretoras en el útero y en el producto. La acción autócrina y parácrina de los factores parecidos a la insulina son modulados dentro del microambiente uterino por los receptores tipo I para IGF y por las proteínas ligadoras de IGF (IGFBP'S), que están sujetas a una regulación local tanto en el útero como en el producto. La

comprensión del mecanismo por el cual los IGF's regulan la expresión de las señales del producto para el reconocimiento de la gestación puede proporcionar aplicaciones prácticas para incrementar la eficiencia reproductiva (Simmen *et al.*, 1993).

El embrión induce el reconocimiento materno de la gestación a través de la secreción de estrógenos en el cerdo, de proteína trofoblástica ovina I (oTP-1), proteína trofoblástica caprina I (cTP-1) en la cabra, y de proteína trofoblástica bovina I (bTP-1) en el bovino (Knickerbocker y Niswender, 1989; Ko *et al.*, 1991). Estas últimas moléculas son llamadas genéricamente Interferón  $\tau$  (IFN- $\tau$ ). El IFN- $\tau$  actúa como señal antiluteolítica permitiendo en el animal gestante que la función del cuerpo lúteo se mantenga más allá del momento en el que se produce la regresión lútea en los animales no gestantes (Zarco *et al.*, 1994). Los factores de crecimiento parecen ser muy importantes para la respuesta del útero a las señales embrionarias para el reconocimiento de la gestación (Simmen *et al.*, 1993).

Los genes para IGF-I e IGF-II se expresan fuertemente en el endometrio uterino de cerdas, vacas y ovejas ciclando y en gestación temprana, además de que el IGF-I e IGF-II están presentes en las secreciones uterinas de dichas especies durante el periodo de peri-implantación (Simmen *et al.*, 1993). En ovejas se encontró que el contenido de IGF-I en el fluido luminal uterino fue mayor en el día 14 de la gestación, que corresponde precisamente al nivel máximo de síntesis y secreción de la oTP-I de los embriones en etapa de alargamiento (Knickerbocker y Niswender, 1989; Ko *et al.*, 1991), y la secreción de oTP-I está correlacionada positivamente con el tamaño del producto y su morfología.

En el lumen uterino del ovino se ha demostrado la presencia de al menos dos factores mitogénicos distintos: IGF-I e IGF-II, cuya síntesis y secreción por el útero es regulada por el estado de la gestación y por las concentraciones de estrógenos y progesterona. Las células del endometrio y miometrio expresan receptores superficiales para IGF's y responden a los IGF's exógenos con un incremento en la mitosis (Ko *et al.*, 1991).

El oviducto y el útero contienen factores de crecimiento que pueden estimular la proliferación celular en el embrión y en algunos casos estimular la diferenciación de los embriones durante el periodo previo a la implantación (Izadyar *et al.*, 1997). Estos factores actúan en forma paracrina, uniéndose a receptores específicos en las células embrionarias. Además, el embrión por si mismo produce algunos factores del crecimiento autócrinos.

### 3.1.2.5 Estrategias para reducir la muerte embrionaria

Para tratar de incrementar la sobrevivencia de los embriones se han utilizado diversos tratamientos hormonales en determinados esquemas, tales como progesterona, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona del crecimiento (bST) e insulina. Por otro lado, también se han utilizado tratamientos nutricionales, a base de dietas o de soluciones energéticas.

La progesterona tiene un papel esencial en el desarrollo embrionario temprano. En vacas se ha demostrado que la aplicación de progesterona exógena durante los primeros 4 días del ciclo acelera el crecimiento y desarrollo embrionario y disminuye la mortalidad (Geisert *et al.*, 1991). La administración de progesterona durante los primeros 3 días de gestación también acelera el desarrollo embrionario en ovejas (Kleemann *et al.*, 1994), mientras que las concentraciones bajas de progesterona se asocian con un desarrollo embrionario retardado (Nephew *et al.*, 1991).

En la vaca se han utilizado diversos tratamientos hormonales, como son dispositivos impregnados con progesterona (CIDR), con el fin de incrementar las concentraciones de esta hormona y mejorar el porcentaje de concepción (Mann, 2001). Por otro lado, la aplicación de GnRH y hCG al momento de la inseminación artificial tienen la finalidad de tratar de sincronizar el momento de la ovulación con el de la inseminación y mejorar el desarrollo del cuerpo lúteo. Por otra parte, la aplicación de GnRH y hCG en los días 5 o 6 postinseminación, provoca la ovulación del folículo dominante de la primera onda folicular y con ello, el desarrollo de un cuerpo lúteo accesorio (Hernández-Cerón y Morales, 2001).

En ovejas se ha observado que la administración de hCG y GnRH el día 12 postmonta, disminuye la mortalidad embrionaria por un incremento en la función lútea (Cam *et al.*, 2002). También se ha observado que las ovejas tratadas tienen mayores tasas de ovulación y proporción de gestaciones múltiples (Cam y Kuran, 2004), mientras que los embriones muestran un mayor desarrollo y secretan cantidades mayores de IFN- $\tau$  (Nephew *et al.*, 1991).

Actualmente se sabe que la insulina juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario. Por medio de la alimentación se ha tratado de incrementar su concentración durante los primeros días de gestación. Así por ejemplo, la administración oral de propilenglicol incrementa las concentraciones de insulina en vacas lecheras durante el

periodo posparto (Miyoshi *et al.*, 2001). Este aumento de insulina se asoció con una mayor duración de la fase lútea. En estudios *in vitro* se ha visto que la adición de insulina favorece el desarrollo de los embriones a la etapa de blastocisto y reduce la cantidad de células apoptóticas (Augustin *et al.*, 2003).

En bovinos se ha encontrado que el tratamiento con bST al momento de la inseminación artificial (IA) aumenta el porcentaje de concepción en vacas sincronizadas a primer servicio y en vacas repetidoras (Morales-Roura *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2000, 2001<sup>a</sup>; Hernández-Cerón *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2004). Así, la inyección de bST incrementa la producción de IGF-I por el hígado y genera grandes concentraciones de IGF-I en la sangre periférica y en el fluido folicular; por si misma o a través del IGF-I, influyen en el desarrollo folicular (Lucy , 2000; Gong *et al.*, 1993<sup>a</sup>; De la Sota *et al.*, 1993), favorecen la maduración del ovocito (Izadyar *et al.*, 1998<sup>b</sup>; Moreira *et al.*, 2002<sup>a</sup>) y el desarrollo embrionario temprano (Moreira *et al.*, 2001<sup>b</sup>, 2002<sup>a</sup>, 2002<sup>b</sup>). Además, el IGF-I actúa como un factor de sobrevivencia embrionaria cuando el embrión es afectado por un microambiente anormal. Así la administración de IGF-I disminuye la proporción de células apoptóticas (Jousan *et al.*, 2004, Jousan y Hansen, 2004; Kölle *et al.*, 2002; 2003). También la bST puede mejorar la sobrevivencia embrionaria a través de mejoramiento de la función lútea (Lucy *et al.*, 1993; 1995; Morales-Roura *et al.*, 2001); sin embargo, los resultados acerca del papel de la progesterona son contradictorios.

En ovejas a través del tratamiento con bST se ha visto un incremento en la proporción de embriones transferibles (Cognie *et al.*, 1992; Folch *et al.*, 2001) y un aumento en la proporción de embriones en fases adelantadas de desarrollo al momento de la colección (Rosas *et al.*, 1995). Recientemente (Carrillo *et al.*, 2006), observó que la administración de 125 mg de bST cinco días antes del retiro de la esponja de FGA, incrementó la prolificidad en ovejas Pelibuey.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 Localización**

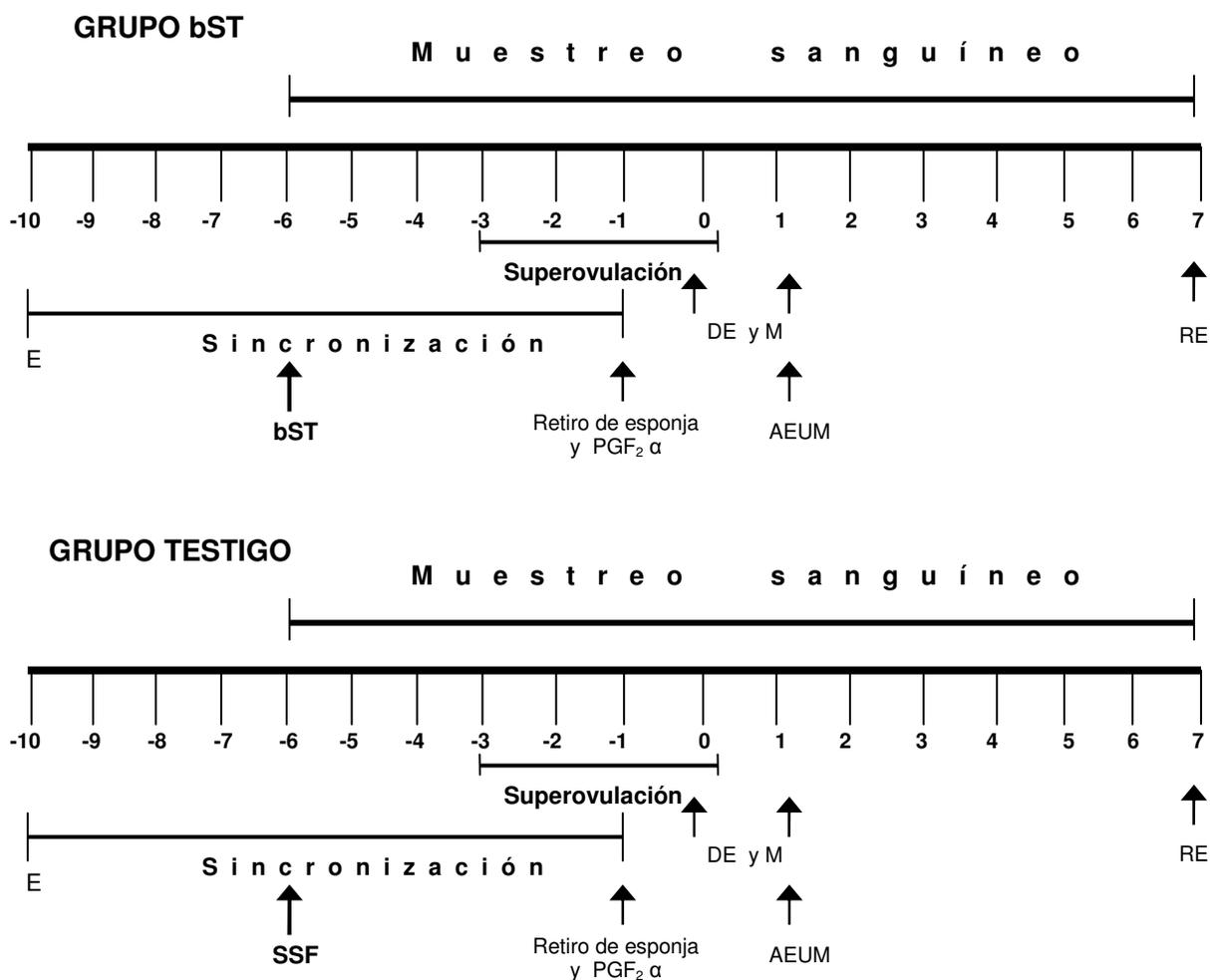
El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El CEPIPSA se encuentra ubicado en Topilejo, DF. Localizado en el km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° latitud oeste, a una altura de 2,760 msnm. El clima de la región es tipo c(w) (w)b(ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200 mm (García, 1981).

### **4.2 Animales**

Se utilizaron 32 ovejas ciclando de las razas Pelibuey y Suffolk, las cuales permanecieron en estabulación y se alojaron en corrales dotados de suficiente espacio y comederos, una fuente permanente de agua de bebida, misma dieta y la condición corporal fue de 2.5 a 3.5.

Se sincronizó el estro con esponjas intravaginales impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest, Intervet, México), las cuales permanecieron 9 días antes de ser retiradas. En el día 2 antes del retiro de la esponja las ovejas se superovularon con FSH-p, la cual se administró cada 12 h en dosis decrecientes con una dosis total de 200 mg (Folltropin-V®, Laboratorio Biotay). Cinco días antes de retirar la esponja de FGA, al grupo bST (n = 16) se les administró por vía subcutánea 125 mg de bST (Lactotropina, Monsanto, México). El grupo testigo (n = 16) recibió 1 ml de solución salina fisiológica en lugar de la bST. Al retiro de la esponja todas las hembras recibieron una aplicación de 0.075 mg de D-cloprostenol, análogo de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (Prosolvin, Intervet, México). La detección de estros se realizó cada 2 h con carneros cubiertos con un mandil y a las hembras que presentaban estro se les dio monta dirigida con un semental de la misma raza cada 8 horas, mientras estuvieron receptivas. Doce horas después de la última monta se les colocó una esponja intravaginal con 40 mg de acetato de fluorogestona (Espinosa, 1998) para evitar los efectos negativos de la regresión lútea prematura, en caso de que ocurriera. El día de la primera monta se consideró como el día cero. El día 6.5 del ciclo los embriones se colectaron mediante laparotomía media ventral (Espinosa, 1998). Las estructuras

recuperadas se calificaron con base a los criterios de la International Embryo Transfer Society (IETS). Posterior a su evaluación, los embriones se fijaron en paraformaldeído al 4 % en PBS durante 30 minutos y se conservaron en PBS/PVP a 4°C.



**Figura 1.** Esquema de superovulación, administración de bST, toma de muestras sanguíneas y colección de embriones en ovejas tratadas con 125 mg de somatotropina bovina (grupo bST) o con 1 ml de solución salina fisiológica (grupo testigo) 5 días antes del retiro de la esponja de FGA. E= Esponja intravaginal, SSF= solución salina fisiológica, DEyM= Detección de estro y monta, AEUM= Aplicación de esponja 12 h después de la última monta, RE= Recolección de embriones.

### **4.3 Determinación del número de células de los embriones**

Después de la colección los embriones se lavaron 3 veces en gotas de 50  $\mu$ l en solución salina fosfato-buferada (PBS; 10 mM de fosfato de potasio, NaCl 1.5 M, pH 7.4) y 1 mg/ml polivinil pirrolidona (PBS/PVP) dejándolos durante 2 minutos en cada gota; después se fijaron en gotas de 50  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los embriones de nuevo se lavaron 3 veces en gotas de 50  $\mu$ l PBS/PVP, pasándolos gota por gota, y se almacenaron en solución PBS/PVP a 4°C hasta el día de la tinción.

Previo a la tinción, los embriones se lavaron en gotas de 50  $\mu$ l de PBS/PVP, pasándolos gota por gota. Posteriormente se depositaron en una gota de 50  $\mu$ l de Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz y después se lavaron 3 veces en PBS/PVP. Los embriones se transfirieron a portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y se secaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se puso el cubreobjetos con medio de montaje DABCO (Fluka;10981). El conteo celular se realizó en un microscopio de fluorescencia, con aumentos de 10x y 40x y en un rango de excitación de 360 nm con filtro UV.

### **4.4 Muestreo sanguíneo y determinaciones hormonales**

Para determinar las concentraciones de IGF-I, insulina y progesterona, se colectaron muestras de sangre de 8 ovejas del grupo bST (4 Pelibuey y 4 Suffolk) y 8 ovejas del grupo control (4 Pelibuey y 4 Suffolk). El muestreo se realizó diariamente a partir de la inyección de bST (día -6) hasta el día de la colección (día 7). Las muestras se obtuvieron por venopunción de la vena yugular, en tubos vacutainer de 7 ml con EDTA, agujas Venoject, una vez obtenida la sangre los tubos se centrifugaron a 1500g/15 min. (Fisher, Scientific Centrifric™ U.S.A), el plasma obtenido se depositó en alícuotas y se almacenó a -20°C para su posterior análisis en el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

. Las concentraciones de IGF-I se cuantificaron por ensayo inmunorradiométrico (DSL-2800 kit, Diagnostic Systems Laboratorios Inc., Houston, TX; León *et al.*, 2004) con una sensibilidad del ensayo de 2.06 ng/ml y un coeficiente de variación intra-ensayo de 8.7%. Progesterona se determinó por radioinmunoanálisis en fase sólida, se empleó el kit

Coat-A-Count® Progesterone (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A; Pulido *et al.*, 1991), con una sensibilidad del ensayo de 0.1 ng/ml y un coeficiente de variación intra-ensayo de 4.12%. Insulina, con el kit Coat-A- Count ® Insulin (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A.; León *et al.*, 2004), con una sensibilidad de 0.064 ng/ml y un coeficiente de variación intra-ensayo de 9.54%, respectivamente.

#### **4.5 Análisis estadístico**

El porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones transferibles y blastocistos se compararon entre grupos mediante una regresión logística. El número de células teñidas de los blastocistos se compararon entre grupos utilizando un Análisis de Varianza. Las concentraciones de IGF-I, insulina y progesterona se analizaron por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas por el procedimiento Mixed (REML) del paquete estadístico SAS (SAS, 1988).

## 5. RESULTADOS

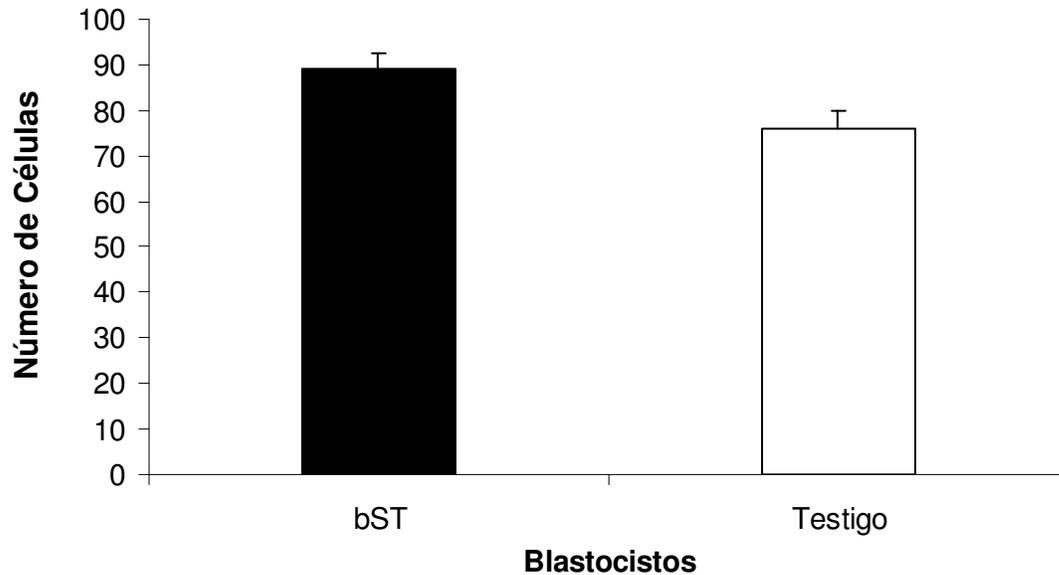
El tratamiento con bST incrementó ( $P<0.001$ ) el porcentaje de óvulos fertilizados y la proporción de embriones en estado de blastocisto ( $P<0.001$ ) en comparación con las testigo. (Cuadro1).

**Cuadro 1.** Estructuras totales, porcentaje de ovocitos fertilizados, embriones transferibles y blastocistos de ovejas tratadas o no con somatotropina bovina cinco días antes del retiro de la esponja.

	Estructuras Totales	Ovocitos Fertilizados (%)	Embriones Transferibles (%)	Blastocistos (%)
<b>bST</b>	112	85.7 <sup>a</sup>	88.5 <sup>a</sup>	77.6 <sup>a</sup>
<b>Testigo</b>	129	62.0 <sup>b</sup>	87.5 <sup>a</sup>	48.5 <sup>b</sup>

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística ( $P<0.001$ ).

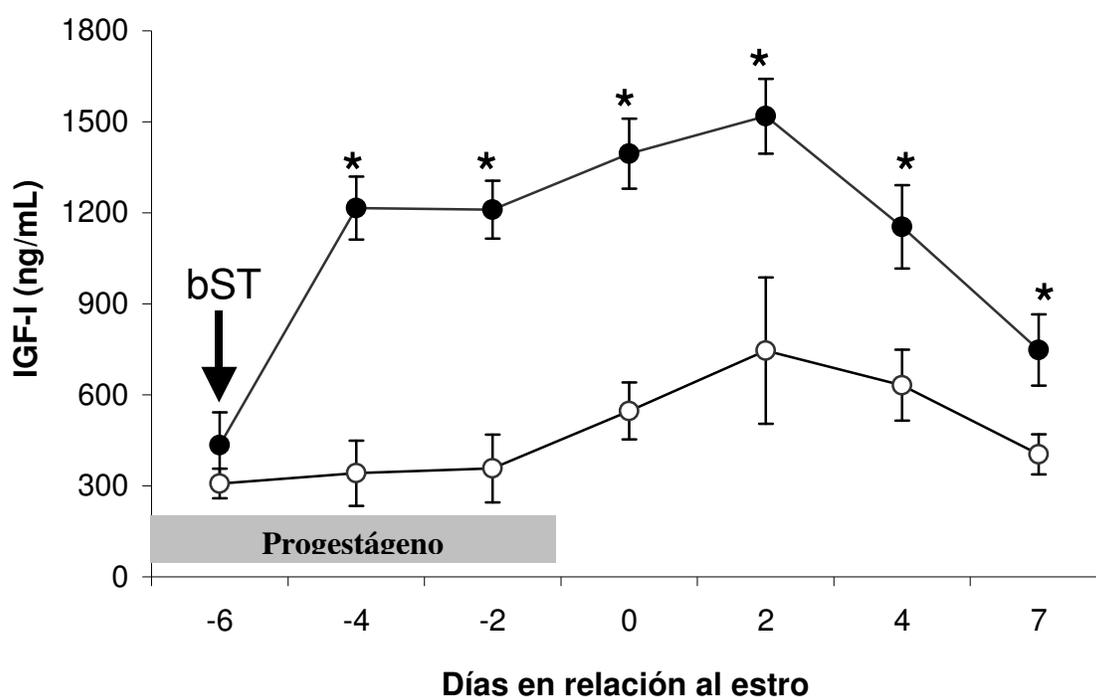
El tratamiento con bST incrementó ( $P < 0.009$ ) el número de células de los embriones en la etapa de blastocistos (grupo bST  $88.9 \pm 3.7$  y  $76.1 \pm 3.7$  grupo testigo) (Figura 2).



**Figura 2.** Número de células de los embriones en la etapa de blastocisto ( $\pm$  error estándar), en ovejas tratadas con o sin 125 mg de bST 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno. El número de células fue diferente entre grupos ( $P < 0.009$ ).

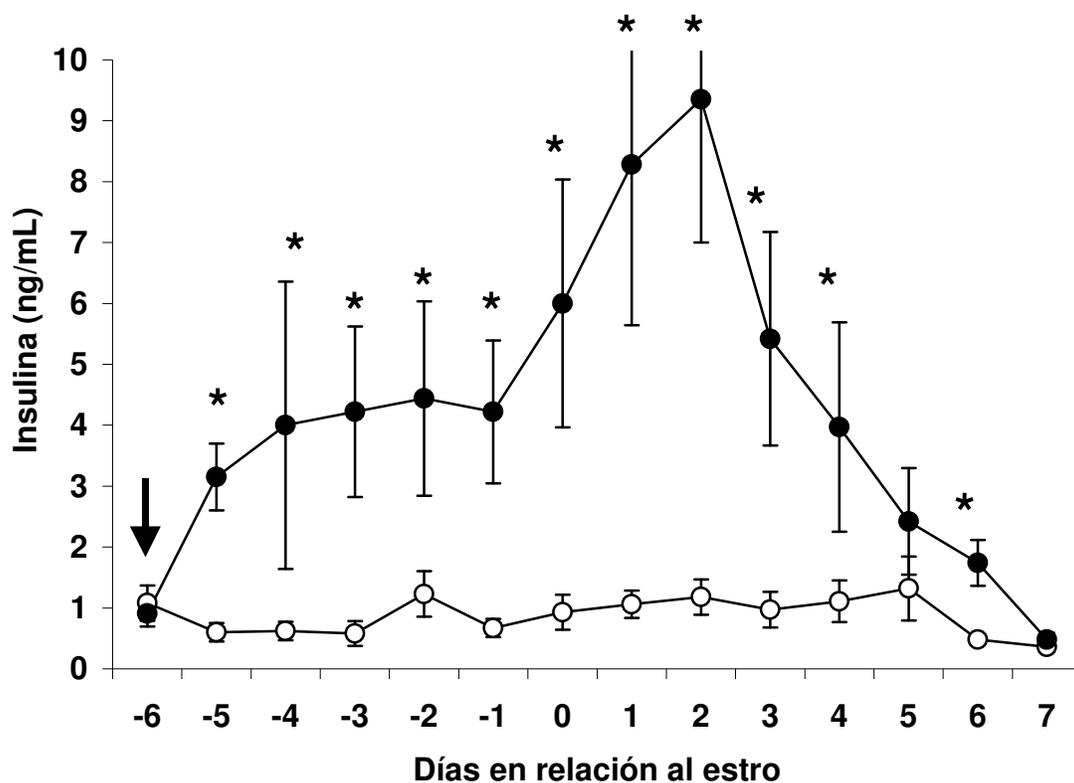
### Concentraciones sanguíneas de IGF-I, insulina y progesterona

Las concentraciones de IGF-I se incrementaron en las ovejas del grupo bST 24 h después del tratamiento y permanecieron altas durante 13 días posteriores al tratamiento (Fig.3). Mientras que en el grupo testigo hubo un aumento en IGF-I alrededor del estro (día cero), las cuales se mantuvieron altas hasta el día 4.



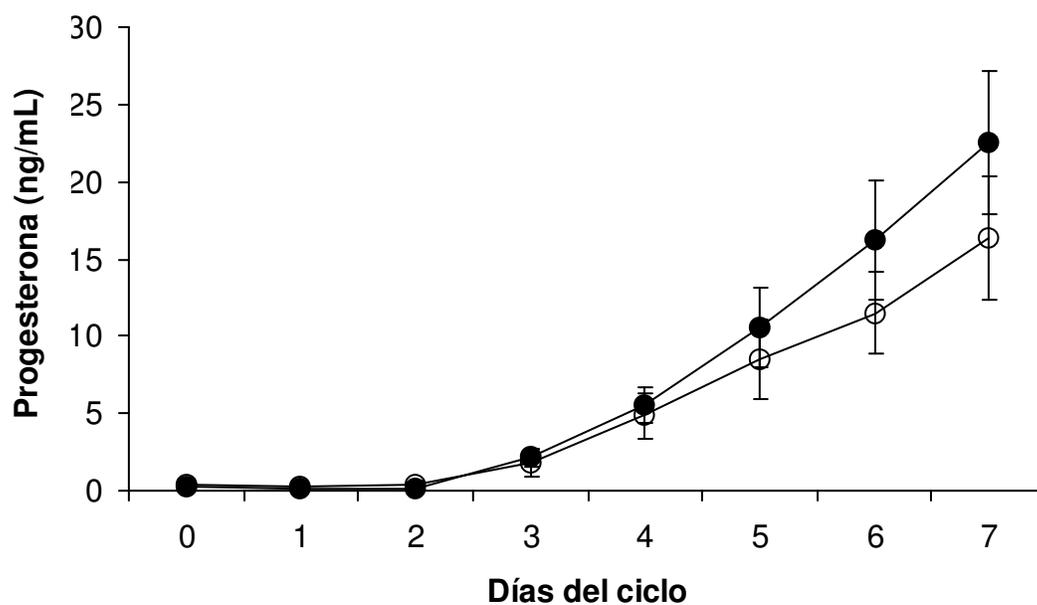
**Figura 3.** Concentraciones plasmáticas de IGF-I ( $\pm$  error estándar), en ovejas tratadas (-●-) o no (-○-) con 125 mg de bST (flecha) 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno. Las concentraciones de IGF-I fueron diferentes entre grupos en los días marcados con \* ( $P < 0.001$ ). El día 0 corresponde al día del estro

Las concentraciones de insulina se incrementaron en las ovejas del grupo bST 24 h después del tratamiento y alrededor del estro hubo otro aumento, permaneciendo altas hasta el día 4 (Fig. 4).



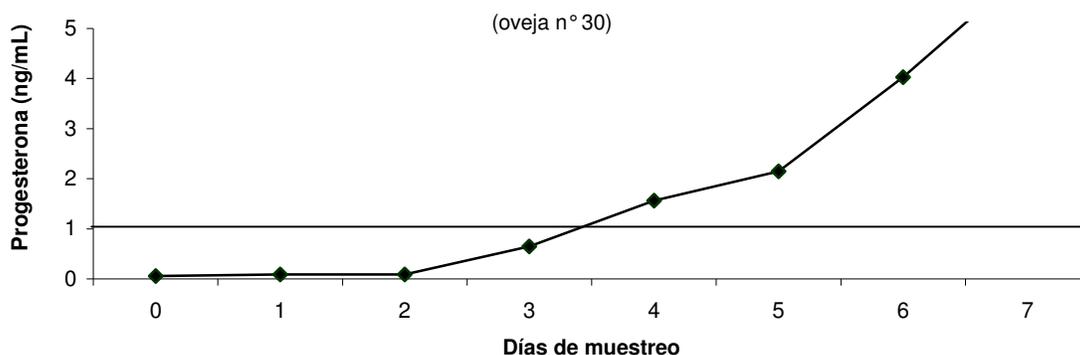
**Figura 4.** Concentraciones plasmáticas de insulina ( $\pm$  error estándar), en ovejas tratadas (-●-) o no (-○-) con 125 mg de bST (flecha) 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno. Las concentraciones de insulina fueron diferentes entre grupos en los días marcados con \* ( $P < 0.001$ ). (El día 0 corresponde al día del estro).

Las concentraciones de progesterona fueron similares entre grupos durante los días de muestreo ( $P>0.498$ ). Dos ovejas del grupo testigo presentaron regresión prematura de cuerpo lúteo, por lo que no fueron incluidas en el análisis estadístico de progesterona (Fig.5).

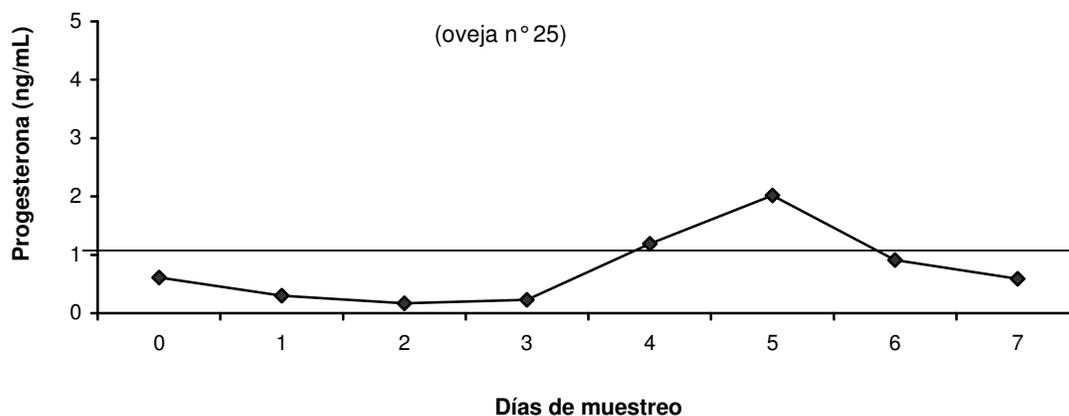


**Figura 5.** Concentraciones plasmáticas de progesterona ( $\pm$  error estándar), en ovejas tratadas (-●-) o no (-○-) con 125 mg de bST 5 días antes de retiro de la esponja con progestágeno. Las concentraciones de progesterona fueron similares entre grupos ( $P>0.498$ ).

En la figura 6 se muestran las concentraciones de progesterona en una oveja con función lútea normal, donde a partir del día 4 del ciclo estral tuvo niveles por arriba de 1 nanogramo por mililitro y en la figura 7 las concentraciones en una oveja con regresión prematura del cuerpo lúteo, ya que en el día 4 presentó niveles por arriba de 1 nanogramo, pero a partir del día 6 estuvo por abajo de este valor.



**Figura 6.-** Concentraciones de progesterona durante el ciclo estral en una oveja con fase lútea normal.



**Figura 7.-** Concentraciones de progesterona en una oveja con regresión prematura del cuerpo lúteo.

## 6. DISCUSIÓN

El tratamiento con bST cinco días antes del retiro de la esponja de FGA incrementó el porcentaje de ovocitos fertilizados y la proporción de embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto, lo cual coincidió con un incremento de las concentraciones de IGF-I e Insulina durante el periodo periovulatorio. El mecanismo por el cual el tratamiento con bST aumentó el porcentaje de ovocitos fertilizados y la proporción de blastocistos no es claro; sin embargo puede estar relacionado con los efectos fisiológicos que tienen la hormona del crecimiento, el IGF-I y la insulina en el desarrollo folicular, en la maduración del ovocito y en el desarrollo embrionario temprano.

En el presente estudio, las concentraciones de IGF-I e insulina se incrementaron en las siguientes 24 h después del tratamiento y se mantuvieron elevadas hasta el día previo a la colección embrionaria en el caso de insulina y hasta el día de la colección para IGF-I. Aunque no se midieron las concentraciones de GH se asume que estas fueron elevadas debido a que las ovejas la recibieron exógenamente. En estudios con vaquillas se ha observado que la GH se incrementa 24 h después del tratamiento y permanece alta por 7 días (Gong et al., 1993). El incremento en las concentraciones de IGF-I e insulina coincide con las observaciones realizadas en bovinos y ovinos. Así, en ovejas a las cuales se les administró una sola inyección de 125 mg de bST, mantuvieron niveles altos de IGF-I durante 12 días. Asimismo, en ovejas tratadas con dosis diarias de bST, muestran un incremento de insulina (Joyce et al., 1998). Por otra parte, en bovinos la administración de 350 mg de bST cada 14 días incrementa las concentraciones de IGF-I e insulina (Gallo y Block., 1990).

El incremento de la GH, IGF-I e insulina pudo favorecer la maduración del folículo ovulatorio y del ovocito. Se conoce que la insulina estimula la proliferación de las células de la granulosa y la esteroidogénesis, por lo cual puede favorecer la maduración del ovocito (Zhang *et al.*, 1991; Matsui *et al.*, 1995<sup>a</sup> ; Lee *et al.*, 2005). El IGF-I estimula *in vivo* el desarrollo folicular y la secreción de estradiol (Scaramuzzi *et al.*, 1999) e *in vitro* favorece la maduración del ovocito (Lorenzo *et al.*, 1994; Rieger *et al.*, 1998).

En bovinos se ha observado que la adición de GH al medio de cultivo *in vitro*, favorece la maduración del ovocito e incrementa la proporción de embriones que llega a dividirse; asimismo, se ha visto que puede actuar a través de las células del cumulus o directamente en el ovocito desnudo, debido a que se ha identificado el receptor para la GH en ambas células (Izadyar *et al.*, 1998<sup>a</sup>). En estudios *in vivo* se ha observado que la administración de bST al momento de la inseminación en vacas lecheras (Moreira *et al.*, 2002<sup>b</sup>) y en ovejas (Rosas *et al.*, 1995), incrementa la proporción de ovocitos fertilizados. En este estudio, el tratamiento con bST pudo influir en el desarrollo final del folículo ovulatorio y en la maduración del ovocito, dando como resultado un ovocito con mayores posibilidades para ser fertilizado y con mayor potencial para desarrollar un embrión viable.

Debido a que en el presente estudio los niveles de IGF-I e insulina se mantuvieron elevados durante el periodo posovulatorio, es posible que hayan favorecido el desarrollo embrionario temprano. El efecto de la bST en el embrión puede ser directo o mediado por IGF-I e insulina, ya que el embrión posee receptores para estas hormonas (Watson *et al.*, 1999; Izadyar *et al.*, 2000; Augustin., *et al.*, 2003). Se ha observado que el tratamiento con bST, tanto en ovejas como en vacas superovuladas, incrementa la proporción de embriones transferibles (Cognié *et al.*, 1992; Folch *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002<sup>b</sup>). *In vitro* la adición de GH, IGF-I e insulina incrementa la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocistos (Moreira *et al.*, 2002<sup>a</sup>; Augustin., *et al.*, 2003). Asimismo, el IGF-I y la insulina favorecen el desarrollo embrionario a través de su efecto mitogénico y antiapoptótico en las células embrionarias (Byrne *et al.*, 2002; Augustin *et al.*, 2003).

En el presente estudio el número de células fue mayor en los blastocistos de las ovejas tratadas con bST que en las testigo ( $88.9 \pm 3.7$  y  $76.1 \pm 3.7$ ), y estos resultados coinciden con lo encontrado en otros trabajos, en los cuales la adición de IGF-I (Sirisathien *et al.*, 2003) o insulina (Harvey y Kaye.,1990; Matsui *et al.*,1995<sup>c</sup>; Augustin *et al.*, 2003) al medio de cultivo aumentó el número de células en los embriones.

En un estudio realizado en embriones bovinos, Sirisathien *et al.*, (2003) observaron que el efecto mitogénico del IGF-I fue mayor en la masa celular interna (ICM) que en las células del trofoblasto. Asimismo, en estudios con embriones de ratones, la adición

de insulina al medio de cultivo tuvo mayor efecto mitogénico en las células de la masa celular interna (Harvey y Kaye., 1990).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias en la proporción de embriones transferibles; lo cual contrasta con lo encontrado en otros estudios (Cognié *et al.*, 1992; Folch *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002<sup>b</sup>), en los cuales el tratamiento con bST a vacas y ovejas superovuladas, incrementó el porcentaje de embriones transferibles. Sin embargo, la proporción de embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto fue mayor en las ovejas tratadas con bST que en las testigos. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, en los cuales el tratamiento con bST al momento del estro en ovejas superovuladas incrementó la proporción de embriones en fases adelantadas de desarrollo (Rosas *et al.*, 1995) y el mismo tratamiento en la vaca aumentó la proporción de blastocistos (Moreira *et al.*, 2002<sup>b</sup>).

El efecto del tratamiento con bST pudo favorecer el desarrollo embrionario, al evitar efectos adversos del ambiente uterino. Jousan *et al.* (2004), observaron que el IGF-I protege al embrión contra factores tóxicos presentes en el medio de cultivo. En este estudio la adición de IGF-I al medio redujo el efecto negativo del etanol y del estrés calórico en el desarrollo embrionario; de esta forma, el IGF-I puede actuar como un factor de sobrevivencia embrionaria. Por otra parte, el estímulo en el desarrollo embrionario puede favorecer el reconocimiento materno de la gestación, ya que el IGF-I estimula directamente la secreción de interferón- $\tau$  por el embrión (Ko *et al.*, 1991). De esta forma, el tratamiento con bST y el subsiguiente incremento del IGF-I, pudiera favorecer la fertilidad al estimular el desarrollo embrionario y su habilidad para secretar interferón- $\tau$ .

Los resultados del presente experimento pueden explicar, en parte, las observaciones hechas por Carrillo *et al.*, (2006), en las cuales las ovejas que recibieron la bST cinco días antes del retiro del progestágeno, tuvieron un incremento de la fertilidad y la prolificidad. Así como los resultados obtenidos en cabras primíparas, en las cuales un tratamiento similar incrementó la prolificidad. Así, es posible que los niveles altos de GH, IGF-I e insulina influyeran en el porcentaje de fertilización y en la sobrevivencia embrionaria, y por otra parte, el estadio adelantado del desarrollo embrionario pudo favorecer el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación.

Los resultados del presente experimento también pueden explicar, en parte, las observaciones hechas en bovinos, en donde el tratamiento con bST al momento de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas lecheras repetidoras (Hernández-Cerón *et al.*, 2001; Morales-Roura *et al.*, 2001).

En estudios previos se ha propuesto que la bST puede favorecer la fertilidad a través de su efecto en la función del cuerpo lúteo (Morales-Roura *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004). Hay evidencia que la somatotropina y el IGF-I mejoran la función lútea. In vitro, el IGF-I estimula la producción de progesterona por el tejido lúteo (Sauerwein *et al.*, 1992) in vivo, se ha observado un incremento en las concentraciones de progesterona después del tratamiento con bST (Gallo y Block, 1991; Lucy *et al.*, 1994; Morales-Roura *et al.*, 2001). En el presente estudio, sin embargo, las concentraciones de progesterona fueron similares entre ovejas tratadas con bST y testigos, por lo cual se puede afirmar que el mejoramiento del desarrollo embrionario fue independiente de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo.

Un dato interesante es que en el grupo testigo 2 de las 8 (25%) ovejas muestreadas presentaron regresión prematura del cuerpo lúteo, mientras que ninguna lo hizo en el grupo tratado con bST. Estas observaciones, coinciden con lo observado por Rosas *et al.*, (1995) donde 40% de las ovejas mostraron cuerpos lúteos de vida corta, mientras que en el grupo que recibió bST no se encontró ningún caso. El mecanismo de este efecto se desconoce, sin embargo, se puede especular que esta relacionado con el efecto que tiene la bST y el IGF-I en la función lútea, señalados anteriormente. También puede estar asociado con el efecto del IGF-I en el desarrollo folicular. Así, se ha observado que la regresión prematura obedece a una liberación anticipada de la PGF2 $\alpha$  como consecuencia de la aparición prematura de receptores a oxitocina en el endometrio (Hunter *et al.*, 1989; Hernández, 1996). Se ha propuesto que las características del folículo ovulatorio influyen en la aparición temprana de receptores a oxitocina del siguiente ciclo; así, cuando los folículos producen menos estrógenos los receptores a oxitocina aparecen prematuramente y, por el contrario, cuando el folículo es más estrogénico los receptores aparecen tardíamente (Garverick *et al.*, 1992).

Tomando lo anterior en conjunto, es posible que el IGF-I favoreció el desarrollo y la esteroidogénesis de los folículos ovulatorios, lo cual evitó la aparición temprana de

receptores a oxitocina. Se tendrán que hacer más experimentos para determinar el efecto de la bST en la función del cuerpo lúteo formado después de la primera ovulación posparto, de la pubertad y de la época reproductiva, ya que son condiciones diferentes a lo que ocurre después de un tratamiento superovulatorio.

## **CONCLUSIONES**

La inyección de bST cinco días antes del retiro del progestágeno incrementó el porcentaje de óvulos fertilizados y la proporción de embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto, lo cual se asoció con un incremento de las concentraciones de IGF-I e insulina.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abecia JA, Lozano JM, Forcada F, Zarazaga L. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eighth of pregnancy in Raza Aragonesa ewes. *Anim Reprod Sci* 1997; 48:209-218.
- Aguilar MCU. Evaluación de la administración del glicerol por vía oral en la tasa de ovulación y prolificidad en cabras (Tesis de Maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2006.
- Ahmed MM, Malawi SE, Jubara AS. Synchronization of oestrus in Nubian goats. *Small Rumin Res* 1998;30:113-120.
- Anwar M, Ahmad KM. Ovulate rate, number of fetuses and embryo loss in Teddy goats of Pakistan. *Small Rumin Res* 1999;31:281-283.
- Aréchiga-Flores CF, Bañuelos-Valenzuela R, Rincón-Delgado M, Meza HCA. Attainment of puberty in winter-born hair-ewe lambs under natural photoperiod (22° NL): preliminary results. *Wool Tech Sheep Breed* 2004;52(1):35-42.
- Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 2003;126:91-99.
- Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 1997; 56:1158-1168.
- Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000;63:858-864.
- Barnes FL. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 2000;53:649-658.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz, Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrus cycle in breeds of sheep differing in the prolificacy. *J Reprod Fertil* 1999; 115:111-124.

- Bensadoun A, Reid JT. Estimation of rate of portal blood flow in ruminants; effects of feeding, fasting and anesthesia. *J Dairy Sci* 1962;45:540-543.
- Bernal SG. Avances en producción de leche: La somatotropina. *Vet Méx XXI* 1990;4:409-414.
- Biggers BG, Geisert RD, Wettemann RP, Buchanan DS. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J Anim Sci* 1987;64:1512-1518.
- Bindon BM, Ch'ang TS, Turner HN. Ovarian response to gonadotrophin by Merino ewes selected for fecundity. *Aust J Agric Res* 1971;22:809-820.
- Bleach EC, Glencross RG, Feist SA, Groome NP, Knight PG. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotrophins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol Reprod* 2001;64:743-752.
- Boscós CM, Samarti FC, Dellis S, Rogge A, Stefanakis A, Krambovitis E. Use of progestagen-gonadotropin treatment in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology* 2002;58:1261-1272.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 2002;62:489-495.
- Cam MA, Kuran M, Yildiz S, Selcuk E. Fetal growth and reproductive performance in ewes administered GnRH agonist on day 12 post-mating. *Anim Reprod Sci* 2002;72:73-82.
- Cam MA y Kuran M. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Anim Reprod Sci* 2004;80:81-90.
- Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Masters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT. Domestic ruminants as model for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction* 2003;61 Suppl:429-443.
- Carrillo F, Orozco, V, Hernández JA, Gutiérrez CG, Hernández Cerón J. A single dose of bovine somatotropin five days before the end of progestin synchronization improves prolificity in sheep. *Anim Reprod Sci* 2006 (in Press).

- Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Cidadão R, Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles, ovulate rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding season. *Theriogenology* 2003;60:521-532.
- Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-I receptor. *Endocrinology* 2000;141:4784-4792.
- Cognie Y, Poullin N, Guérin Y, Martinat N. Administration of exogenous growth hormone in early follicular phase enhances embryo production in sheep. 12<sup>th</sup> Inter. Cong on Anim Reprod 1992;785-787.
- Coop IE. Effect of flushing in reproductive performance of ewes. *J Agric Sci* 1966;67:305.
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 1988;82:769-775.
- Cueto M, Gibbons A, Alberio R, Taddeo H, Gonzalez-Bulnes A. Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. *Anim Reprod Sci* 2006;91:275-284.
- Davis SR, Smith JF, Gluckman PD. Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod Fertil Dev* 1990;2:173-178.
- Davis JS, May JV, Keel BA. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1994;45:1351-1380.
- Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 2005;37 Suppl 1:S11-S23.
- De Hertogh R, Vanderheyden I, Pamfer S, Robin D, Dufrasne E, Delcourt J. Estimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocyst development *in vitro*. *Diabetes* 1991;40:641-647.
- De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1993;76:1002-1013.
- Devendra C, Burns M. Reproductive performance. In: Devendra C, Burns M, Editors. *Goat production in the tropics*. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983:74-89.
- Dominguez Y, Hernández J, Rodriguez A, Gutiérrez CG. Efecto de la inyección de 100 mg de bST 5 y 10 días antes del retiro de la esponja de FGA sobre la tasa ovulatoria y la

- fertilidad en cabras. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría; 2001 agosto 16-18; Veracruz (Ver) México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C., 2001:240.
- Downing JA, Scaramuzzi RJ. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fertil* 1991; 43 Suppl 1:209-227.
- Downing JA, Scaramuzzi RJ. Ovulate rate and concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* 1995<sup>a</sup>; 146:403-410.
- Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil* 1995<sup>b</sup>; 103:137-145.
- Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. A mixture of the branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine increases ovulation rate in ewes when infused during the late luteal phase of the oestrus cycle: an effect that may be mediated by insulin. *J Endocrinol* 1995<sup>c</sup>;145:315-323.
- Dufour J, Cahill LP, Mauleon P. Short and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J Reprod Fertil* 1979; 57:301-309.
- Dunne LD, Disken MG, Streenan JM. Embryo and foetal loss in beef heifers between d 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 2000;58:39.
- Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod* 1997;57:507-513.
- Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR. Recombinant bovine somatotropin does not improve superovulatory response in sheep. *J Anim Sci* 1994;72:2425-2430.
- Edey TN. Prenatal mortality in sheep: a review. *Anim Breed Abstr* 1969;37:173-190.
- Espinosa AF. Administración posmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. (Tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.

- Espinosa-Márquez MC, Valencia J, Zarco L, Escobar-Medina FJ, Colina-Flores F, Arechiga-Flores CF. Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG superovulated goats with premature luteal regression. *Theriogenology* 2004;62:624-630.
- Espinoza-Villavicencio JL, Ortega Pérez R, Palacios Espinosa A, Valencia Méndez J, Aréchiga-Flores CF. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia* 2007;32(2):93-99.
- Folch J, Ramón JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 2001;55:1777-1785.
- Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003;78:135-163.
- Gallo GF, Block E. Effects of recombinant bovine somatotropin on nutrition status and liver function of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1990;73:3276-3286.
- García, ME. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kooppen. México (DF) Universidad Nacional Autónoma de México. 1981.
- Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci* 1992;28:111-124.
- Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Weeb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002; 123:651-661.
- Geisert RD, Fox TC, Morgan GL, Wells ME, Wettmann RP, Zavy MT. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. *J Reprod Fertil* 1991;92:475-482.
- Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 1994;42:987-1001.
- Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 1995;43:689-703.

- Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol of Reprod* 1991;45:941-949.
- Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J of Reprod and Fertil* 1993<sup>a</sup>;97:247-254.
- Gong JG, Bramley TA, Wilmut I, Webb R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol Reprod* 1993<sup>b</sup>;48:1141-1149.
- Gong JG, Campbell BK, Bramley, Webb R. Treatment with recombinant bovine somatotrophin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin-like growth factor-I by ovarian follicles in ewes. *Anim Reprod Sci* 1996;41:13-26.
- Gong JG, Webb R. Control of ovarian follicle development in domestic ruminants: its manipulation to increase ovulation rate and improve reproductive performance. *Anim Breed Abstr* 1996;64:195-204.
- Grodsky MG. Chemistry and functions of the hormones: II Pituitary and hypothalamus. In *Review of Physiological Chemistry*. Edited by: Harper, HA, Rodwell, VW., Mayes, PA., 556-568. Large Medical Publications. Los Altos, California (1979).
- Gulay MS, Hayen MJ, Liboni M, Belloso TI, Wilcox CJ, Head HH. Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation improves milk yield, efficiency of production and other physiological responses of Holstein cows. *J Dairy Sci* 2004;87:948-960.
- Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J Anim Sci* 1997<sup>a</sup>;75:1876-1884.
- Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. development of a long-term bovine granulose cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod* 1997<sup>b</sup>; 56:608-616.

- Gutiérrez CG, Saharrea A, Palacios T, Alvarez J, Aguilera I, López N. The effect of short-term administration of a glycogenic solution on plasma glucose concentrations and ovulate rate in Pelibuey sheep. *J Reprod Fertil* 2000;25 Abstract Series:55.
- Hanrahan JP. Aspects of reproductive performance in small ruminants-opportunities and challenges. *Reproduction* 2003;61 Suppl 1:15-26.
- Harvey MB y Kaye PL. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro*. *Development* 1990;110:963-967.
- Hernández CJ. Control de la longitud de la fase lútea en la oveja mediante la administración de liquido folicular equino libre de esteroides (Tesis de Doctorado). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996.
- Hernández-Cerón J, Mendoza MG, Morales S, Gutierrez CG. A single dose of recombinant bovine somatotrophin improves fertility in dairy cattle. *J Reprod Fertil* 2000;25:54 abstr.
- Hernández CJ y Morales RJS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Méx* 2001;32(4):279-287.
- Herrler A, Einspanier R, Schams D, Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulation treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 1994;41:601-611.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991;124:43-101.
- Hunter MG, Ayad VJ, Gilbert CL, Southee JA, Wathes DC. Role of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil* 1989;85:551-561.
- Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1991;43 Suppl 1:91-99.
- Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:461-477.

- Inskeep EK. Preovulatory, postovulatory and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004;82(E. Suppl):E24-E39.
- Izadyar F, Colenbrander B, Bever MM. Growth hormone enhances fertilizability *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology* 1997;47:191.
- Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev* 1998<sup>a</sup>;49:444-453.
- Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1998<sup>b</sup>;51:339-345.
- Izadyar F, Van Tol HTA, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. *Mol Reprod Dev* 2000;57:247-255.
- Jainudeen MR y Hafez ESE. Reproduction in farm animals. In: Hafez ESE, Editor. *Sheep and Goats*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993:315-402.
- Jousan FD, Hernández-Cerón J, Franco CM, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I and interleukin-II as possible survival factors for the bovine preimplantation embryo exposed to stress. *Reprod Fertil Dev* 2004;6:188.
- Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 2004;71:1665-1670.
- Joyce IM, Khalid M, Haresign. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulation rate. *Theriogenology* 1998;50:873-884.
- Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, Mc Natty KP. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:447-460.
- Kaye PL, Gardner HG. Preimplantation access to maternal insulin and albumin increases fetal growth rate in mice. *Hum Reprod* 1999;14:3052-3059.

- Kelly RW. Fertilisation failure and embryonic wastage. In: Lindsay DR, Pearce DT, Editors. Reproduction in sheep. Canberra: Cambridge University Press, 1984:127-133.
- Kleemann DO, Walker SK, Seamark RF. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. J Reprod Fertil 1994;102:411-417.
- Kleemann DO, Walker SK. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. Theriogenology 2005;63:2075-2088.
- Knickerbocker JJ, Niswender GD. Characterization of endometrial receptor for ovine trophoblast protein-1 during the estrous cycle and early pregnancy in sheep. Biol Reprod 1989;40:361-369.
- Ko Y, Lee CY, Ott TL, Davis MA, Simmen RCM, Bazer FW, Simmen FA. Insulin-like growth factors in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-I production during early pregnancy. Biol Reprod 1991;45:135-142.
- Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone inhibits apoptosis in *in vitro* produced bovine embryos. Mol Reprod Dev 2002;61:180-186.
- Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. Biol Reprod 2003;68:1584-1589.
- Lamming GE, Darwash AO, Back HL. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. J Reprod Fert 1989;Suppl 37:245-252.
- Lane MA, Berardinelli JG, Cardenas H, Staigmiller RB. Sperm transport and distribution during the pubertal transition in ewe lambs. J Anim Sci 1993;71:707-713.
- Lee MS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. The beneficial effects of insulin and metformin on *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos. Biol Reprod 2005;73:1264-1268.
- Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. J Reprod Sci 1984;72:9-13.

- León HV, Hernández-Cerón J, Keisler DH, Gutiérrez CG. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci* 2004;82:445-451.
- Lindsay DR. Reproduction in the sheep and goat. In: Cupps PT, Editor. Reproduction in domestic animals. California: Academic Press, Inc., 1991:491-515.
- Lindsay DR, Martín GB, Williams IH. Nutrition and reproduction. In: King GJ, Editor. Reproduction in domesticated animals. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V. 1993:485-491.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil* 1994;101:697-701.
- Lucy MC, Curran TL, Collier RJ, Cole WJ. Extended function of the corpus luteum and increased follicle turnover in heifers treated with bovine somatotropin. *Biol Reprod* 1993;60 (Suppl 1):61 abstr.
- Lucy MC, Byatt JC, Curran TL, Collier RJ. Placental lactogen and somatotropin: binding to the corpus luteum and effects on the growth and function of the ovary in heifers. *Biol Reprod* 1994;50:1136-1144.
- Lucy MC, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Ko Y, Savio JD, Badinga L. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Dom Anim Endocrinol* 1995;12:73-82.
- Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci* 2000;83:1635-1647.
- Mahieu M, Cognié Y, Chemineau P. Ovulation rate, litter size and prenatal losses in hair sheep of the French West Indies. *Reprod Nutr Dev* 2004;44:333-339.
- Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED. The effects of low level of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology* 1992;38:1013-1022.
- Mann GE: Pregnancy rates during experimentation in dairy cows. *The Veterinary Journal* 2001;161:301-305.
- Martínez TVM. Efecto del tratamiento con una solución glucogénica oral sobre la tasa de

- ovulación de ovejas pelibuey (Tesis de Maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2004.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Effects of supplementation of the maturation media with insulin on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Jpn J Vet Res* 1995<sup>a</sup>;43(3-4):145-153.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J Vet Med Sci* 1995<sup>c</sup>;57(6):1109-1111.
- McCutcheon SN, Bauman DE. Effect of pattern of administration of bovine growth hormone on lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci* 1986;69:38.
- McGee EA y Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Rev* 2000;21:200-214.
- Meyer HH, Clarke JN, Harvey TG, Malthus IC. Genetic variation in uterine efficiency and differential responses to increased ovulation rate in sheep. *Proc N Z Soc Anim Prod* 1983;43:201-204.
- Michels H, Vanmontfort D, Dewil E, Decuypere E. Early prenatal survival in relation to the parenteral environment in sheep: A review. *Small Rumin Res* 1998;29:143-156.
- Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2001;68:29-43.
- Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández-Cerón J, Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 2001;55:1831-1841.
- Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000;83:1237-1247.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001<sup>a</sup>;84:1646-1659.

- Moreira F, Bandinga L, Burnley C, Thatcher WW. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2001<sup>b</sup>;55:367 abstr.
- Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Bandinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 2002<sup>a</sup>;57:895-907.
- Moreira F, Bandinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002<sup>b</sup>;57:1371-1387.
- Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 2002;124:721-731.
- Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction* 2004;128:747-756.
- Nancarrow CD. Embryonic mortality in the ewe and doe. In: Zavy MT, Geisert RD editors. *Embryonic mortality in domestic species*. Boca Raton (FL):CRC Press, 1994:79-97.
- Nephew KP, McClure KE, Ott T, Budois DH, Bazer FW, Pope WF. Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. *Biol Reprod* 1991;44:536-539.
- Nephew KP, Xie S, Broermann-Ridder DM, McClure KE, Pope WF. Influence of the embryo on intrauterine migration in sheep. *J Anim Sci* 1992;70:1911-1915.
- Nicholas B, Scougall RK, Armstrong DG, Webb R. Changes in insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) isoforms during bovine follicular development. *Reproduction* 2002;124:439-446.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000;80:1-29.
- Parr RA, Davis IF, Fairclough, Miles MA. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil* 1987;80:317-320.

- Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35:965-975.
- Putney DJ, Malayer JR, Gross TS, Thatcher WW, Hansen PJ, Drost M. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptus and uterine endometrium. *Biol Reprod* 1988;39:717-728.
- Quirke JF, Hanrahan JP. Comparison of the survival in the uteri of adult ewes of cleaved ova from adult ewes and ewe lambs. *J Reprod Fertil* 1977;51:487-489.
- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG. Short-term studies of ovarian metabolism in the ewe. *Anim Reprod Sci* 1997;47:43-58.
- Rhind SM, McKelvey WAC, McMillen S, Gunn RG, Elston DA. Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of Greyface ewes. *Anim Prod* 1989;48:149-155.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1998;112:123-130.
- Rosas PJ, Zarco L, Valencia MJ. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre la función lútea y el desarrollo embrionario temprano en la oveja superovulada. *Vet Mex* 1995;26(Suppl 2):339 abstr.
- Rodríguez Iglesias RM, Cicciooli NH, Irazoqui H, Giglioli C. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenic dosage during a ram-induced follicular phase. *Anim Reprod Sci* 1996;44:211-221.
- Rubianes E. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología* 2000;6:93-103.
- Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Mejía O, Caballero V, Zarco L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 1998; 50:1039-1052.

- Santos JEP, Juchem SO, Cerri RLA, Galvão KN, Chebel RC, Thatcher WW, Dei CS, Bilby CR. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2004;87:868-881.
- SAS. Statistical Analysis System. In: SAS/STAT<sup>TM</sup> User's guide. Release 6.03. Cary, NC, SAS Institute Inc., 1988:15-21.
- Sauerwein H, Miyamoto A, Gunther J, Meyer HHD, Schams D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 96:103-115.
- Scaramuzzi RJ, Downing JA. The distribution of ovulations from the ovaries of Merino and Border Leicester X Merino ewes and its effect on the survival of their embryos. *Anim Reprod Sci* 1997;47:327-336.
- Scaramuzzi RJ, Murray JF, Downing JA, Campbell BK. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domestic Anim Endocrinol* 1999;17:269-277.
- Schoenian SG, Burfening PJ. Ovulation rate, lambing rate, litter size and embryo survival of Rambouillet sheep selected for high and low reproductive rate. *J Anim Sci* 1990;68:2263-2270.
- Senger PL, Editor. Pathways to the pregnancy and parturition. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: Current Conceptions, Inc., 2003.
- Silva JM, Price CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. *J Endocrinol* 2002; 174:499-507.
- Simmen RCM, Ko Y, Simmen FA. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 1993;39:163-175.
- Sinclair KD, Rooke JA, McEvoy TG. Regulation of nutrient uptake and metabolism in pre-elongation ruminant embryos. *Reproduction* 2003;61 Suppl 1:371-385.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2003;77:21-32.

- Thwaites CJ. Embryo mortality in the heat stressed ewe. I. The influence of breed. *J Reprod Fertil* 1967;14:5-14.
- Trejo GA. Control de la reproducción caprina. En: Rabiza AS, Editor. *Producción de caprinos*. México: AGT Editor, 1986:242-274.
- Turner CD, Bagnara JT. *General Endocrinology*. 6<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders, Philadelphia (1976).
- Van der Walt JG. Somatotropin Physiology: A review. *S-Afr Tydskr Veek* 1994;24:1-8.
- Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 2005;129:299-309.
- Waldron DF, Thomas DL. Increased litter size in Rambouillet sheep: I. Estimation of genetic parameters. *J Anim Sci* 1992;70:3333-3344.
- Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA. IGF-I paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil* 1999; suppl 54:303-315.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction* 2003;61 Suppl:71-90.
- Wilkins JF. Method of stimulating ovulation rate in Merino ewes may affect conception but not embryo survival. *Anim Reprod Sci* 1997;47:31-42.
- Williams SA, Blache D, Martin GB, Foot R, Blackberry MA, Scaramuzzi RJ. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 2001;122:947-956.
- Yu Y, Li W, Han Z, Luo M, Chang Z, Tan J. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. *Theriogenology* 2003;60:1691-1704.
- Zarco L, Balcázar A, Mejía O. Infertilidad debida a asincronía materno-embrionaria en rumiantes. *Memorias XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. Acapulco (Guerrero) México, 1994:592.
- Zeleznik AJ. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:31.
- Zhang L, Blakewood EG, Denniston RS, Godke RA. The effect of insulin on maturation and development of *in vitro*-fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1991;35:301 (abstr).