



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMPARACIÓN Y DINÁMICA FOLICULAR DE DOS PROTOCOLOS DE
SINCRONIZACIÓN DE ESTROS CON ACETATO DE FLUOROGESTONA Y
GLICEROL EN OVEJAS PELIBUEY**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ PABLO ESCORCIA ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL:

M en C ANTONIO ROLDÁN ROLDÁN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL:

DR ADRIAN GUZMÁN SANCHEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - XOCHIMILCO

M en C ANA DELIA RODRIGUEZ CORTEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



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.

DEDICATORIA

A mi familia, Malu, José, Daniel y Onigiri que siempre me han apoyado incondicionalmente, disfrutando conmigo en cada paso importante que he logrado en mi vida.

A Cecilia por ser mi compañera de aventuras y un gran pilar cuando necesité un apoyo.

A todas las personas que se acercaron y compartieron el interés de aprender conmigo durante este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y amigo Antonio Roldán Roldán por guiarme en el momento más adecuado en mi formación personal y profesional.

A mi comité tutorial, Ana Delia Rodríguez Cortez, Adrian Guzmán Sánchez y Juan Heberth Hernández Medrano por dedicar parte de su valioso tiempo y siempre orientar mi desarrollo profesional en la mejor dirección.

A mi Jurado conformado por Rosa Bertha Angulo Mejorado, Juan Alberto Balcázar Sánchez, José Alfredo Medrano Hernández por sus importantes observaciones que me permitieron culminar este trabajo.

A todas las personas como amigos, asesores y voluntarios que no me alcanzaría el espacio para mencionar a cada uno de ellos, me brindaron su compañía y apoyo en cada una de las etapas de este proceso y que con su ayuda esto es posible.

Al departamento de reproducción por adoptarme, permitirme desarrollarme en esta área tan interesante y aún más importante, conocer a grandes seres humanos que me han enseñado mucho más de lo que alguna vez imaginé.

Al Centro de Enseñanza Producción Investigación en Producción y Salud Animal por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en sus instalaciones y a la asesoría recibida. En especial, al MVZ Juan de Dios Zavaleta por su increíble apoyo siempre que fue necesario.

A las borregas Pelibuey, por permitirme aprender un poco más acerca de su vida para compartirlo con los demás.

Al CONACYT que me otorgó la beca que me permitió hacer y terminar mis estudios de posgrado.

CONTENIDO

1.- Resumen	1
2.- Abstract	2
3.- Introducción	3
4.- Revisión de literatura	6
4.1.- Ciclo Estral	6
4.2.- Foliculogénesis	6
4.2.1.-Folículos Primordiales.....	8
4.2.2.-Folículos Comprometidos	8
4.2.3.-Folículos Sensibles a gonadotropinas.....	10
4.2.4.-Folículos Dependientes de gonadotropinas	11
4.2.5.-Folículos Ovulatorios	12
4.3.- Dinámica folicular en el ciclo estral	13
4.3.1.- Reclutamiento folicular.....	13
4.3.2.- Selección	14
4.3.3.- Dominancia.....	15
4.4.- Protocolos de sincronización	16
4.5.- Vías metabólicas que intervienen en la foliculogénesis	18
4.5.1.- Glucosa - Insulina	20
4.5.2.- IGF-1	22
4.5.3.- Leptina.....	23
4.5.4.- Cinasa de monofosfato de adenosina (AMPK).....	24
4.6.- Sobrealimentación	25
5.- Hipótesis	29
6.- Objetivos	29
7.- Material y métodos	30
7.1.- Localización	30
7.2.- Metodología	30
7.2.1.- Protocolo de sincronización	30
7.2.2.- Seguimiento por ultrasonografía	31
7.2.3.- Detección del estro	32
7.2.4.- Inseminación artificial.....	32
7.2.5.- Diagnóstico de gestación	33
7.2.6.- Análisis estadístico	33
8.- Resultados	34
9.- Discusión	43
10.- Conclusiones	50
11.- Literatura citada	51
12.- Anexos	65

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.- Promedio de los folículos ovulatorios	34
Cuadro 2.- Dinámica de los folículos ovulatorios entre grupos experimentales	35
Cuadro 3.- Porcentaje de fertilidad y prolificidad en la segunda etapa.....	36
Cuadro 4.- Respuesta al protocolo de sincronización	38
Figura 1.- Calendario del protocolo de sincronización, seguimiento ultrasonográfico, detección de estros e inseminación artificial en los grupos experimentales.....	31
Figura 2.- Reconocimiento de estructuras ováricas	34
Figura 3.- Diámetro promedio y duración en días de folículos ovulatorios por grupo.....	37
Figura 4.- Crecimiento y duración promedio de los folículos ovulatorios incluyendo la duración promedio del estro y el momento de la inseminación en el grupo TLC, ajustado a la ovulación al día 0	39
Figura 5.- Crecimiento y duración promedio de los folículos ovulatorios incluyendo la duración promedio del estro y el momento de la inseminación en el grupo TCC, ajustado a la ovulación al día 0.....	39
Figura 6.- Crecimiento y duración promedio de los folículos ovulatorios incluyendo la duración promedio del estro y el momento de la inseminación en el grupo TCG, ajustado a la ovulación al día 0	40
Figura 7.- Recuento del número de animales inseminados respecto al momento de inicio del estro.....	41
Figura 8.- Desarrollo de un folículo anovulatorio que terminó luteinizándose en un miembro del grupo TLC	42

1.- RESUMEN

Pablo Escorcía Ortiz. Comparación y dinámica folicular de dos protocolos de sincronización de estros con acetato de fluorogestona y glicerol en ovejas Pelibuey (bajo la dirección del MVZ M en C Antonio Roldán Roldán).

En México, frecuentemente se emplean tratamientos de sincronización tradicionales (11 días) con el fin de realizar una inseminación artificial (IA) en su mayoría por vía cervical con semen fresco, reportando 67% de fertilidad. Sin embargo, este tratamiento se ha asociado a la presentación de persistencia folicular, además, el uso frecuente de eCG genera una respuesta inmunológica (IgG), afectando su eficiencia en el desarrollo folicular y aumentando la formación de quistes foliculares. Como una alternativa a esto, se implementa un tratamiento de corta duración (5 días) para promover un recambio folicular y así evitar la persistencia folicular. El objetivo de este trabajo fue administrar el glicerol (sustrato gluconeogénico). Para ello, se realizó el seguimiento de la dinámica folicular en tres grupos de ovinos Pelibuey (n=17) con distintas duraciones del progestágeno intravaginal (Tratamiento Largo Control: 11 días; Tratamiento Corto Control y Tratamiento Corto Glicerol: 5 días). Al retiro del dispositivo se aplicó una prostaglandina, además para el grupo TCG se administró glicerol PO (50 mL). A su vez, se realizó diariamente el seguimiento ultrasonográfico vía transrectal (7.5 MHz), determinando el tamaño y número de las estructuras ováricas desde la inserción del progestágeno y hasta la formación del cuerpo lúteo. Con relación al diámetro de los folículos, no hubo diferencia entre grupos, sin embargo en los grupos TCC (1) y TCG (1.29) hubo un aumento en el número de folículos ovulatorios que son reclutados después del retiro del dispositivo intravaginal en comparación al grupo TLC (0.59) ($p < 0.05$). Concluyendo que utilizando un tratamiento de corta duración se aumenta el número de folículos ovulatorios que son reclutados después del retiro del progestágeno y si se adiciona glicerol se obtiene un aumento en el total de folículos ovulatorios (2.92) en comparación al tratamiento de larga duración (1.59).

2.- ABSTRACT

Pablo Escorcía Ortiz. Comparison and follicular dynamics of two estrus synchronization protocols with fluorogestone acetate and glycerol in Pelibuey ewes (under direction of MVZ M en C Antonio Roldán Roldán).

In Mexico, traditional synchronization treatments (11 days) are mostly used in order to perform artificial insemination (AI) mostly by cervical route with fresh semen, reporting 67% fertility. However, this treatment has been associated with the presentation of follicular persistence, in addition, the frequent use of eCG generates an immunological response (IgG), affecting its efficiency in follicular development and the formation of follicular cysts. As an alternative to this, a short duration treatment (5 days) is implemented to promote a follicular exchange and thus avoid follicular persistence. The objective of this work was to administer glycerol (gluconeogenic substrate). For this, follicular dynamics were monitored in three groups of Pelibuey sheep ($n = 17$) with different durations of the intravaginal progestogen (Long Control Treatment: 11 days; Short Control Treatment and Short Glycerol Treatment: 5 days). The removal of the device was applied in a prostaglandin; in addition to the TCG group glycerol PO (50 ml) was administered. In turn, ultrasonic transrectal monitoring (7.5 MHz) is used, the size and number of ovarian structures are determined from the insertion of the progestogen and until the formation of the corpus luteum. There is no difference between groups, however, in the TCC (1) and TCG (1.29) groups there was an increase in the number of ovulatory follicles that are recruited after removal of the intravaginal device compared to the TLC group (0.59) ($p < 0.05$). Conclusion that using a short-term treatment increases the number of ovulatory follicles that are recruited after progestogen withdrawal and if glycerol is added an increase in the total ovulatory follicles is obtained (2.92) compared to long-term treatment (1.59).

3.- INTRODUCCIÓN

Con el objeto de aumentar la prolificidad en los ovinos se ha recurrido al uso de protocolos de sincronización que emplean además, hormonas como la gonadotropina coriónica equina (eCG) en una inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) vía cervical con semen fresco, siendo de ser la más utilizada en México, reportando resultados que indican un 57% de fertilidad (Balcazar J, 2013). Sin embargo, el uso frecuente de este tratamiento genera una alta variabilidad en la eficiencia reproductiva, debido a una respuesta inmunológica por parte del organismo que conduce a la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas de tipo G) contra esta hormona (Bodin *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1999a, 1999b). Asociado a esto, se ha observado que los individuos sometidos a un segundo o más tratamientos con eCG presentan un efecto negativo sobre el desarrollo folicular, lo que retrasa su ovulación y como consecuencia afecta la fertilidad en protocolos de IATF (Salas-Razo *et al.*, 2013a; Viñoles *et al.*, 2001).

El uso de protocolos de sincronización prolongados (11 a 12 días) con acetato de medroxiprogesterona (MPA por sus siglas en inglés) causa persistencia folicular, lo que conlleva a una disminución en el porcentaje de fertilidad por envejecimiento de los ovocitos (Salas-Razo *et al.*, 2013a; Viñoles *et al.*, 2001). Una alternativa a este procedimiento consiste en aplicar un tratamiento corto (5 días) lo que supone un recambio folicular evitando el envejecimiento folicular (Menchaca and Rubianes, 2004).

La administración de glicerol como sobrealimentación ultracorta en un esquema de sincronización de corta duración parece ser una alternativa para evitar los efectos negativos de protocolos largos y el uso de eCG sobre la tasa ovulatoria. El flushing ultracorto se basa en la sobrealimentación del animal al momento del retiro del dispositivo intravaginal con un sustrato altamente energético como lo es el glicerol. A este respecto, resultados obtenidos por Escorcía (Escorcía P, 2016), indican que la aplicación de flushing ultracorto en un tratamiento largo de sincronización

obtuvo un 70% de fertilidad, además que no se presenta diferencia estadística al inseminar por vía cervical una sola vez o dos veces al día a lo largo del estro. Asociado a esto, Gutierrez *et al.* (2011) y Viñoles *et al.* (2005), demuestran que la selección y el desarrollo folicular están asociados al aumento de glucosa, insulina y leptina en circulación, sin embargo no identificaron un aumento en número y tamaño de los folículos.

El estudio de la dinámica folicular en diferentes especies se ha descrito con base en observaciones realizadas con ultrasonografía transrectal, lo que ha permitido monitorear el número y tamaño de folículos (Ginther *et al.*, 1989; Viñoles *et al.*, 2004, 2001). Con esta herramienta se han identificado las oleadas foliculares, la presencia de folículos dominantes, subordinados y el cuerpo lúteo (Ginther *et al.*, 1989; Salas-Razo *et al.*, 2013a; Viñoles *et al.*, 2004, 2001). Con esta serie de observaciones, hoy se conoce que en los ovinos los folículos con un tamaño igual o mayor a 5 mm son candidatos para ser seleccionados y continuar con su desarrollo (Bartlewski, *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2000; Ginther *et al.*, 1995; Leyva *et al.*, 1998; Viñoles *et al.*, 2001). Así mismo, se sabe que el reclutamiento folicular se realiza a partir de folículos con un diámetro entre 2 a 3 mm (Evans *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 1993; Viñoles *et al.*, 1999).

Al conocer la dinámica folicular en tratamientos de sincronización de estros en la oveja Pelibuey, la cual está distribuida en la mayoría del territorio nacional y se considera que constituye la mitad del rebaño nacional debido a rusticidad, capacidad adaptativa, baja estacionalidad y alta prolificidad (Lara *et al.*, 2007; Partida and Martínez, 2010; Valencia and Roldán, 2013), permitirá mejorar el estudio de los sistemas de reproducción en producciones verdes y sustentables en esta especie (Martin and Kadokawa, 2006). Además, el empleo del glicerol como sustituto de la eCG, promoverá el desarrollo folicular en protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo, lo cual permitiría incrementar el número de ovulaciones y en su medida, la tasa de fertilidad. De esta manera se podrá

desarrollar un protocolo de sincronización en el que se evite la respuesta inmunológica que se genera con el uso de hormonas exógenas.

4.- REVISIÓN DE LITERATURA

4.1.- Ciclo estral

El ovino es un rumiante con actividad reproductiva poliéstrica estacional, esto quiere decir que se rige por dos ciclos. El primero es un ciclo estral que dura en promedio 17 días y el segundo es un patrón anual que se determina con el fotoperiodo (Karsch, 1984).

El ciclo estral involucra cambios morfológicos, fisiológicos y conductuales que son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal aunados a eventos de retroalimentación para estimular o inhibir la secreción de diferentes hormonas: el hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la adenohipófisis produce las hormona foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), en el ovario, el folículo secreta esteroides e inhibina, el cuerpo lúteo secreta progesterona y oxitocina y finalmente en el útero se da la síntesis de prostaglandina F2 α (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El ciclo estral se divide en dos fases: fase folicular y fase lútea. La fase folicular se define como el periodo que comprende desde el desarrollo folicular y hasta la ovulación provocada por secreción de LH de la adenohipófisis que a su vez es estimulada por GnRH proveniente del hipotálamo (Karsch *et al.*, 1980). A partir de este punto se inicia la fase lútea, en la cual predomina la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo y finaliza con la luteólisis causada por la secreción de prostaglandina F2 α en el útero, dando inicio a un nuevo ciclo (Karsch, 1984).

4.2.- Foliculogénesis

La mayoría de los mamíferos tienen un número determinado de folículos primordiales al momento del nacimiento. En la oveja la formación de folículos primordiales se da en vida fetal, comenzando su desarrollo 35 días después de la concepción y culmina hasta los 70 días de vida fetal (Baillet *et al.*, 2008; Garverick

et al., 2002; Picton, 2001; Sawyer *et al.*, 2002; Scaramuzzi *et al.*, 2011). La formación de los folículos comienza cuando las células de la pregranulosa que provienen de las células epiteliales del ovario, migran y rodean a las células germinales (Sawyer *et al.*, 2002), en promedio se necesitan 16 células por cada ovogonia (Lundy *et al.*, 1999). Para que este evento se lleve a cabo es necesaria la comunicación entre células germinales y células somáticas, se postula que el sistema Notch actúa como un mediador entre estas células. El receptor NOTCH2 se presenta en células de la pregranulosa y se activa por JAGGED1 por parte de la ovogonia, con el fin de formar uniones estrechas entre ambas células. Se conoce que en ratones cuando se interrumpe esta señalización, puede disminuir el número de folículos primordiales (Buratini and Price, 2011; Scaramuzzi *et al.*, 2011; Trombly *et al.*, 2009). Luego de que la célula germinal continua el proceso de meiosis y de unirse a las células de la pregranulosa, al menos un 80% de las células germinales sufren apoptosis, no así las células de la pregranulosa (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Se estima al momento del nacimiento la oveja tiene entre 40,000 a 300,000 folículos primordiales de 0.03 mm de diámetro (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El tiempo del desarrollo folicular es aproximadamente de 4 a 6 meses, de los cuales el desarrollo preantral ocupa entre 3 a 4 meses (Campbell *et al.*, 2003; Driancourt *et al.*, 1985). Durante el desarrollo folicular, los folículos se clasifican en distintos tipos con base en su independencia o respuesta a gonadotropinas y comprende desde folículos primordiales, comprometidos, sensibles a gonadotropinas, dependientes de gonadotropinas y folículos ovulatorios (Scaramuzzi *et al.*, 1993). A continuación se describen brevemente los distintos tipos de folículos que pueden estar presentes en el ovario.

4.2.1.- Folículos Primordiales

Este estadio folicular constituye la reserva que mantiene quiescente su desarrollo y que a lo largo de la vida reproductiva se van agotando, aunque parece que su desarrollo se encuentra más relacionado a la ontogenia y asociación celular con células de la pregranulosa (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Este tipo de folículos primordiales se reconocen por tener un ovocito primario en posición central sin zona pelúcida, rodeado de una capa de células pregranulosa aplanadas y no poseen red vascular (Nilsson and Skinner, 2001; Picton, 2001). Los folículos primordiales son el estado más inmaduro de la foliculogénesis y comienzan su desarrollo bajo estímulos intraováricos y hormonales (Mcgee and Hsueh, 2000). Estos folículos no presentan receptores en células de la granulosa a FSH (FSHr) ni actividad de la enzima aromatasa (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

4.2.2.- Folículos Comprometidos

En esta etapa los folículos primordiales dejan la latencia. En la oveja aproximadamente, entre 25 y 30 folículos comienzan su activación y crecimiento diariamente convirtiéndose en folículos comprometidos (Fortune, 2003; McNatty *et al.*, 2007). Los cambios más notorios son el agrandamiento del ovocito, cambio en la morfología de las células de la pregranulosa, de planas a cúbicas, desarrollo de la zona pelúcida y proliferación de las células cuboidales. En esta etapa hay entre 20 a 520 células acomodadas en capas concéntricas alrededor del ovocito y el folículo tiene un diámetro que oscila entre 0.03 a 0.1 mm. Cuando las células de la teca forman tres capas, se diferencian del estroma ovárico y se fijan a la membrana basal del folículo (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

Existe una gran variedad de estímulos que promueven el reclutamiento de folículos primordiales para que continúen su desarrollo (Mcgee and Hsueh, 2000). Dentro de estos estímulos encontramos a la insulina, el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) (Mazerbourg *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2007), miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor

diferenciador del crecimiento tipo 9 (GDF-9), la proteína morfogénica del hueso tipo 15 (BMP-15), la hormona antimulleriana (AMH) (Durlinger *et al.*, 2002; Knight and Glister, 2006), el ligando de Kit (KL), el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Qu *et al.*, 2000), el factor de crecimiento fibroblásticos-7 (FGF) y el factor de crecimiento de queratinocitos (FGK). En ratas el FGF-7 está presente en células circundantes del folículo primordial y en bovinos en las células de la granulosa de folículos preantrales, además, presenta una retroalimentación simultánea con el sistema Kit/KL (Berisha *et al.*, 2004; Kezele *et al.*, 2005). La expresión de KL en las células de granulosa se inhibe por el factor GDF-9, por el contrario, cuando el ovocito secreta BMP-15, se estimula la expresión de KL en células de la granulosa (Joyce *et al.*, 2000; Otsuka and Shimasaki, 2002; Scaramuzzi *et al.*, 2011).

En cuanto a las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), la que está presente en las células de la granulosa y el ovocito es la BMP6, siendo la encargada del desarrollo preantral y activación folicular (Webb and Campbell, 2007). Las BMP4 y 7 favorecen la transición de folículos primordiales a primarios (Drummond, 2005).

Para la activación folicular, otro factor importante es la presencia del estradiol. Se ha visto que la síntesis de estradiol es regulada en las células somáticas del ovario por el factor de transcripción FOXL2, ya que sin su presencia, los folículos detienen su desarrollo como folículos primordiales (Schmidt *et al.*, 2004). Este factor modula el gen de la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) (Pisarska *et al.*, 2004) apoyando la teoría de Yang y Fortune (2008) en la importancia del estradiol para la activación folicular en vida fetal.

Los folículos primarios o comprometidos presentan receptores para FSH en células de la granulosa y en tecaes para LH, pero aún no son responsivos a gonadotropinas aunque *in vitro* la FSH y LH logran promover el desarrollo folicular (Fortune, 2003).

4.2.3.- Folículos Sensibles a gonadotropinas

Previo a la formación del antro, la población de las células de la granulosa experimentan entre siete y ocho mitosis y la diferenciación de los fenotipos, de células de la granulosa del cúmulo y murales (McNatty *et al.*, 2007). Una vez que se forma el antro folicular: los folículos crecen de 0.2 mm a 0.7 mm en un lapso de 30 días. Una vez que los folículos alcanza un diámetro de 0.8 mm, se presenta la máxima tasa de proliferación de las células de la granulosa para permitirle al folículo crecer hasta 2.5 mm de diámetro en tan solo 5 días (Turnbull *et al.*, 1977). Para que un estímulo de FSH sea efectivo, se necesita que exista al menos 3 capas laminares de células de la granulosa, aunque los FSHr se presentan desde que existe solo una capa de células de la granulosa (Campbell, 2009; Campbell *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 1999, 2000). Esto coincide con la expresión de RNA para LHr, cuando la teca se forma alrededor del folículo (McNatty *et al.*, 1999, 2000). En este momento se activa la enzima aromatasa y es posible detectar concentraciones de estradiol en el folículo cuando presenta un diámetro de 0.5 mm, todo esto bajo el estímulo de FSH en las células de la granulosa (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

Lo anterior se complementa con la detección de RNAm para enzimas esteroidogénicas como citocromo P450 cortadora de la cadena lateral (P450scc), citocromo P450 17 α hidroxilasa (P450c17) y 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), luego de la formación de la teca interna (Bao and Garverick, 1998) y la citocromo P450 (450arom) la cual solo se detecta en las células de la granulosa. Esto implica que cuando los folículos son sensibles a gonadotropinas ya son funcionalmente esteroidogénicos produciendo estradiol, progesterona y ciertos andrógenos en pequeñas cantidades (Campbell *et al.*, 2003; McNatty *et al.*, 1999, 2000). Además estos folículos son capaces de producir Inhibina, activina y AMH (Campbell, 2009; McNatty *et al.*, 1999, 2000). Así mismo, a través del control esteroidogénico, puede modular la concentración y patrón de secreción de FSH

así como de inhibina A (Baird *et al.*, 1981; B. K. Campbell *et al.*, 1999; Peluso *et al.*, 1984; Walters *et al.*, 1984; Webb and Campbell, 2007).

De igual forma, el sistema insulina/IGF actúa en folículos preantrales como moduladores potenciales del desarrollo folicular independiente de gonadotropinas, demostrando la presencia de RNAm para IGF α , IGFBP-2 y 3 (Armstrong *et al.*, 2003). Se sabe que el IGFBP-2 es el que modula localmente las acciones proliferativas y de diferenciación de IGF-1 (Campbell *et al.*, 2003; Walters *et al.*, 2006).

Al terminar este periodo de desarrollo folicular , existe una cohorte de alrededor de 25 folículos entre 1 a 2.5 mm de diámetro que son sensibles a gonadotropinas (McNatty *et al.*, 1982; Scaramuzzi *et al.*, 1993). Cuando se presenta la máxima tasa de mitosis de la células de la granulosa y que el folículo tenga un diámetro entre 1.2 y 2 mm, se marca el inicio de la etapa dependiente de gonadotropinas (Driancourt, 2001; Turnbull *et al.*, 1977), seguido de un aumento en la tasa de atresia en folículos de 2 a 2.5 mm (McNatty *et al.*, 1999; Turnbull *et al.*, 1977; Webb and Campbell, 2007).

4.2.4.- Folículos Dependientes de gonadotropinas

Como se mencionó anteriormente que se requiere del aporte de FSH para que el folículo pase de sensible a gonadotropinas a ser dependiente a gonadotropinas, siendo que llegan a esta etapa entre 1 hasta 8 folículos con un diámetro de 1.2 a 2.5 mm (Driancourt, 2001; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Turnbull *et al.*, 1977). La FSH se encarga de la actividad de la enzima aromatasa para promover e incrementar las concentraciones de estradiol. En particular, aunque ya se presentan LHr en las células de la granulosa, es necesario el sustento de FSH para mantener la actividad de la enzima aromatasa, con el fin de evitar la atresia por acumulación de andrógenos en el folículo (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Este evento hace más susceptibles la falta de FSH a los folículos dependientes de gonadotropinas en comparación a los sensibles y ovulatorios (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

En esta etapa, las responsables de controlar el desarrollo final de la foliculogénesis son la FSH y LH, así como algunos factores de crecimiento derivados del ovocito y células somáticas que modulan la acción de las gonadotropinas (Campbell, 2009). La FSH estimula el crecimiento y diferenciación folicular (Campbell *et al.*, 1998; McNeilly, 1992) y la LH es importante en la parte final de la foliculogénesis y maduración del ovocito debido a un patrón de secreción pulsátil (Baird, 1983; Hillier, 2001).

En cuanto a LH, tiene efectos sobre el desarrollo de folículos antrales, se sabe que una concentración máxima es perjudicial para el desarrollo folicular a través de su papel estrogénico e inhibina A, influyendo en el nivel y patrón de secreción de FSH, modulando el reclutamiento de una nueva cohorte. También se conoce un umbral mínimo que si no se alcanza no se presenta la ovulación (Campbell *et al.*, 2007; Hillier, 1994).

4.2.5.- Folículos Ovulatorios

Para que el folículo sea capaz de ovular se requiere una baja pero crítica concentración de FSH. A lo largo de la foliculogénesis se presentan una gran cantidad de FSHr y LHR estimulando la proliferación de células de la granulosa y aumentan el líquido folicular, dando como resultado que se incremente el tamaño folicular (B. K. Campbell *et al.*, 1999; Turnbull *et al.*, 1977). En este punto, la actividad de la aromatasa está en su punto máximo siendo responsable del 90% de estradiol circulante (Baird *et al.*, 1991; Hsueh *et al.*, 1984).

En la oveja, el diámetro promedio ovulatorio de un folículo oscila debe ser ≥ 5 mm con un crecimiento de 1 mm por día. Sin embargo, algunos individuos que presentan el gen boorola con ovulaciones múltiples (hasta 5 folículos ovulatorios), el diámetro promedio diámetro ovulatorio disminuye entre 2 a 4 mm (Bartlewski *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001).

4.3.- Dinámica folicular en el ciclo estral

El desarrollo folicular que se da durante el ciclo estral de la oveja y otras especies, es un evento cíclico y organizado, regulado por las gonadotropinas y se presenta en un patrón de olas a las que se les denomina oleadas foliculares. Cada ola se divide en tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia. En estas oleadas, una cohorte de folículos sensibles a gonadotropinas es reclutado de manera sincrónica, seguido de una selección para continuar su desarrollo, volviéndose un folículo dominante que detiene la activación de otros folículos (Evans, 2003).

En los pequeños rumiantes cada oleada folicular emerge a intervalos de entre 4 y 5 días, encontrando folículos con un diámetro de 2 a 3 mm, de los cuales algunos crecerán hasta un diámetro de 4-7 mm y el resto sufrirá atresia (Bartlewski *et al.*, 1999). Seguido de esta ovulación, pueden presentarse de 2 a 5 oleadas en un periodo interovulatorio con un promedio de 3 oleadas en los días 0, 6 y 11 (Rubianes, 2000; Seekallu *et al.*, 2010; Toosi *et al.*, 2009). Lo anterior se demostró con ultrasonografía transrectal, monitoreando diariamente el desarrollo de los folículos (Bartlewski *et al.*, 2000; Bartlewski, *et al.*, 1999; Leyva *et al.*, 1998; Pierson and Ginther, 1984; Salas-Razo *et al.*, 2013b; Sirois and Fortune, 1988; Viñoles *et al.*, 2004).

4.3.1.- Reclutamiento folicular

En la oveja el reclutamiento se conforma de una cohorte de 1 y hasta 8 folículos con 2.5 mm de diámetro (Scaramuzzi *et al.*, 1993). La encargada de este reclutamiento es la hormona FSH. En ausencia de un folículo dominante se libera el bloque por retroalimentación negativa que tiene estradiol e inhibina hacia a FSH y se permite un pico transitorio de esta hormona que promueve el desarrollo de folículos pequeños (Fortune, 2003; Scaramuzzi *et al.*, 2011; Webb *et al.*, 1999). Los folículos reclutados, expresan RNAm para LHr en células de la teca y FSHr para las células de la granulosa, además de P450scc y P450arom necesarias para continuar la esteroidogénesis. A medida que los folículos maduran, se da un

cambio en la dependencia de FSH a LH. Esto, determina la selección del folículo dominante, momento en el cual, se presentan cambios en patrones de expresión de receptores a gonadotropinas y enzimas para la producción de esteroides dentro del folículo (Webb *et al.*, 1999).

Un factor que actúa sinérgicamente en conjunto a FSH es el IGF-1, el cual promueve la sensibilidad a gonadotropinas y luego su transición a dependencia de las mismas, así como el estímulo de la esteroidogénesis (Monget *et al.*, 2002). En la oveja el IGF-1, actúa en folículos de 1 a 3 mm de diámetro estimulando la proliferación de las células de la granulosa, mientras que en folículos que superan los 5 mm estimula la secreción de progesterona (Monniaux and Pisselete, 1992). Se conoce que en bovinos seleccionados a presentar ovulación múltiple, que las concentraciones de IGF-I se elevan al doble que en las no seleccionadas, indicando que este factor promueve el desarrollo de folículos antrales pequeños, aumentando la cohorte de folículos reclutados, llegando a seleccionar dos o más folículos dominantes en la misma oleada folicular (Echternkamp *et al.*, 2004).

4.3.2.- Selección

Dentro de la cohorte de folículos reclutados, solo algunos son seleccionados para continuar su desarrollo y el resto de folículos subordinados sufren atresia (Driancourt, 2001; Webb and Campbell, 2007). La selección de los folículos se realiza en el ovario tres días antes de la ovulación (Scaramuzzi *et al.*, 2011; Webb and Armstrong, 1998; Webb and Campbell, 2007). Bao y Garverick (1998) indican que en el proceso de selección, es necesaria la expresión de RNAm para LHr en células de la teca y granulosa. Esto hace que el primer folículo en presentar receptores a LH en las células de la granulosa se convierta en un folículo dominante (Lucy, 2007).

Una vez ocurrido este proceso, el folículo dominante presenta LHr y actividad de 3β -HSD en las células de la granulosa (Webb *et al.*, 2003), produciendo más estradiol e inhibina, lo cual inhibe selectivamente a FSH pero no así a LH (Lucy,

2007). Cuando FSH es inhibida, la que se encarga del crecimiento folicular es LH. En la oveja esta etapa se alcanza cuando el folículo mide 3.5 mm de diámetro (Campbell *et al.*, 2003).

Para alcanzar la etapa de dominancia, se propone que el sistema IGF tiene relevancia en la síntesis de estradiol, así como las proteínas de unión a IGF (IGFBPs), con su efecto negativo y sus proteasas para controlar este efecto (Monget *et al.*, 2002). Se ha determinado un aumento al cuádruple en las concentraciones de estradiol y una disminución 2.5 veces de IGFBP-2, 4 y 5 cuando el folículo dominante tiene una diferencia de 1 mm de diámetro respecto a los subordinados. En este momento, si se rescatan los folículos subordinados con la administración de FSH y se logra alcanzar la madurez del folículo dominante, se crea una situación de codominancia (Rivera *et al.*, 2001; Rivera and Fortune, 2001; Scaramuzzi *et al.*, 2011). Para esto, FSH inhibe a IGFBP-2 intrafolicular, permitiendo que el efecto de IGF se presente, siendo esto, una de las claves para la selección de este folículo (Webb *et al.*, 2003; Webb and Campbell, 2007). A su vez, FSH también estimula la secreción de una proteasa conocida como proteína A del plasma, asociada a la preñez (PAPP-A), secretándose en un folículo dominante 3.5 veces más que un subordinado, ésta regula la presentación de IGFBP-4, incrementando el IGF libre intrafolicular (Rivera *et al.*, 2001).

4.3.3.- Dominancia

En esta etapa lo que caracteriza a un folículo dominante es su capacidad de inhibir el desarrollo de otros folículos subordinados y provocar un evento denominado *desviación* (Beg and Ginther, 2006; Ginther *et al.*, 2000, 1999; Webb and Campbell, 2007). El folículo dominante se encarga de inhibir la secreción de FSH, así, en concentraciones bajas de esta hormona, se evita la emergencia de una nueva cohorte de folículos sensibles a gonadotropinas, pero es capaz de continuar su desarrollo (Aerts and Bols, 2010; Webb and Campbell, 2007). Este proceso de desviación se da en un periodo de 8 horas (Ginther *et al.*, 2000).

A este punto, la angiogénesis tiene un papel fundamental, cuando un folículo presenta una mayor vascularización, se le asocia a la selección de un folículo dominante (Acosta *et al.*, 2005; Plendl, 2000; Robinson *et al.*, 2009). El responsable de fomentar el grado de vascularización es el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) (Acosta *et al.*, 2005; Rosales-Torres and Guzman-Sánchez, 2011; Zimmermann *et al.*, 2002). Este aumento en la vascularización en el folículo se traduce en un aumento en el suministro de gonadotropinas y factores de crecimiento, en comparación a los subordinados (Barboni *et al.*, 2000; Torres and Sánchez, 2011).

4.4.- Protocolos de sincronización

Dentro de los métodos que existen para regular y sincronizar el ciclo estral en ovinos, se presentan dos tipos; Aquellos considerados luteotrópicos basados en el uso progesterona o sus análogos, y aquellos que son luteolíticos, usando prostaglandinas (Menchaca and Rubianes, 2004; Wildeus, 2000).

La progesterona y sus análogos sintéticos pertenecen a la familia de los esteroides que se utilizan para simular el efecto de progesterona que realizaría un cuerpo lúteo natural, la cual inhibe la secreción de LH por parte de la adenohipófisis, como consecuencia se inhibe el pico preovulatorio de LH y se bloquea la ovulación (Hansel and Convey, 1983), entonces, si se retira el progestágeno, el ciclo se reanuda en pocos días. En particular, los dispositivos intravaginales impregnados con progestágenos se han usado a partir de los años sesentas para sincronizar el ciclo estral en ovejas (Robinson *et al.*, 1970). Dentro de los dispositivos más utilizados está el CIDR (Controlled Internal Drug Release), que es un implante de silicón que contiene progesterona natural (300 mg), el cual libera el progestágeno de manera prolongada. La progesterona liberada por el CIDR es absorbida hacia la circulación a través de la mucosa vaginal (Greyling and Brink, 1987; Wheaton *et al.*, 1993; Wildeus, 2000), provocando que dos horas después de la colocación del dispositivo ya existan concentraciones séricas de

entre 1.9 a 5.5 ng/mL de progesterona (Ainsworth and Downey, 1986; Hamra *et al.*, 1986; Wheaton *et al.*, 1993). Otro producto utilizado son las esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos sintéticos como el acetato de fluorogestona o ahora llamado cronolona (20 mg) o el acetato de medroxiprogesterona (60 mg). Al igual que la progesterona natural, estos se absorben hacia la circulación para simular la presencia de un cuerpo lúteo (Wildeus, 2000). El acetato de melengestrol es otra presentación de un progestágeno utilizado para el control del ciclo estral, con la diferencia en la vía de administración que es oral, adicionándolo en el alimento, a una dosis de 0.25 mg/individuo/día (Daniel *et al.*, 2001; Gordon, 1975). Tanto la progesterona natural como los progestágenos sintéticos se administran por periodos de 12 a 14 días para permitir la regresión natural de cualquier cuerpo lúteo que estuviera presente al iniciar su administración, a pesar de lo cual, la presencia del progestágeno continua simulando la presencia de un cuerpo lúteo hasta el momento de ser retirado, con aparición del estro, en promedio 48 horas después del retiro de la administración (Abecia *et al.*, 2012; Wildeus, 2000).

Otra forma de sincronizar el estro es ocasionando la lisis del cuerpo lúteo (luteólisis), al aplicar prostaglandina PGF₂α. La administración exógena de esta prostaglandina o alguno de sus análogos sintéticos, son un buen método para provocar la luteólisis, lo que induce el inicio de una fase folicular con su respectiva ovulación (Douglas and Ginther, 1973; McCracken *et al.*, 1979). La PGF₂α se aplican por vía intramuscular y una vez ocurrida la luteólisis, el 99% es transformado por convertasas en metabolitos inactivos al pasar a través de los pulmones (Davis *et al.*, 1980). Se debe recalcar que para que cumplan su función, las prostaglandinas naturales o sintéticas necesitan de un cuerpo lúteo funcional que posea receptores funcionales a dicha hormona, los cuales se presentan a partir de tres a cinco días posteriores a la ovulación (Menchaca and Rubianes, 2004), esta es la razón de administrarla a partir del quinto día del ciclo estral (Rubianes *et al.*, 2003). De manera práctica, cuando no se conoce el día del ciclo

en el que se encuentra la oveja, se implementa un esquema utilizando dos dosis de PGF2 α con 7 días de separación (Abecia *et al.*, 2012; Menchaca and Rubianes, 2004; Rubianes *et al.*, 2003; Wildeus, 2000). Si se presenta la luteólisis, el estro se manifiesta entre 46 a 48 horas después de la aplicación de la hormona, mientras que el pico preovulatorio de LH ocurre a las 62 horas (Wildeus, 2000).

El uso de progestágenos y prostaglandinas en un protocolo combinado, reduce a 5 días el tiempo de inserción del dispositivo vaginal, sin la necesidad de esperar la regresión natural de los cuerpos lúteos. Con este protocolo se espera la presentación del celo en un periodo menor, entre las 36 a 48 horas, después del retiro del dispositivo y la aplicación de la prostaglandina (Abecia A, 2010; Abecia *et al.*, 2012; Wildeus, 2000). El uso del tratamiento de corta duración en ovinos, que va de 5 a 6 días, con el dispositivo intravaginal, más el uso de una prostaglandina tiene como objetivo sincronizar la ovulación, promoviendo un recambio folicular (Menchaca and Rubianes, 2004; Viñoles *et al.*, 2001).

4.5.- Vías metabólicas que intervienen en la foliculogénesis

En lo que se refiere a la influencia nutricional, ésta actúa en diferentes niveles del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal para estimular la foliculogénesis a través de efectos directos o vía metabolitos intermedios (Scaramuzzi *et al.*, 2006). El balance energético negativo en ovinos, bovinos y humanos reduce la pulsatilidad de LH (Jorritsma *et al.*, 2005). En el caso del ovario, se ha visto que tanto glucosa, ácidos grasos y diversos metabolitos tienen influencia directa en el folículo, promoviendo la foliculogénesis (Letelier *et al.*, 2008; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Viñoles *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2004).

El balance energético es el indicador metabólico esencial para la reproducción. Este balance, se vuelve negativo cuando el requerimiento de nutrientes es mayor al consumo neto de nutrientes, momento en el que los individuos utilizan sus reservas energéticas de glucógeno, triglicéridos y proteínas. Cuando este balance

es positivo, el estado metabólico y la partición de nutrientes en el organismo son regulados por una serie de complejos mecanismos e interacciones sanguíneas de hormonas metabólicas, más el flujo de nutrientes en todo el cuerpo para mantener la homeostasis, lo cual también influyen en el sistema reproductivo y en específico en el ovario (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Para demostrar esto, Downing y Scaramuzzi (1997), utilizando hembras bajo condiciones experimentales en estado de hipoglucemia, observaron que el patrón de secreción pulsátil de LH se inhibe. De igual manera una hembra en lactación retrasa o inhibe la ovulación debido al importante gasto energético producto de la producción de leche (Rhodes *et al.*, 1995).

Entre los mediadores relacionados con la foliculogénesis, encontramos a la leptina, la glucosa-insulina, la hormona del crecimiento (GH) y el IGF. Las concentraciones en sangre de leptina, glucosa e insulina están elevadas cuando se presenta un balance energético positivo. En contraste, la GH se eleva durante el balance energético negativo (Downing *et al.*, 1995), con el fin de movilizar reservas de energía, contrarrestando el estado negativo y mandando esta información al folículo (Eckery *et al.*, 1997).

Ahora bien, existe suficiente información que demuestra que la dieta y la condición corporal del individuo tienen influencia en la calidad de los ovocitos (Ferraro, 2011; Fouladi-Nashta *et al.*, 2009, 2007; Garnsworthy *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2011; Viñoles *et al.*, 2001). Es decir, algunas dietas son benéficas para la calidad de los ovocitos, mientras que otras afectan su desarrollo. En el ganado bovino, existe una relación entre la ingesta de nutrientes y la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Se ha demostrado que las dietas ricas en ácidos grasos mejoran el desarrollo de los ovocitos (Fouladi-Nashta *et al.*, 2009, 2007; Garnsworthy *et al.*, 2009). Dicho esto, Garnsworthy *et al.*, (2009) con el uso dietas enriquecidas con ácidos grasos para aumentar las concentraciones de insulina lograron un aumento

en la tasa gestación del 27% al 60%. A continuación se describen brevemente los sistemas y las interacciones metabólicas involucrados en el desarrollo folicular.

4.5.1.- Glucosa - Insulina

La glucosa es el combustible indispensable para el metabolismo de las células y su regulación depende de una serie de vías intracelulares y en específico cuando tiene un efecto directo con insulina (Scaramuzzi *et al.*, 2011; Taniguchi *et al.*, 2006). Para describir la vía a través de la cual interviene la glucosa en el desarrollo folicular, se propusieron tres mecanismos: primero, se sugiere que los cambios en la energía disponible pueden alterar el ambiente endocrino y su capacidad esteroidogénica en los folículos, independientemente de cambios en los transportadores GLUT; segundo, la expresión de transportadores de glucosa en el ovario pueden modificar el consumo de glucosa; y tres, los cambios en las concentraciones circulantes de glucosa e insulina conllevan a un incremento en el consumo de glucosa, modificando la capacidad esteroidogénica, que en parte, puede afectar la función o expresión de transportadores GLUT (R. J. Scaramuzzi *et al.*, 2010).

Se ha descrito un aumento en las concentraciones de transportadores GLUT-1 y GLUT-4, hasta 18 veces mayor en las células de la granulosa en comparación a las células de la teca, siendo que GLUT-4 se regula por insulina. Estas proteínas internalizan glucosa al folículo, actuando como moduladores de la función folicular (Nishimoto, 2006; Williams *et al.*, 2001). El aumento en los transportadores de glucosa corresponde al cambio en la concentración de glucosa en la sangre arterial (58 mg/dL), disminuyendo en sangre venosa (42.3 mg/dL), comprobando el uso de la glucosa por parte del ovario y folículos en desarrollo (Scaramuzzi *et al.*, 2010).

Por otra parte, el páncreas secreta insulina en respuesta al aumento de glucosa en circulación sanguínea, esto supone un incremento en la internalización y

utilización de glucosa e nivel ovárico y folicular (Ferraro, 2011). El folículo presenta proteínas sustrato del receptor a insulina IRS-1, IRS-2 y IRS-4 presentes en células de la granulosa y teca en la oveja (Poretsky *et al.*, 1999; Somchit, 2008) y también se une en un menor grado a receptores de del sistema IGF (Willis and Franks, 1995). Cuando se une la insulina se autofosforila el receptor y se activa la vía de tirosinasa e interactúa con las proteínas IRS (Poretsky *et al.*, 1999). Se ha descrito que las IRS funcionan para activar la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas a través de diferentes sistemas como fosfatasa, quinasas, acción de la cinasa monofosfato de adenosina (AMPK), proteincinasas específicas para serina/treonina (Akt), cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI3K), cinasas reguladas por la señalización extracelular (ERK), fosfatasa PTEN y la vía de las exocinasas, el blanco en mamíferos de la rapamicina (mTOR) (Ryan *et al.*, 2008, 2007; R. Scaramuzzi *et al.*, 2010; Scaramuzzi *et al.*, 2011; Zeleznik *et al.*, 2003).

La importancia de las IRS se demostró en roedores, en donde la supresión del gen para IRS-2 se asoció a la disminución en la foliculogénesis (Neganova *et al.*, 2007). Además de las evidencias *in vitro* en los que actúa durante la foliculogénesis y efectos en la secreción de gonadotropinas (Poretsky and Kalin, 1987), Gutierrez (Gutiérrez *et al.*, 1997) demostró que el uso de IGF-I e insulina tienen un efecto estrogénico en las células de la granulosa. Por otra lado, estudios *in vivo* describe que un aumento agudo de insulina provoca que un mayor número de folículos disminuyendo la expresión de la enzima aromatasa en células de la granulosa (Gallet *et al.*, 2011; Somchit, 2008) y la concentración de estradiol circulante (Gallet *et al.*, 2011; Letelier *et al.*, 2008; Peluso *et al.*, 1984). Con todo lo anterior se puede decir que la insulina realiza funciones esenciales no específicas y específicas de mantenimiento de integridad y salud de las células foliculares y del ovocito (Ferraro, 2011).

4.5.2.- IGF-1

El factor de crecimiento parecido a insulina o IGF es un sistema que se integra por dos ligandos (IGF-I e IGF-II), dos receptores (IGF-IR e IGF-IIR), proteínas de unión para IGF (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 y 6) y al menos una proteasa para las IGFBPs (Kostecka and Blahovec, 1999; Monget *et al.*, 2002). Este factor actúa como un potente estimulador del crecimiento folicular, de la secreción de estradiol y de la proliferación de las células de la granulosa (Scaramuzzi *et al.*, 1999), siendo esencial para la foliculogénesis en la etapa de selección de folículos (Mihm and Evans, 2008). En la borrega este factor de crecimiento actúa en los folículos pequeños (2 mm) incrementando su sensibilidad a gonadotropinas, además, presenta un efecto morfogénico el cual promueve la expresión de receptores a LH reduciendo el tiempo para convertirse en un folículo dependiente de gonadotropinas (Mazerbourg *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009) y para la secreción de progesterona en folículos mayores a 5 mm de diámetro (Monniaux and Pisselete, 1992). Además, estudios *in vivo* en la oveja se logra estimular la secreción de estradiol e inhibina en las células de la granulosa (Campbell *et al.*, 1998). Esto se demostró con la administración exógena de IGF-I en un modelo de ovario autotrasplantado en una oveja, con esto se logra inducir una hiperestimulación de la foliculogénesis y la secreción de estradiol e inhibina (Scaramuzzi *et al.*, 1999).

En el ganado bovino durante la etapa de posparto, en donde se presenta un estado de balance energético negativo, en este momento la concentración circulante de IGF es baja y por lo tanto la foliculogénesis y esteroidogénesis se ve alterada (Gong, 2002). Respecto a esto, se propuso una suplementación de corto plazo que aumenta las concentraciones séricas de IGF, para que actúe a nivel ovárico promoviendo el crecimiento folicular debido a una disminución local de IGFBPs (Viñoles *et al.*, 2005).

Puesto que todo el IGF que llega al ovario es por vía sanguínea (Mazerbourg *et al.*, 2003), es necesario regular las concentraciones de IGF en el líquido

intrafolicular ya que no hay una relación entre el tamaño del folículo y la concentración de IGF en el líquido intrafolicular y esto puede tener efectos nocivos en etapas posteriores (Monget and Monniaux, 1995). Las proteínas encargadas de evitar altas concentraciones de IGFs libres en el líquido intrafolicular son las proteínas de unión a IGF (IGFBP 2, 4 y 5). Conforme avanza el desarrollo folicular las concentraciones de IGFBP 2 y 4 disminuyen, en cambio, cuando los folículos se desvían hacia la atresia aumentan las IGFBPs 2, 4 y 5. Estos cambios en la concentración de IGFBPs durante en el desarrollo sugieren que la modulación externa para la bioavilidad de IGF, determinando la diferenciación entre folículos preovulatorios o atrésicos (Monget *et al.*, 1993).

4.5.3.- Leptina

Esta hormona proteica se produce por los adipocitos y tiene influencia en la función reproductiva (Dyer *et al.*, 1997). La leptina actúa directamente en el hipotálamo para regular el consumo, el balance energético en todo el cuerpo y posee una acción directa a nivel ovárico (Spicer, 2003). La insulina, en su función anabólica, interviene en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, de igual forma se promueve la lipogénesis, activando la secreción de leptina por parte de los adipocitos (Poretsky *et al.*, 1999) y a diferencia de la secreción aguda de insulina, la liberación de leptina es tardía, ya que después del consumo de alimentos se tarda entre 2 a 8 horas para presentarse en concentraciones aumentadas en la circulación sanguínea (Marie *et al.*, 2001).

En la parte reproductiva, se comprobó la presencia del sistema de leptina en el ovario de la oveja (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2008), detectando ARNm para el receptor de leptina (ObRb) en células de la teca, granulosa y en el ovocito sugiriendo funciones parácrinas y autócrinas (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2008). En la oveja se ha que estimula la foliculogénesis (Kendall *et al.*, 2004; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005), presentando una modulación doble en la esteroidogénesis de las células de la granulosa, *in vitro*, en concentraciones bajas

tiene un efecto estimulante (B K Campbell *et al.*, 1999), aunque en estudios *in vivo* (Zachow and Magoffin 1997; Spicer2001) e *in vitro* (Kendall *et al.* 2004) se ha encontrado que inhibe la secreción de estradiol. El mecanismo de acción involucra al sistema IGF, en la estimulación de las células de las granulosa por FSH para la secreción de estradiol (Spicer *et al.*, 2000; Zachow and Magoffin, 1997) así como en la estimulación de LH sobre las células de la teca (Spicer *et al.*, 2000), es decir, si se inmunoneutraliza el factor IGF se revierten los efectos inhibitorios de leptina en cuanto a la producción de estradiol (Sirotkin *et al.*, 2005).

De manera práctica, se ha utilizado la administración exógena de leptina o se estimula su secreción con una suplementación de 5 días de glucosa o grano lupino, para aumentar el número de folículos con receptores ObRb. El resultado de esto *in vivo* es una inhibición en la secreción de estradiol pero en la fase folicular se estimula la foliculogénesis (Kendall *et al.*, 2004; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005). Con el uso de diferentes tipos de suplementación con grano lupino se determinó que las concentraciones elevadas de leptina se aprecian después de 24 horas y durar hasta 72 horas (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005; Viñoles *et al.*, 2005) inhibiendo la enzima aromatasa y así disminuye la producción de estradiol (Ferraro, 2011).

4.5.4.- Cinasa de monofosfato de adenosina (AMPK)

La cinasa de monofosfato de adenosina (AMPK) se considera una hormona metabólica maestra (Scaramuzzi *et al.*, 2011), esta es una cinasa serina/treonina que se activa por un incremento en la relación de monofosfato de adenosina (AMP)/Adenosintrifosfato (ATP) y se asocia al agotamiento de ATP en respuesta al estrés ambiental y nutricional (Hardie, 2004). Su principal acción es metabólica, promoviendo la entrada de glucosa, la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de esteroides (Carling *et al.*, 1987). Este sistema a través de AMPK se ha visto en células de la granulosa, teca y ovocitos (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007; Tosca *et al.*, 2007) en donde inhibe la proliferación de células de la granulosa

inducida por FSH (Kayampilly and Menon, 2009), así como la secreción de estradiol y progesterona (Tosca *et al.*, 2008). Estos efectos se asocian a la inhibición de la vía de señalización de proteincinasa activada por mitógeno (MAPK) y la cinasa regulada extracelularmente (ERK) (Kayampilly and Menon, 2009). Otras hormonas metabólicas y metabolitos que pueden actuar a través de esta vía son glucosa, leptina y en menor grado resistina, adiponectina y ghrelina (Mitchell *et al.*, 2005). Por lo tanto, la vía de señalización de AMPK es un modulador potencial de las interacciones entre el balance de energía y la foliculogénesis (Scaramuzzi *et al.*, 2011).

4.6.- Sobrealimentación

La sobrealimentación o *flushing* es una de las tecnologías reproductivas más antiguas y enfocadas para la eficiencia en producción de crías en ovejas y en cabras (Martin and Kadokawa, 2006; Scaramuzzi and Martin, 2008). Esta tecnología consiste en una suplementación dentro de un plazo breve para aumentar la tasa ovulatoria. El primer reporte científico conocido de la sobrealimentación se da en 1899, cuando se describe que ovejas con mayor peso corporal o alto consumo nutricional tienen una alta probabilidad de tener partos gemelares debido a un aumento en la tasa de ovulación (Heape, 1899).

Con todo lo anterior, se conoce que la nutrición tiene efectos en la foliculogénesis y en diferentes niveles del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. Esto permite la implementación de programas de suplementación con el fin de mejorar la eficiencia reproductiva de los ovinos (Scaramuzzi *et al.*, 2006), (Gaskins *et al.*, 2005; Knight *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 2004). Estos efectos de la suplementación se pueden presentar de tres formas: primero se describe el efecto *estático*, este se presenta en individuos en condiciones de peso corporal ideal a su raza debido a una buena alimentación a largo plazo; el segundo efecto se denomina *dinámico*, aquí se ofrece una suplementación alimenticia de mediano plazo y se observa un incremento en el peso corporal del individuo; por último, encontramos al efecto

agudo, refiriéndose a la suplementación en un periodo extremadamente corto sin que lleguen a mostrar cambios en el peso del individuo (Letelier *et al.*, 2008; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Stewart and Oldham, 1986).

Desde hace tiempo, diversos autores han empleado sustratos energéticos ofrecidos durante 4 a 9 días antes del servicio, con el objetivo de aumentar las concentraciones de glucosa e insulina en sangre y así estimular la foliculogénesis. Estos estudios describen un incremento en el número de folículos de 2 a 3 mm de diámetro en crecimiento con estas dietas energéticas (Downing *et al.*, 1995; Letelier *et al.*, 2008; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Stewart and Oldham, 1986; Viñoles *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2004). Otro método de suplementación es con una única dosis de glicerol al 90% al día 14 del ciclo estral, que tiene el mismo efecto en glucosa e insulina aumentando también la tasa ovulatoria (Gutierrez *et al.*, 2011). Resultados obtenidos por Gutiérrez *et al.* (2011) y Viñoles *et al.* (2005) en ovejas de la raza Pelibuey y Corriedale respectivamente, sugieren que la selección y el desarrollo de los folículos está asociado con un aumento en las concentraciones de glucosa, insulina y leptina. La glucosa y las hormonas metabólicas actúan directamente a nivel de ovario para regular la esteroidogénesis (Kendall *et al.*, 2004; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004; Poretsky *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001).

Posterior a esto, se desarrolló una variante en la técnica, denominada como “flushing ultracorto”; que consiste en una sola administración de una sustancia glucogénica al momento de inducir la luteólisis o al retirar un tratamiento con progestágenos. Con este método se ha logrado incrementar la tasa de ovulación, logrando que en el 89% de las ovejas se presente más de una ovulación, y que un 17.5% presente tres o más ovulaciones (Gutierrez *et al.*, 2011; Martinez, 2004). Para esta técnica ultracorta se requieren de sustancias gluconeogénicas y anti-cetogénicas como son el glicerol y el propilenglicol (Ferraro, 2011; Gutierrez *et al.*, 2011; Kristensen and Raun, 2007; Rémond *et al.*, 1993). Es indispensable sincronizar el estro para así, poder administrar estas sustancias al momento de la

luteólisis, ya que una vez dado este evento, se abre una ventana de 12 horas para el reclutamiento y la selección de folículos potencialmente ovulatorios (Gherardi and Lindsay, 1982; Gutierrez *et al.*, 2011; Viñoles *et al.*, 2001) y el individuo en cuestión presenta un cuadro de hiperglicemia que logra estimular la selección de más de un folículo por las vías que se mencionaron con anterioridad. Cabe mencionar que para obtener los mejores resultados en la tasa ovulatoria el estímulo debe mantener su efecto al menos 10 horas, sin exceder las 24 (Gutierrez *et al.*, 2011).

El tratamiento de sobrealimentación o flushing ultracorto actúa limitando la expresión de ARNm para la aromatasa P450, disminuyendo el sistema de retroalimentación negativa de estradiol a FSH, así, se rescatan folículos antes de su desviación (Ferraro, 2011; Kendall *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2011, 2006). Además, el sistema de glucosa-insulina a través del GLUT 4 internaliza glucosa al ovario para que sea utilizada por los folículos que se están desarrollando (Williams *et al.*, 2001). De igual forma, promueve la liberación de IGF-1 por parte del hígado y leptina por los adipocitos (Scaramuzzi *et al.*, 2011). En consecuencia, el sistema IGF actúa de diversas maneras, degrada las proteínas de unión a IGF en el líquido folicular, estimula la proliferación de células de la granulosa y al mismo tiempo promueve su transición para que se establezca un folículo dominante en menor tiempo, expresando RNAm para LHr (Beg and Ginther, 2006; Luo *et al.*, 2011; Mazerbourg *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009). Otra interacción en la que el sistema IGF actúa es en la esteroidogénesis, estimulando la producción de estradiol e inhibina en todos los folículos de diversos tamaños, así como progesterona en los folículos dominantes (>5 mm) (Campbell *et al.*, 1998; Monniaux and Pisselete, 1992).

Por último tenemos los eventos que promueven la secreción de leptina, esta hormona tiene todo su complejo funcional en el hipotálamo y en los folículos, con efecto en células de la teca, ovocito y células de la granulosa, aunque en estas últimas en menor grado (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2008; Ryan *et*

al., 2002; Spicer, 2003). Esta hormona proteica actúa neutralizando el efecto de IGF-1 para producir estradiol en las células de la granulosa por estímulo de la hormona FSH y la producción de androstenediona en células de la teca por efecto de LH (Ferraro, 2011; Sirotkin et al., 2005; Spicer et al., 2000; Zachow and Magoffin, 1997).

Con todo esto, observar la dinámica folicular al estudiar el funcionamiento de una sobrealimentación ultracorta en un tratamiento de sincronización de estros proporciona una entrada a una tecnología que no dependa del uso de hormonas exógenas y se convierta en una alternativa que podría reemplazar a los tratamientos tradicionales, aumentando la tasa de fertilidad y prolificidad cumpliendo con los principios de una producción limpia, verde y ética (Martin and Kadokawa, 2006; Scaramuzzi and Martin, 2008).

5.- Hipótesis

El uso de glicerol como flushing ultracorto, en combinación con un protocolo de sincronización de estros de corta duración utilizando FGA, aumentará la tasa de ovulación y evitará la presencia de persistencia folicular.

6.- Objetivos

- Determinar la respuesta sobre el desarrollo folicular con uso de glicerol en tratamientos de sincronización usando FGA.
- Describir la dinámica folicular por ultrasonografía en tratamientos de sincronización basados en el uso de FGA.
- Identificar la presencia de folículos persistentes que retrasen la presentación del estro y la ovulación en tratamientos de sincronización con FGA.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1.- Localización

El estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicado en el km 28.5 de la carretera federal a Cuernavaca, delegación Tlalpan, Cd Mx., en la latitud 19° 13' N y 99° 8' O, con una altura de 2,760 metros sobre el nivel del mar. La región tiene un clima semifrío-semihúmedo con lluvias en verano y con una precipitación pluvial de 800 a 1,200 milímetros anuales y una temperatura promedio de 19°C.

7.2.- Metodología

Este estudio se dividió en dos partes, en la primera, se describió la dinámica folicular en tratamientos de sincronización largos y cortos, realizándose en los meses de Junio a Julio de 2017, en plena época reproductiva (Valencia and Roldán, 2013). En la segunda parte, se evaluó la respuesta de estos tratamientos dentro de un protocolo de inseminación a tiempo fijo. Se contó con 60 hembras Pelibuey adultas de 4 a 7 años de edad, multíparas, las cuales se encontraban dentro de un sistema de producción intensivo, en estabulación total y alimentación basada en avena, ensilado de maíz, alfalfa y concentrado de granos.

7.2.1.- Protocolo de sincronización

Los 60 individuos se distribuyeron de forma aleatoria en tres grupos experimentales. La sincronización del estro para el tratamiento largo se estableció en la aplicación de un dispositivo intravaginal con un progestágeno sintético (20 mg de cronolona micronizada) durante 11 días (TLC, n=22); al momento del retiro del dispositivo intravaginal se administró en todas las hembras 125 µg de una prostaglandina sintética (cloprostenol) (Abecia *et al.*, 2012; Escorcía P, 2016; Wildeus, 2000). Para el grupo con tratamiento corto (TCC, n=17), se insertó el

dispositivo intravaginal durante 5 días (Menchaca and Rubianes, 2004) y al retiro de éste se aplicó la prostaglandina sintética en todos los individuos del grupo. Finalmente, el grupo de corta duración con la adición de glicerol (TCG, n=17), se utilizó el mismo protocolo del grupo TCC con la diferencia que al retiro del dispositivo intravaginal además de la prostaglandina, se administraron 50 mL de glicerol diluido en agua (9:1) por vía oral (Gutierrez *et al.*, 2011; Martinez 2004) véase figura 1. En la segunda etapa del experimento se utilizó el mismo protocolo de sincronización del estro con la diferencia en la cantidad de individuos, quedando de esta manera TLC n=20; TCC n=20; TCG n=20.

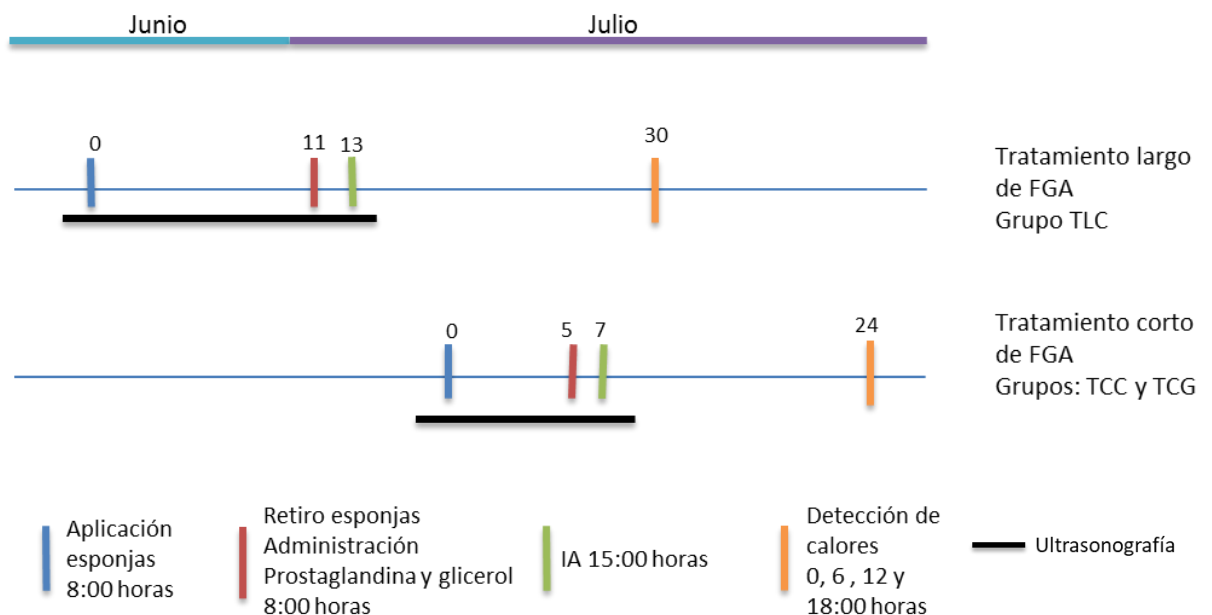


Figura 1.- Calendario del protocolo de sincronización, seguimiento ultrasonográfico, detección de estros e inseminación artificial en los grupos experimentales.

7.2.2.- Seguimiento por ultrasonografía

La ultrasonografía se realizó por vía transrectal, por lo cual se utilizó un equipo Mindray DP-50Vet, con un transductor lineal 75L50EAV a una frecuencia de 7.5 MHz (Salas-Razo *et al.*, 2013b; Viñoles *et al.*, 2004). Para poder describir la dinámica folicular, en todas las ovejas se inició el seguimiento de las estructuras

ováricas, dos días antes del inicio del protocolo de sincronización del estro, realizándose diariamente a lo largo del tratamiento y hasta la formación del cuerpo lúteo (Abecia A, 2010; Evans G *et al.*, 1987). Se contaron las estructuras ováricas en ambos ovarios, además de medir su diámetro en milímetros. Los folículos persistentes se catalogaron cuando emergían con 2 mm de diámetro y alcanzaban una vida media igual o mayor a 9 días o manteniendo la etapa de dominancia con una duración mayor a 6 días con un diámetro superior a 5 mm. Para detectar el momento más cercano a la ovulación, se seleccionaron aleatoriamente 10 individuos de cada grupo experimental, el seguimiento por ultrasonografía se realizó cada 12 horas después del retiro del progestágeno y hasta la formación del cuerpo lúteo (Viñoles *et al.*, 2001). En la segunda parte del experimento, con el objeto de determinar el número de ovulaciones, únicamente se realizó la ultrasonografía al día 9 después de retirado el dispositivo intravaginal, con el objeto de determinar el número de ovulaciones, momento en el cual se encuentra al cuerpo lúteo en el diámetro máximo (Bartlewski, *et al.*, 1999).

7.2.3.- Detección de estro

Para determinar el inicio del estro después del retiro del dispositivo y la duración de esta etapa, se utilizaron 2 machos enteros provistos de un mandil para evitar la cópula. Se ingresaron durante 15 minutos al corral cada 6 horas, desde 22 horas después del retiro del dispositivo; ya que la literatura describe que manifiestan estro entre las siguientes 30-48 horas (Escorcía P, 2016; Wildeus, 2000) hasta finalizado el mismo.

7.2.4.- Inseminación artificial

Todos los grupos se inseminaron vía cervical con semen fresco diluido con leche ultrapasteurizada semidescremada a una concentración de al menos 200 millones de espermatozoides por dosis, en un volumen de 0.15 mL (Escorcía P, 2016; Evans G *et al.*, 1987; Salamon S, 1962).

7.2.5.- Diagnóstico de gestación

Para el diagnóstico de gestación se utilizó en primera instancia el no retorno al estro al día 17, confirmándolo por ultrasonografía al día 35 de la gestación con la visualización de placentomas, vesícula embrionaria o el producto como diagnóstico positivo (Abecia A, 2010).

7.2.6.- Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva en el número y tamaño de los folículos por individuo y por grupo, posteriormente se llevó a cabo un análisis comparativo entre grupos mediante Chi-cuadrada en estas variables y en el número de cuerpos lúteos (Bartlewski, *et al.*, 1999). Para determinar si un folículo fue persistente se categorizaron en dos clases con base en estudios realizados por Scaramuzzi *et al.*, (2011): 1- folículos emergentes de 2 mm de diámetro con una vida de 9 o más días; 2- folículos que alcanzan 5 mm de diámetro y a partir de este punto duran 6 o más días. Para analizar el intervalo entre el retiro del progestágeno y el inicio del celo, el momento de la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, más la duración del estro, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Duncan para comparaciones múltiples y en su caso una prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas, utilizando el programa estadístico SAS/STAT Versión 8.2 (*Procedures Guide SAS Institute Inc*, 2014).

8.- RESULTADOS

En el cuadro 1 se observa el promedio folículos ovulatorios entre grupos en las distintas etapas y total de este experimento. De manera global, el tratamiento corto con glicerol obtuvo el mayor número ($p < 0.05$) de folículos ovulatorios con un promedio de 2.92, mientras que el más bajo fue el tratamiento largo control con un promedio de 1.59 ovulaciones ($p < 0.05$). En la figura 2 se muestran la estructuras que se identificaron determinando su diámetro y duración a lo largo del experimento.

Cuadro 1			
Promedio de los folículos ovulatorios			
Variable (promedio \pm ee)	Largo Control	Corto Control	Corto con glicerol
Folículos ovulatorios (primera etapa)	1.727 ^b ± 0.1971	2.353 ^a ± 0.2242	2.765 ^a ± 0.2242
Folículos ovulatorios (segunda etapa)	1.45 ^a ± 0.1797	2.45 ^b ± 0.1797	3.05 ^c ± 0.1797
Total de folículos ovulatorios	1.5952 ^a ± 0.1328	2.405 ^b ± 0.1415	2.92 ^c ± 0.1415

Literales diferentes por fila indican diferencia estadística.
 $P < 0.05$

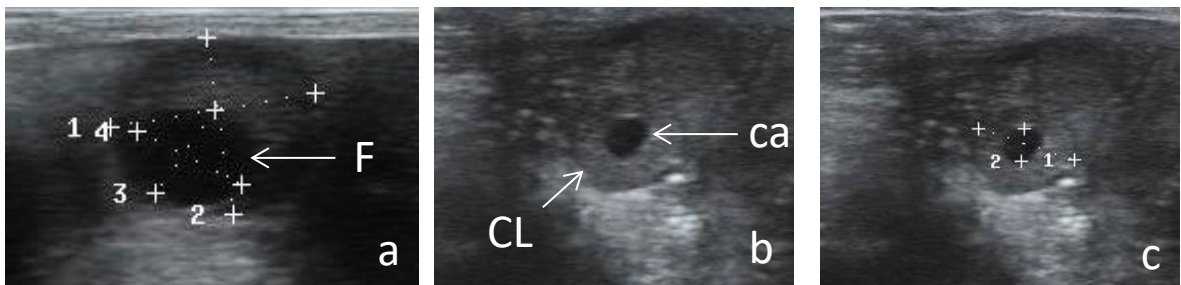


Figura 2.- Reconocimiento de estructuras ováricas: a) ovario con un folículo preovulatorio (F) de 5.5 mm de diámetro; b) y c) cuerpo lúteo funcional (CL) con un diámetro 9.9 mm con cavidad (ca) de 3.2 mm.

Al hacer el análisis de la dinámica folicular durante la primera etapa del experimento, se encontró un mayor número de folículos ovulatorios ($P < 0.05$) en los grupos TCC (2.3) y TCG (2.7) en comparación al grupo TLC (1.7) (cuadro 1). Sin embargo, no se encontró diferencia ($P > 0.05$) en el diámetro de los folículos al momento de la ovulación, entre grupos (cuadro 2). Así mismo, se observó que en los tratamientos cortos un mayor número de folículos ovulatorios se desarrollan después del retiro del dispositivo intravaginal. En cuanto a la presentación de persistencia folicular (cuadro 2), aunque fue una baja incidencia se presentó en todos los grupos sin diferencia entre los mismos. En los grupos TLC, TCC hubo 4 folículos persistentes con una duración igual o mayor a 9 días, mientras que en el TCG se presentaron 8 folículos persistentes. Cabe mencionar que solo uno de estos, alcanzó un diámetro mayor a 5 mm por más de 6 días.

Cuadro 2

Dinámica de los folículos ovulatorios entre grupos experimentales

Variable (promedio \pm ee)	Largo Control	Corto Control	Corto con glicerol
Diámetro de folículos a la ovulación (mm)	5.42 ^a \pm 0.0178	5.07 ^a \pm 0.0202	5.05 ^a \pm 0.0202
Número de folículos ovulatorios reclutados antes del retiro	1.1264 ^a \pm 0.211	1.2941 ^a \pm 0.206	1.4706 ^a \pm 0.193
Número de folículos ovulatorios reclutados después del retiro	0.5909 ^a \pm 0.214	1.00 ^{ab} \pm 0.257	1.2941 ^b \pm 0.206
Número de folículos persistentes por un periodo mayor o igual a 9 días	4 ^a	4 ^a	8 ^a
Total de individuos que presentaron persistencia folicular	4 ^a	3 ^a	6 ^a

Literales diferentes por fila indican diferencia estadística.
 $P < 0.05$

Para la segunda etapa del experimento se determinó un mayor número de ovulaciones en un tratamiento corto con glicerol (3.05) contra los otros dos grupos (TCC=2.45; TCL=1.45; cuadro 1). La fertilidad obtenida en la segunda etapa se muestra en el cuadro 3, el tratamiento corto con glicerina presenta la mayor fertilidad por no retorno a estro, sin embargo, este disminuye drásticamente al día 35 cuando se realiza el diagnóstico por ultrasonografía transrectal, en comparación a los grupos corto y largo control. No hubo diferencia en la prolificidad obtenida entre grupos.

Cuadro 3

Porcentaje de fertilidad y prolificidad en la segunda etapa

Variable	Largo Control	Corto Control	Corto con glicerol
Diagnóstico de gestación por no retorno a estro (17 ± 3 días) (%)	60 ^a	50 ^a	75 ^a
Diagnóstico de gestación por ultrasonido al día 35 después de la inseminación artificial (%)	45 ^a	25 ^{ab}	15 ^b
Fertilidad (%)	45 ^a	25 ^{ab}	15 ^b
Prolificidad	1.33 ^a	1.8 ^a	1.66 ^a

Literales diferentes por fila indican diferencia estadística.

P < 0.05

El grado del desarrollo folicular a lo largo del tratamiento de sincronización en cada grupo se describe en la figura 3, sin encontrarse diferencia entre los mismos y ajustando el día cero como el momento del retiro del dispositivo de progesterona.

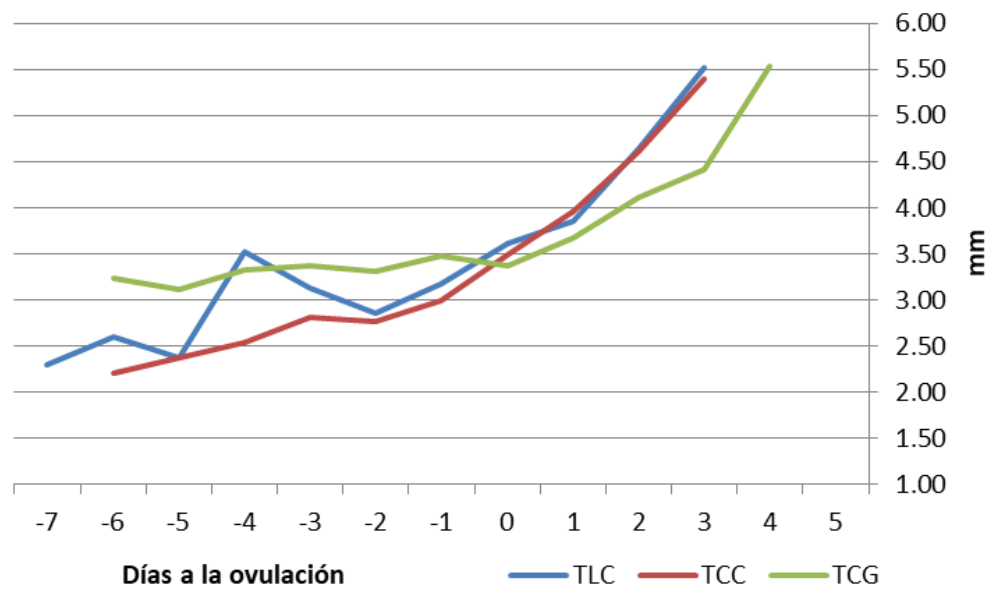


Figura 3.- Diámetro promedio y duración en días de folículos ovulatorios por grupo.

Respecto al protocolo de sincronización en la primera etapa del experimento, la presentación del estro después del retiro del dispositivo fue significativamente menor en el grupo TLC que en los tratamientos de corta duración ($p < 0.05$). La duración del estro no presentó diferencias en los tres grupos, sin embargo, el tiempo transcurrido entre el inicio del estro hasta la ovulación, fue diferente entre los grupos de corta duración ($p < 0.05$), sin ser distintos del grupo de larga duración. Así mismo, la formación del cuerpo lúteo después de la ovulación fue más tardía en el grupo TCC (47.29 h) que los grupos TLC (40.36 h) y TCG (39.53 h; $P < 0.05$). Véase cuadro 4 y anexo figuras 8, 9, y 10 para observar el comportamiento de presentación del estro en cada grupo experimental.

Cuadro 4**Respuesta al protocolo de sincronización**

Variable (horas promedio \pm ee)	Largo Control	Corto Control	Corto con glicerol
Promedio entre el retiro del dispositivo al inicio del estro	49.85 ^a ± 1.77	59.78 ^b ± 1.864	57.2 ^b ± 1.864
Duración del estro	31.36 ^a ± 2.1631	32.82 ^a ± 2.4608	33.20 ^a ± 2.6197
Inicio del estro a ovulación (primera etapa)	27.27 ^{ab} ± 2.33	18.71 ^a ± 2.65	30 ^b ± 2.822
Formación del cuerpo lúteo (primera etapa)	40.36 ^a ± 1.4727	47.29 ^b ± 1.6753	39.53 ^a ± 1.6753

Literales diferentes por fila indican diferencia estadística.

P < 0.05

En la figura 3, 4 y 5 se muestra por grupo (TLC, TCC y TCG, respectivamente) el desarrollo folicular incluyendo los tiempos en respuesta al protocolo de sincronización del estro y la ovulación. Se observa que en el grupo TLC la inseminación se realiza durante el estro, en cambio, en los grupos de corta duración se insemina previo a la presentación de la conducta reproductiva. En los anexos se observa el comportamiento del desarrollo folicular incluyendo la respuesta al protocolo de sincronización del estro y ovulación de cada uno de los individuos de los grupos experimentales.

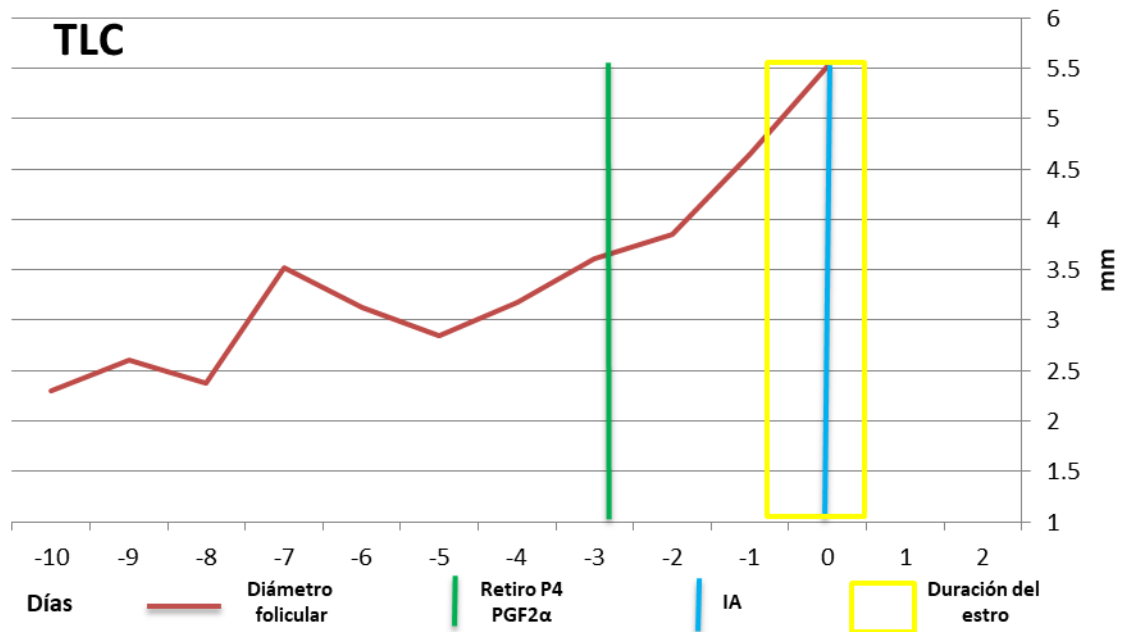


Figura 4.- Crecimiento y duración promedio de los folículos ovulatorios incluyendo la duración promedio del estro y el momento de la inseminación en el grupo TLC, ajustado a la ovulación al día 0.

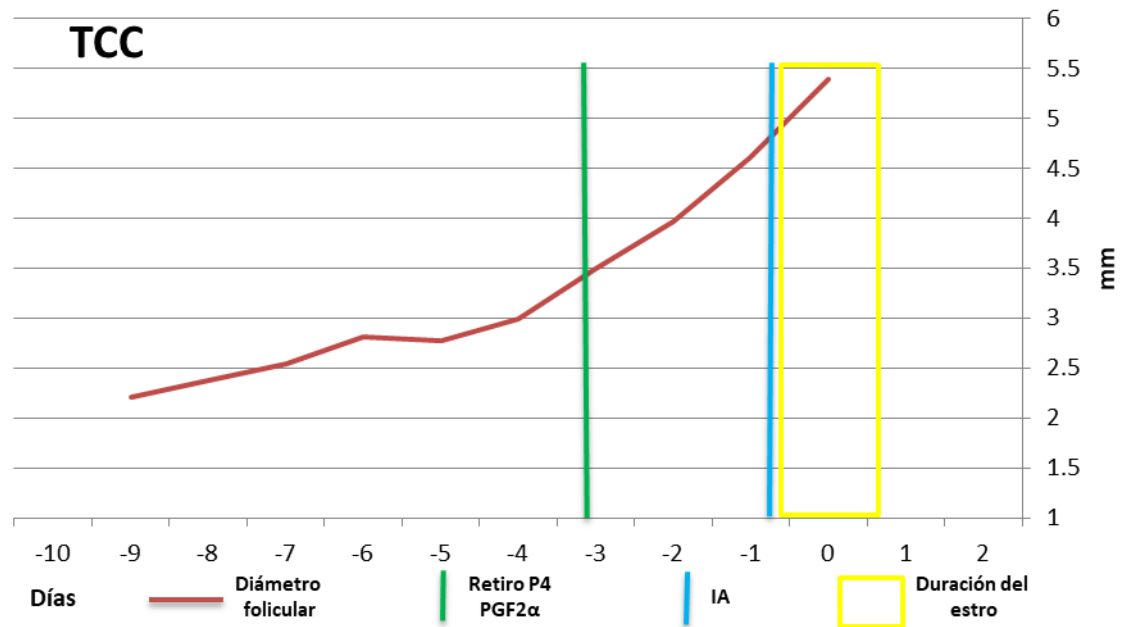


Figura 5.- Crecimiento y duración promedio de los folículos ovulatorios incluyendo la duración promedio del estro y el momento de la inseminación en el grupo TCC, ajustado a la ovulación al día 0.

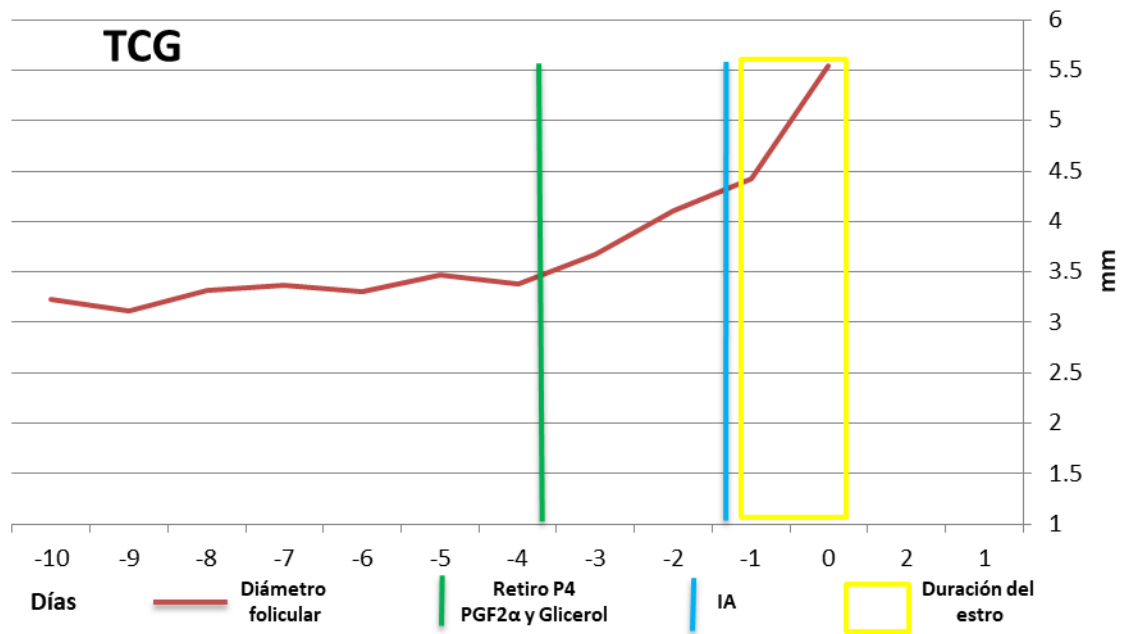


Figura 6.- Crecimiento y duración promedio de los folículos ovulatorios incluyendo la duración promedio del estro y el momento de la inseminación en el grupo TCG, ajustado a la ovulación al día 0.

Las frecuencias en el momento de inseminación respecto a la presentación del estro se desglosan en la figura 7, se muestra un número mayor de individuos inseminados antes que se presente el estro, mientras que dos individuos del grupo TCG no presentaron la conducta reproductiva.

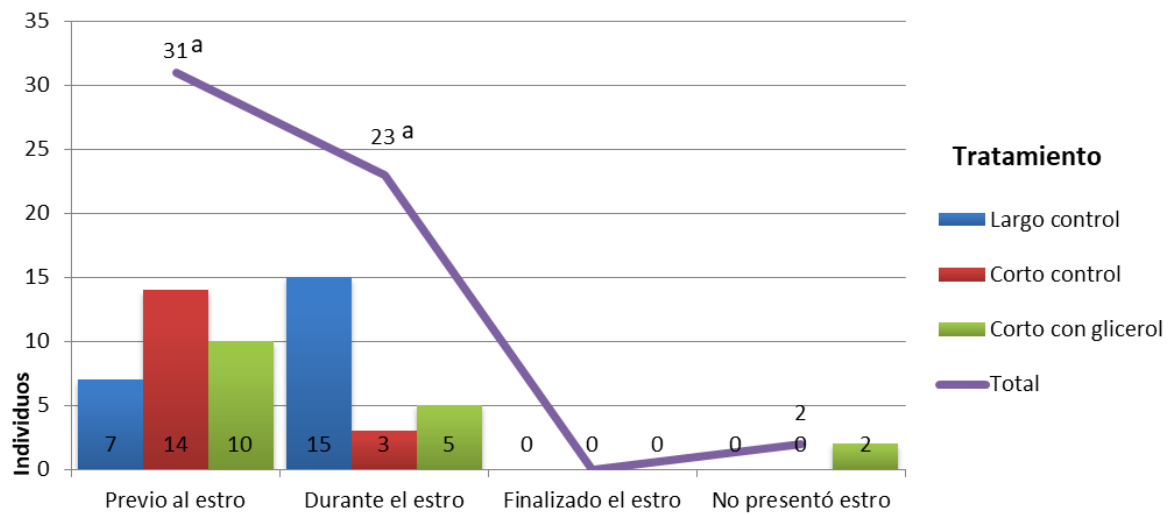


Figura 7.- Recuento del número de animales inseminados respecto al momento de inicio del estro.

Dentro del tratamiento largo control, sucedió un caso de quiste folicular que sin ser un folículo persistente duró 9 días y terminó luteinizándose, con una duración de 12 días como CL, ver figura 8. En la segunda etapa de este trabajo hubo una tendencia a presentar este tipo de situaciones en el tratamiento de larga duración ya que hubo dos casos más.

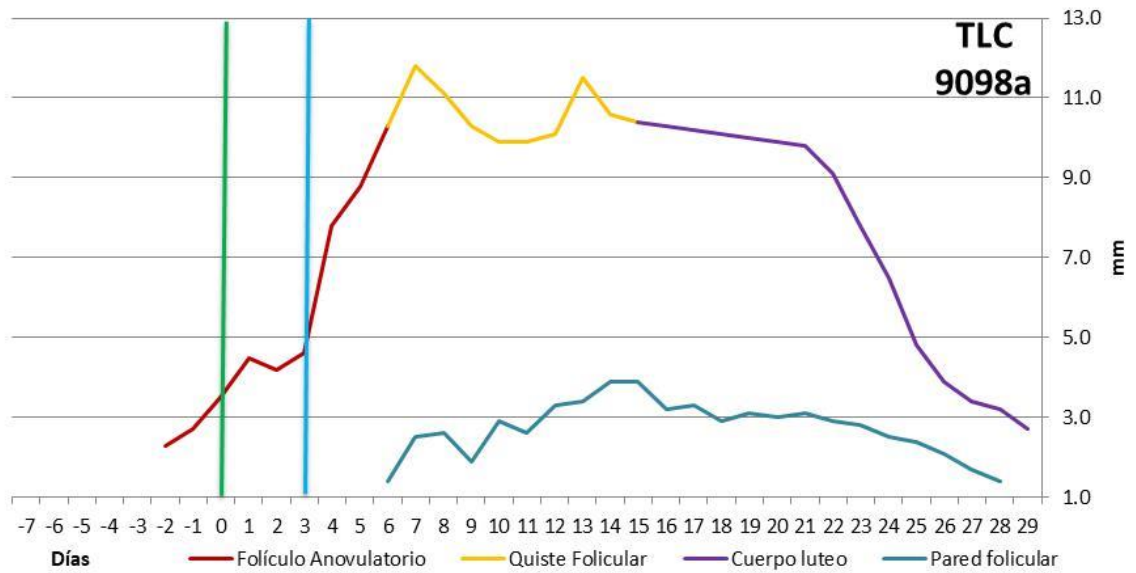


Figura 8.- Desarrollo de un folículo anovulatorio que terminó luteinizándose en un miembro del grupo TLC.

9.- DISCUSIÓN

En este trabajo, en el total de folículos ovulatorios, el máximo valor se obtuvo en el grupo experimental con 2.92, con el uso de 50 mL de glicerol, seguido del tratamiento corto control con 2.40 ovulaciones y por último, el grupo de larga duración, reportando la menor tasa ovulatoria con 1.59. En la segunda etapa de este trabajo en la que encontramos que el grupo TCG era mayor sobre los demás con una tasa ovulatoria de 3.05, seguido del TCC con 2.45 y el menor con 1.45 para el TLC. En comparación, resultados obtenidos por Viñoles *et al.* (2001), indican que el uso de eCG en tratamientos de sincronización disminuye el porcentaje de fertilidad sin importar la duración del tratamiento. Como una alternativa al uso de eCG, Gutierrez *et al.* (2011), refieren que el uso de 50 mL de glicerol aumenta la proporción de ovulaciones dobles a un 78.57%. Estos datos respecto a la tasa ovulatoria, excluyendo al grupo TLC, demuestran que superan el máximo reportado por Gutierrez *et al.* (2011), con 2 ovulaciones utilizando 50 mL de glicerol y un máximo de 2.3 ovulaciones al usar 100 mL de glicerol.

Para promover este aumento en la tasa ovulatoria, Scaramuzzi *et al.* (2011), describen dos modelos para aumentar el desarrollo de folículos potencialmente ovulatorios, evitando su desviación hacia atresia. El primero es aumentar la duración de la ventana para el reclutamiento de folículos responsivos a gonadotropinas, en donde FSH sustente el desarrollo hacia folículos dominantes o dependientes de gonadotropinas (Baird *et al.*, 1981), el segundo modelo consiste en promover un reclutamiento en una ventana aún más breve con el fin de alcanzar la etapa de dominancia folicular en un periodo sincrónico, evitando que un folículo inhiba el desarrollo de los demás, evento denominado co-dominancia (Baird and McNeilly, 1987), sustentando que ambas teorías pueden actuar simultáneamente sin llegar a ser excluyentes.

Teniendo en cuenta lo anterior, diversos autores (Ferraro, 2011; Gutierrez *et al.*, 2011; Martinez, 2004; Menchaca and Rubianes, 2004; Viñoles *et al.*, 2005, 2001),

reportan un aumento en las ovulaciones con distintos tipos de suplementación nutricional. Al emplear una suplementación de corta duración con un sustrato gluconeogénico, se activan los sistemas Glucosa-insulina, IGF-1 y leptina, que en conjunto a gonadotropinas, promueven que un amplio número de folículos alcancen rápido y simultáneamente la dependencia a la LH (Baird and McNeilly, 1987; Ferraro, 2011; Scaramuzzi *et al.*, 2011; Viñoles *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, como se mencionó primeramente, el tratamiento de corta duración utilizando glicerol, aumenta el total de folículos ovulatorios, en comparación a los tratamientos largo y corto control. Sin embargo, al enfocarnos en la primera etapa del experimento, con la dinámica folicular completa, encontramos que el reclutamiento de folículos después del retiro del progestágeno es diferente solo entre los grupos TCG (1.29) y TLC (0.59), sin tener diferencias con el grupo TCC. Para lograr este aumento en la tasa ovulatoria este tratamiento tiene una serie de eventos multifactoriales e independientes que interactúan simultáneamente para su éxito. Scaramuzzi *et al.* (2011), indican que al momento de la luteólisis es cuando se abre una ventana de 12 horas de reclutamiento y se presenta un desarrollo rápido de folículos sensibles a gonadotropinas. Situación que pudo haberse presentado en ambos tratamientos cortos y no permitió establecer diferencias entre los grupos. Por otra parte, Ferraro (2011) describe que la suplementación de ultracorta duración con sustratos gluconeogénico ejerce su efecto durante 10 a no más de 24 horas y debe coincidir con una emergencia folicular al momento de la luteólisis o retiro del progestágeno (Gutierrez *et al.*, 2011; Viñoles *et al.*, 2001), desencadenando el desarrollo folicular, algo que se observa entre los grupos TLC y el TCG.

Lo anterior se puede explicar por dos situaciones, primero, un aumento en el reclutamiento después del retiro del progestágeno resultado del uso en tratamientos de corta duración, y segundo, el efecto del glicerol que se suma al de la corta duración del tratamiento, esto hace que sea evidente el aumento en la

tasa ovulatoria en el tratamiento corto con glicerol (2.76) en comparación al tratamiento largo control (1.72).

Para el caso de persistencia folicular, existe una discrepancia en cuanto a su uso o frecuentemente se confunde con un quiste folicular, ya que no se ha propuesto una definición exacta. Algunos autores determinan la persistencia folicular con base en sus resultados y las diferencias entre tratamientos de sincronización cortos y largos, considerando un folículo persistente desde 6 y hasta 12 días (Flynn *et al.*, 2000; Medan *et al.*, 2004; Viñoles *et al.*, 2001). Debido a esta discrepancia en el amplio rango para determinar si un folículo es persistente, se plantea una adecuación con base en los numerosos estudios realizados por Scaramuzzi *et al.* (2011). Entonces, en el presente estudio se definió a la persistencia folicular como un folículo que, desde que emerge la oleada folicular, establecida cuando el folículo presenta 2 mm de diámetro, alcanza una vida media igual o mayor a 9 días o como un folículo que mantiene la etapa de dominancia con un diámetro superior a 5 mm por un periodo mayor a 6 días, en ambos casos con o sin ovulación.

Una vez dada esta aclaración, se determinó que la persistencia folicular se presentó en los tres grupos experimentales con un rango de presentación entre 17 y 35% sin que la diferencia entre los mismos fuera significativa. Considerando esto, más los datos recabados de folículos ovulatorios, sugieren que el uso de un flushing ultracorto en un tratamiento de sincronización de corta duración, más que promover un recambio folicular, estimula el reclutamiento y la selección de folículos evitando su atresia para que se manifieste la co-dominancia (Menchaca and Rubianes, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2011; Viñoles *et al.*, 2001). A esto, diversos autores (Evans G *et al.*, 1987; Viñoles *et al.*, 2001), asocian esta persistencia folicular a tratamientos de sincronización de larga duración, sin embargo en este trabajo se presenta en todos los grupos sin diferencia estadística lo que sugiere que esta persistencia folicular podría ser un evento casual y no provocado por el tratamiento de sincronización. Este dato es relevante por el

hecho en que no importa si se utiliza algún tratamiento de sincronización sino que resulta contraproducente en la calidad del ovocito si se presenta la persistencia folicular. Como ejemplo, se ha visto que en bovinos si un folículo persiste por más de 9 días, una vez dada la fertilización cuando el embrión llega a un estadio de 16 células se presenta muerte embrionaria temprana, suponiendo fallas al momento de la implantación (Ahmad *et al.*, 1995; Mihm *et al.*, 1999, 1994; Revah and Butler, 1996).

A diferencia de un folículo persistente, en un quiste folicular se aprecia un engrosamiento de la pared folicular (Simoes *et al.*, 2009). Estos quistes son causantes de infertilidad y se relacionan con una ausencia o falla en el pico preovulatorio de LH, manteniendo un desarrollo anovulatorio de gran tamaño (Wiltbank *et al.*, 2002). En la primera etapa de este trabajo se presentó un individuo en el tratamiento de larga duración, con un folículo que sin ser persistente, al cabo de 8 días de desarrollo anovulatorio se convirtió en un quiste folicular, engrosando sus paredes y después de 9 días, estas células de la granulosa completaron el proceso de luteinización, derivando a una estructura visual a la ultrasonografía como un cuerpo lúteo (ver anexo, figura 68). Este evento se repitió en la segunda etapa del experimento, en dos individuos dentro del grupo TLC, esta luteinización ha sido reportado sin la utilización de un tratamiento de sincronización (Bartlewski, *et al.*, 1999). Al igual que en la persistencia folicular, esto probablemente ocurre por una baja en el recambio folicular, debido a un descenso en las concentraciones de progesterona o a la baja absorción del progestágeno al final del tratamiento de larga duración (Hamra *et al.*, 1986; Menchaca and Rubianes, 2004). Por otra parte, contrario a este hecho, Viñoles *et al.* (2001) han descrito la presentación de quistes foliculares en tratamientos de sincronización de corta duración (6 días) al emplear eCG, mas no lo asocian con la elevada concentración de 17β -estradiol a consecuencia de folículos persistentes.

Al ser analizado el tiempo de presentación del estro, se determinó que en los tratamientos cortos sin importar el uso de glicerol, la conducta receptiva se retrasó en comparación al tratamiento de larga duración como se aprecia en las figuras 4 a la 6. Es importante mencionar este aspecto, ya que al emplear protocolos de inseminación a tiempo fijo, el tiempo óptimo para la inseminación artificial es entre las 55 y 56 horas después del retiro del progestágenos (Evans G *et al.*, 1987) o de 8 a 14 horas de iniciado el estro (Balcázar J, 2013), con el fin de realizarlo en un tiempo próximo a la ovulación. Se sabe que la ovulación ocurre entre 18 a 30 horas después de iniciado el estro o 48 horas después del retiro del progestágeno (Galina and Valencia, 2010; Rangel and Hernández, 2018; Viñoles *et al.*, 2001). Al presentarse este retraso se ve afectado el momento de la ovulación y por ende altera la ventana de tiempo para que se lleve a cabo la fertilización, ya que tanto el ovocito como los espermatozoides tienen un tiempo de vida fértil que va de 16 a 24 horas y 30 a 48 horas respectivamente, en dado caso de no coincidir en el mismo periodo se disminuye la fertilidad (Galina and Valencia, 2010; Rangel and Hernández, 2018).

En los grupos de corta duración hubo individuos que en la detección del estro con el macho, suspendieron la conducta reproductiva desde 12 y hasta 36 horas. Esto se ha asociado al aumento en concentraciones de cortisol como respuesta al estrés fisiológico crónico que retrasa pero no inhibe el pico preovulatorio de LH (Wagenmaker *et al.*, 2009) por el manejo ultrasonográfico. En estrés psicosocial y ausencia de esteroides gonadales el cortisol insensibiliza la adenohipófisis al estímulo de GnRH a través del receptor de glucocorticoides tipo II. En presencia de esteroides gonadales, se inhibe la producción de GnRH y se suma al efecto inhibitorio en la adenohipófisis. Cabe mencionar que un estrés agudo no tiene efecto alguno sobre la secreción del pico de LH (Ralph *et al.*, 2016). Si bien no se ha dilucidado el método de acción del cortisol en el hipotálamo, se propone que actúa en las células KNDY (Ralph *et al.*, 2016), incrementando la secreción de dinorfina y disminuyendo la de kisspeptina y neuroquinina. Sin embargo, esta vía

interrumpiría el ciclo completo, inhibiendo el patrón cíclico y por ende la ovulación, no solo la receptividad hacia el macho. A esto, la expresión conductual de receptividad en el ratón se ha visto asociada a la presencia de receptores β a estradiol en el NPV (Sasayama *et al.*, 2017; Weiser and Handa, 2009), tal vez indicando que aunque exista todo el mecanismo ovulatorio regulado por $ER\alpha$, la receptividad al macho se regula por un sistema secundario. Otra teoría para explicar este evento es un falla en la detección del celo siendo un 62% de efectividad con el macho celador (Quintal *et al.*, 1988), aunque en este trabajo se ocuparon cuatro sementales, rotándolos cada turno, utilizando dos cada vez, con el objetivo de evitar esta situación.

Por último, un evento que se debe estudiar con mayor énfasis es la calidad del ovocito que se obtiene bajo este tratamiento, es decir, que capacidad posee de ser fertilizado, de llevar a cabo una implantación adecuada y una gestación a término. Aunque este tratamiento de flushing ultracorto no tiene la capacidad de promover una superovulación (Gutierrez *et al.*, 2011; Martinez, 2004), al ser comparado con lo obtenido utilizando distintos protocolos en combinación de hormonas como tratamiento superovulatorio (pFSH, pLH, eCG), en donde se ha reportado una tasa ovulatoria desde 8.16 ± 3.21 con un máximo de 15.66 ± 3.21 , mucho mayor a un tratamiento con el uso de glicerol obteniendo 2.76 ovulaciones. Sin embargo, no se ha logrado obtener la misma cantidad de embriones con la calidad necesaria para ser transferidos, ya que con estos tratamientos solo se recuperan entre 2.33 a 2.83, siendo considerable la reducción de embriones aptos para ser transferidos o congelados (García-Salas *et al.*, 2017).

En suma, esta técnica de sobrealimentación ultracorta con glicerol presenta un aumento importante en la tasa ovulatoria y tiene aspectos trascendentales que han dado paso a nuevas investigaciones acerca de la vía de acción y en donde poner atención, con el fin de mejorar no solo el número de ovulaciones, más aún, la calidad de los ovocitos que faciliten una gestación exitosa. Incluso, se convierte en una tecnología orientada a producciones limpias verdes y éticas al ser una

técnica que evita el uso de hormonales sintéticos y todos sus efectos secundarios (Bodin *et al.*, 1997; Martin and Kadokawa, 2006; Roy *et al.*, 1999a, 1999b).

10.- CONCLUSIONES

Con las condiciones de este trabajo se concluye que en la oveja Pelibuey un tratamiento de corta duración con Acetato de Fluorogestona y prostaglandina, aumenta el número de ovulaciones por ciclo y retrasa la presentación de la conducta reproductiva. Mas, si se adiciona glicerol como sobrealimentación ultracorta, permite un desarrollo rápido de un número mayor de folículos ovulatorios muy cercano al momento de la ovulación, si se compara con un protocolo de sincronización largo, pero no evita que se presente persistencia folicular.

Sin importar la duración del tratamiento, existe persistencia folicular y en tratamientos largos se presentan quistes foliculares.

11.- LITERATURA CITADA

- Abecia A, F.F., 2010. Manejo reproductivo en ganado ovino. Asis Biomédicas, Zaragoza, España.
- Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A., 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 173–179.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Acosta, T.J., Hayashi, K.-G., Matsui, M., Miyamoto, A., 2005. Changes in Follicular Vascularity during the First Follicular Wave in Lactating Cows. *J. Reprod. Dev.* 51, 273–280.
<https://doi.org/10.1262/jrd.16092>
- Aerts, J., Bols, P., 2010. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>
- Ahmad, N., Schrick, N., Butcher, R., Inskip, E., 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52, 1129–1135.
- Ainsworth, L., Downey, B., 1986. A controlled internal drug-release dispenser containing progesterone for control of the estrous cycle of ewes. *Theriogenology* 26, 847–856.
- Armstrong, D., Gong, J.G., Webb, R., 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reprod. Suppl.* 61, 403–414.
- Baillet, A., Mandon-Pépin, B., Cabau, C., Pומרol, E., Pailhoux, E., Cotinot, C., 2008. Identification of transcripts involved in meiosis and follicle formation during ovine ovary development. *BMC Genomics* 9, 436. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-436>
- Baird, D., Campbell, B.K., Mann, G., McNeilly, A., 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 43, 125–138.
- Baird, D., McNeilly, A., 1987. Widening the “gate” by infusion of FSH before luteal regression in Welsh Mountain Ewes increases ovulation rate increases. Presented at the In ‘Neuroendocrinology of Reproduction: Proceedings of VIth Reiner de Graaf Symposium Nijmegen, Netherlands, pp. 68–73.
- Baird, D., Swanston, I., McNeilly, A., 1981. Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol. Reprod.* 24, 1013–1025.
- Baird, D.T., 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *Reproduction* 69, 343–352. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690343>
- Balcazar J, A.J., 2013. Apuntes Sobre Reproducción del Ovino, in: Especialización En Producción Animal: Ovinos. UNAM México D. F., pp. 25–35.
- Bao, B., Garverick, H.A., 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1903. <https://doi.org/10.2527/1998.7671903x>
- Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Spinaci, M., Bacci, M.L., Forni, M., Mattioli, M., 2000. Vascular Endothelial Growth Factor Production in Growing Pig Antral Follicles. *Biol. Reprod.* 63, 858–864. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.858>
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C., 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Reproduction* 115, 111–124. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150111>

- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Rawlings, N.C., 1999. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52, 115–130. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00114-4)
- Bartlewski, P.M., Vanderpol, J., Beard, A.P., Cook, S.J., Rawlings, N.C., 2000. Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 273–291. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00092-5)
- Beg, M.A., Ginther, O.J., 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132, 365–377. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01233>
- Berisha, B., Sinowatz, F., Schams, D., 2004. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 162–171. <https://doi.org/10.1002/mrd.10386>
- Bilodeau-Goeseels, S., Sasseville, M., Guillemette, C., Richard, F., 2007. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 74, 1021–1034.
- Bodin, L., Drion, P., Remy, B., Brice, G., Cognié, Y., Beckers, J., 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reprod. Nutr. Dev.* 37, 651–660. <https://doi.org/10.1051/rnd:19970604>
- Buratini, J., Price, C.A., 2011. Follicular somatic cell factors and follicle development. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 32. <https://doi.org/10.1071/RD10224>
- Campbell, B., Dobson, H., Scaramuzzi, R., 1998. Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *J. Endocrinol.* 156, 213–222. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1560213>
- Campbell, B., Souza, C., Gong, J., Webb, R., Kendall, N., Marsters, P., Robinson, G., Mitchell, A., Telfer, E., Baird, D., 2003. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction* 61, 429–443.
- Campbell, B.K., 2009. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe 13.
- Campbell, B. K., Dobson, H., Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J., 1999. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *Reproduction* 117, 355–367. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170355>
- Campbell, B K, Gutiérrez, C., Armstrong, D., Webb, R., Baird, D., 1999. Leptin: in vitro and in vivo evidence for direct effects on the ovary in monoovulatory ruminants. *Hum. Reprod.* 14, 15–16.
- Campbell, B.K., Kendall, N.R., Baird, D.T., 2007. The Effect of the Presence and Pattern of Luteinizing Hormone Stimulation on Ovulatory Follicle Development in Sheep1. *Biol. Reprod.* 76, 719–727. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053462>
- Campbell, B.K., Telfer, E.E., Webb, R., Baird, D.T., 2004. Evidence of a Role for Follicle-Stimulating Hormone in Controlling the Rate of Preantral Follicle Development in Sheep. *Endocrinology* 145, 1870–1879. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1138>
- Carling, D., Zammit, V.A., Hardie, D.G., 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* 223, 217–222. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80292-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80292-2)
- Daniel, J.A., Sterle, S.W., McFadin-Buff, E.L., Keisler, D.H., 2001. Breeding ewes out-of-season using melengestrol acetate, one injection of progesterone, or a controlled internal drug

- releasing device. *Theriogenology* 56, 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00546-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00546-5)
- Davis, A., Fleet, I., Harrison, F., Maule Walker, F., 1980. Pulmonary metabolism of prostaglandin F₂ α in the conscious non-pregnant ewe and sow. *J Physiol* 301, 86.
- Douglas, R., Ginther, O., 1973. Luteolysis following a single injection of PGF₂ α in sheep. *J Anim Sci* 37, 990–993.
- Downing, J.A., Joss, J., Connell, P., Scaramuzzi, R.J., 1995. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J. Reprod. Fertil.* 103, 137–145.
- Downing, J.A., Scaramuzzi, R.J., 1997. The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH and glucose in ewes. *Theriogenology* 47, 747–759. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00031-9)
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211–1239. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00479-4)
- Driancourt, M.A., Cahill, L.P., Bindon, B.M., 1985. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *Reproduction* 73, 93–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0730093>
- Drummond, A.E., 2005. TGF β signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res.* 322, 107–115. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1153-1>
- Durlinger, A.L.L., Gruijters, M.J.G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T.J., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P.N., 2002. Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary. *Endocrinology* 143, 1076–1084.
- Dyer, C.J., Simmons, J.M., Matteri, R.L., Keisler, D.H., 1997. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14, 295–303. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(97\)00028-3](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(97)00028-3)
- Echternkamp, S.E., Roberts, A.J., Lunstra, D.D., Wise, T., Spicer, L.J., 2004. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. *J Anim Sci* 82, 459–471.
- Eckery, D.C., Moeller, C.L., Nett, T.M., Sawyer, H.R., 1997. 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.* 57, 507–513. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.3.507>
- Escorcía P, 2016. Efecto de distintos protocolos de inseminación artificial cervical con semen fresco sobre la fertilidad de la oveja pelibuey. UNAM, Ciudad de México.
- Evans, A.C.O., 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 289–306. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00096-4)
- Evans, A.C.O., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P., 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, 699–715. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00268-X)
- Evans G, Maxwell W, Salamon S, 1987. Salamon's artificial insemination of sheeps and goats.
- Ferraro, S., 2011. Estudio de los mecanismos moleculares y endócrinos involucrados en la regulación de la tasa ovulatoria en ovejas por administración de una solución glucogénica. UNAM, México, D.F.

- Flynn, J.D., Duffy, P., Boland, M.P., Evans, A.C.O., 2000. Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 285–296. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00124-X)
- Fortune, J.E., 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 135–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)
- Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R., 2007. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows1. *Biol. Reprod.* 77, 9–17. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058578>
- Fouladi-Nashta, A.A., Wonnacott, K.E., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Sinclair, K.D., Garnsworthy, P.C., Webb, R., 2009. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. *REPRODUCTION* 138, 771–781. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0391>
- Galina, C., Valencia, J., 2010. *Reproducción de animales domésticos*, 3a ed. Limusa, México DF.
- Gallet, C., Dupont, J., Campbell, B.K., Monniaux, D., Guillaume, D., Scaramuzzi, R.J., 2011. The infusion of glucose in ewes during the luteal phase increases the number of follicles but reduces oestradiol production and some correlates of metabolic function in the large follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.017>
- García-Salas, A., Cortez-Romero, C., Salazar-Ortiz, J., Arroyo-Ledezma, J., Ruíz-Vera, V., Vaquera-Huerta, H., Gallegos-Sánchez, J., 2017. Administration of exogenous hormones in ovulatory and embryonic response in Pelibuey sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 52, 446–451. <https://doi.org/10.1111/rda.12930>
- Garnsworthy, P.C., Fouladi-Nashta, A.A., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R., 2009. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. *REPRODUCTION* 137, 759–768. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0488>
- Garverick, H., Baxter, G., Gong, J., Armstrong, D., Campbell, B., Gutierrez, C., Webb, R., 2002. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 123, 651–661.
- Gaskins, C.T., Snowder, G.D., Westman, M.K., Evans, M., 2005. Influence of body weight, age, and weight gain on fertility and prolificacy in four breeds of ewe lambs1. *J. Anim. Sci.* 83, 1680–1689. <https://doi.org/10.2527/2005.8371680x>
- Gherardi, P., Lindsay, D., 1982. Response of ewes to lupin supplementation at different times of the breeding season. *Aust. J. Exp. Agric.* 22, 264. <https://doi.org/10.1071/EA9820264>
- Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J., Kot, K., 2000. Selection of the Dominant Follicle in Cattle: Role of Estradiol1. *Biol. Reprod.* 63, 383–389. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.383>
- Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J., Kot, K., 1999. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of fsh concentrations. *Theriogenology* 52, 1079–1093. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00196-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00196-X)
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 187–200. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90084-5)

- Ginther, O.J., Kot, K., Wiltbank, M.C., 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43, 689–703. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00074-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00074-5)
- Gong, J.G., 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 229–241. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00159-5](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00159-5)
- Gordon, I., 1975. THE USE OF PROGESTAGENS IN SHEEP BRED BY NATURAL AND ARTIFICIAL INSEMINATION. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 15, 303–315. <https://doi.org/10.1051/rnd:19750219>
- Greyling, J.P.C., Brink, W.C.J., 1987. Synchronization of oestrus in sheep: The use of controlled internal drug release (CIDR) dispensers, in: *S Afr J Anim Sci.* p. 5.
- Gutiérrez, C.G., Campbell, B.K., Webb, R., 1997. Development of a Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture System: Induction and Maintenance of Estradiol Production, Response to Follicle-Stimulating Hormone, and Morphological Characteristics¹. *Biol. Reprod.* 56, 608–616. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.3.608>
- Gutierrez, C.G., Ferraro, S., Martinez, V., Saharrea, A., Cortez, C., Lassala, A., Basurto, H., Hernandez, J., 2011. Increasing ovulation quota: more than a matter of energy. *Acta Sci. Vet.* 12.
- Hamra, A.H., Massri, Y.G., Marcek, J.M., Wheaton, J.E., 1986. Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-controlled internal drug-release dispensers, implants and sponges. *Anim. Reprod. Sci.* 11, 187–194. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(86\)90120-X](https://doi.org/10.1016/0378-4320(86)90120-X)
- Hansel, W., Convey, E.M., 1983. PHYSIOLOGY OF THE ESTROUS CYCLE. *J Anim Sci* 57, 404–424.
- Hardie, D.G., 2004. The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 117, 5479–5487. <https://doi.org/10.1242/jcs.01540>
- Heape, W., 1899. Abortion, barrenness and fertility in sheep. *J R. Agric Soc* 10, 217–248.
- Hillier, S.G., 2001. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179, 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00469-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00469-5)
- Hillier, S.G., 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 9, 188–191. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138480>
- Hsueh, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C., Welsh, T.H., 1984. Hormonal Regulation of the Differentiation of Cultured Ovarian Granulosa Cells*. *Endocr. Rev.* 5, 76–127. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-76>
- Jorritsma, R., Langendijk, P., Kruip, T., Wensing, T., Noordhuizen, J., 2005. Associations between Energy Metabolism, LH Pulsatility and First Ovulation in early Lactating Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 68–72. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00558.x>
- Joyce, I., Clarck, A., Pendola, F., Eppig, J., 2000. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 63, 1669–16.
- Karsch, F.J., 1984. Endocrine and environmental control of the oestrous cyclicity in sheep. *Reprod. Sheep Lindsay DR Pearce DT Camb. Univ* 10–15.
- Karsch, F.J., Legan, S., Ryan, K., Foster, D., 1980. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 23, 404–413.
- Kayampilly, P.P., Menon, K.M.J., 2009. Follicle-Stimulating Hormone Inhibits Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Activation and Promotes Cell Proliferation of

- Primary Granulosa Cells in Culture through an Akt-Dependent Pathway. *Endocrinology* 150, 929–935. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1032>
- Kendall, N.R., Gutierrez, C.G., Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T., Webb, R., Campbell, B.K., 2004. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 128, 757–765. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00256>
- Kezele, P., Nilsson, E.E., Skinner, M.K., 2005. Keratinocyte Growth Factor Acts as a Mesenchymal Factor That Promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition. *Biol. Reprod.* 73, 967–973. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043117>
- Knight, P.G., Glister, C., 2006. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191–206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Knight, T., Oldham, C., Lindsay, D., 1975. Studies in ovine infertility in agricultural regions in Western Australia: the influence of a supplement of lupins (*Lupinus angustifolius* cv. Uniwhite) at joining on the reproductive performance of ewes. *Aust. J. Agric. Res.* 26, 567. <https://doi.org/10.1071/AR9750567>
- Kostecka, Z., Blahovec, J., 1999. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEINS AND THEIR FUNCTIONS (MINIREVIEW). *Endocr. Regul.* 33, 90–94.
- Kristensen, N.B., Raun, B.M.L., 2007. Ruminal and Intermediary Metabolism of Propylene Glycol in Lactating Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4707–4717. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0295>
- Lara, P.E., Canché, M.C., Marrufo, N.B., 2007. Restricted grazing of Pelibuey ewes in protein banks of mulberry 30, 12.
- Letelier, C., Mallo, F., Encinas, T., Ros, J.M., Gonzalez-Bulnes, A., 2008. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *REPRODUCTION* 136, 65–72. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0010>
- Leyva, V., Buckrell, B.C., Walton, J.S., 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen 22.
- Lucy, M.C., 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 85, E89–E99. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-663>
- Lundy, T., Smith, P., O’Connel, A., Hudson, N., McNatty, K., 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115, 251–262.
- Luo, W., Gumen, A., Haughian, J.M., Wiltbank, M.C., 2011. The Role of Luteinizing Hormone in Regulating Gene Expression During Selection of a Dominant Follicle in Cattle. *Biol. Reprod.* 84, 369–378. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085274>
- Marie, M., Findlay, P., Thomas, L., Adam, C., 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J. Endocrinol.* 170, 277–286. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700277>
- Martin, G.B., Kadokawa, H., 2006. “Clean, Green and Ethical” Animal Production. Case Study: Reproductive Efficiency in Small Ruminants. *J. Reprod. Dev.* 52, 145–152. <https://doi.org/10.1262/jrd.17086-2>
- Martinez, V., 2004. Efecto del tratamiento con una solución glucogénica oral sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, México, CDMX.
- Mazerbourg, S., Bondy, C., Zhou, J., Monget, P., 2003. The Insulin-like Growth Factor System: a Key Determinant Role in the Growth and Selection of Ovarian Follicles? A Comparative Species

- Study. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 247–258. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00440.x>
- McCracken, J., Carlson, J., Glew, M., Goding, J., Baird, D., Green, K., Samuelsson, B., 1979. Prostaglandin F_{2α} identified as a Luteolytic Hormone in Sheep. *Nature. New Biol.* 238, 129–134.
- Mcgee, E.A., Hsueh, A.J.W., 2000. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles 21, 15.
- McNatty, K., Health, D., Lundy, T., Fidler, A., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N., Tisdall, D., 1999. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 54, 3–16.
- McNatty, K., Reader, K., Smith, P., Health, D., Juengel, J., 2007. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. *Soc. Reprod. Fertil.* 64, 55–68.
- McNatty, K.P., Fidler, A.E., Juengel, J.L., Quirke, L.D., Smith, P.R., Heath, D.A., Lundy, T., O'Connell, A., Tisdall, D.J., 2000. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 11–20. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00235-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00235-X)
- McNatty, K.P., Gibb, M., Dobson, C., Ball, K., Coster, J., Heath, D., Thurley, D.C., 1982. Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. *Reproduction* 65, 111–123. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0650111>
- McNeilly, A., 1992. Luteinizing hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 45, 5–19.
- Medan, M.S., Watanabe, G., Sasaki, K., Taya, K., 2004. Transrectal ultrasonic diagnosis of ovarian follicular cysts in goats and treatment with GnRH. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.03.006>
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 403. <https://doi.org/10.1071/RD04037>
- Mihm, M., Curran, N., Hyttel, P., Boland, M.P., Roche, J.F., 1994. Resumption of meiosis in cattle oocytes from preovulatory follicles with a short and a long duration of dominance. *J. Reprod. Fertil.* 13.
- Mihm, M., Curran, N., Hyttel, P., Knight, P.G., Boland, M.P., Roche, J.F., 1999. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *Reproduction* 116, 293–304. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160293>
- Mihm, M., Evans, A., 2008. Mechanisms for Dominant Follicle Selection in Monovulatory Species: A Comparison of Morphological, Endocrine and Intraovarian Events in Cows, Mares and Women. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01142.x>
- Mitchell, M., Armstrong, D.T., Robker, R.L., Norman, R.J., 2005. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130, 583–597. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00521>
- Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J.-M., Mazerbourg, S., Pisselet, C., Monniaux, D., 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 139–154. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00152-2)
- Monget, P., Monniaux, D., 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 321–333.
- Monget, P., Monniaux, D., Pisselet, C., Durand, P., 1993. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 132, 1438–1446.

- Monniaux, D., Pisselete, C., 1992. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro.pdf. *Biol. Reprod.* 46, 109–119.
- Montgomery, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H., McNatty, K.P., 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 121, 843–852.
- Muñoz-Gutiérrez, M., Blache, D., Martin, G.B., Scaramuzzi, R.J., 2004. 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* 128, 747–756. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00439>
- Muñoz-Gutiérrez, M., Finlay, P., Adam, C., Wax, G., Campbell, B.K., Kendall, N.R., Khalid, M., Forsberg, M., Scaramuzzi, R.J., 2005. The effect of leptin on folliculogenesis and the follicular expression of mRNA encoding aromatase, IGF-IR, IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5, leptin receptor and leptin in ewes. *Reproduction* 130, 869–881.
- Neganova, I., Al-Qassab, H., Heffron, H., Selman, C., Choudhury, A.I., Lingard, S.J., Diakonov, I., Patterson, M., Ghatei, M., Bloom, S.R., Franks, S., Huhtaniemi, I., Hardy, K., Withers, D.J., 2007. Role of Central Nervous System and Ovarian Insulin Receptor Substrate 2 Signaling in Female Reproductive Function in the Mouse¹. *Biol. Reprod.* 76, 1045–1053. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059360>
- Nilsson, E., Skinner, M., 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8, 17–20.
- Nishimoto, H., 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J. Endocrinol.* 188, 111–119. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06210>
- Otsuka, F., Shimasaki, S., 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8060–8065. <https://doi.org/10.1073/pnas.122066899>
- Partida, J.A., Martínez, L., 2010. Body composition in Pelibuey lambs in terms of feed energy concentration and slaughter weight. *Vet. México* 41, 177–190.
- Peluso, J., Downey, M., Gruenberg, M., 1984. Role of LH pulse amplitude in controlling rat ovarian oestradiol-17 β secretion in vitro. *Reproduction* 71.
- Picton, H.M., 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55, 1193–1210. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00478-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00478-2)
- Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21, 495–504. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90411-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90411-4)
- Pisani, L.F., Antonini, S., Pocar, P., Ferrari, S., Brevini, T.A.L., Rhind, S.M., Gandolfi, F., 2008. Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *REPRODUCTION* 136, 303–312. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0394>
- Pisarska, M.D., Bae, J., Klein, C., Hsueh, A.J.W., 2004. Forkhead L2 Is Expressed in the Ovary and Represses the Promoter Activity of the Steroidogenic Acute Regulatory Gene. *Endocrinology* 145, 3424–3433. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1141>
- Plendl, J., 2000. Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary *. *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med. Ser. C* 29, 257–266. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2000.00265.x>
- Poretsky, L., Cataldo, N., Rosenwaks, Z., Giudice, L., 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr. Rev.* 20, 535–582.
- Poretsky, L., Kalin, M.F., 1987. The Gonadotropic Function of Insulin*. *Endocr. Rev.* 8, 132–141. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-2-132>

- Procedures Guide SAS Institute Inc, 2014. . SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Qu, J., Godin, P., Nisolle, M., Donnez, J., 2000. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.* 15, 302–310. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.302>
- Quintal, J., Heredia, M., Rodriguez, O., 1988. Detección del estro en un rebaño de ovejas pelibuey con utilización de hembras androgenizadas. *Tec Pec Mex* 16, 1–7.
- Ralph, C.R., Lehman, M.N., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., 2016. Impact of psychosocial stress on gonadotrophins and sexual behaviour in females: role for cortisol? *Reproduction* 152, R1–R14. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0604>
- Rangel, L., Hernández, J., 2018. *Fisiología Reproductiva de los animales domésticos*, 1a ed. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rémond, B., Souday, E., Jouany, J.P., 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41, 121–132. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90118-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90118-4)
- Revah, I., Butler, W.R., 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Reproduction* 106, 39–47. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060039>
- Rhodes, F., Fitzpatrick, L., Entwistle, K., Kinder, J., 1995. Pulsatile hormone secretion during the first ovarian follicular wave in *Bos indicus* heifers. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 523–526.
- Rivera, G.M., Chandrasekher, Y.A., Evans, A.C.O., Giudice, L.C., Fortune, J.E., 2001. A Potential Role for Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Proteolysis in the Establishment of Ovarian Follicular Dominance in Cattle1. *Biol. Reprod.* 65, 102–111. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.102>
- Rivera, G.M., Fortune, J.E., 2001. Development of Codominant Follicles in Cattle Is Associated with a Follicle-Stimulating Hormone-Dependent Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease1. *Biol. Reprod.* 65, 112–118. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.112>
- Robinson, R.S., Woad, K.J., Hammond, A.J., Laird, M., Hunter, M.G., Mann, G.E., 2009. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *REPRODUCTION* 138, 869–881. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0283>
- Robinson, T., Moore, N., Lindsay, D., Fletcher, I., Salamon, S., 1970. Fertility following synchronization of oestrus in the sheep with intravaginal sponges. I. Effects of vaginal douche, supplementary steroids, time of insemination, and numbers and dilution of spermatozoa. *Aust. J. Agric. Res.* 21, 767. <https://doi.org/10.1071/AR9700767>
- Roy, F., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Pobel, T., Delétang, F., Combarous, Y., Guillou, F., Maurel, M.-C., 1999a. Humoral Immune Response to Equine Chorionic Gonadotropin in Ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and Interference with Subsequent Fertility1. *Biol. Reprod.* 61, 209–218. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.209>
- Roy, F., Maurel, M.-C., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Delétang, F., Combarous, Y., Guillou, F., 1999b. The Negative Effect of Repeated Equine Chorionic Gonadotropin Treatment on Subsequent Fertility in Alpine Goats Is Due to a Humoral Immune Response Involving the Major Histocompatibility Complex1. *Biol. Reprod.* 60, 805–813. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.4.805>
- Rubianes, E., 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas Fisiol.* 6, 93–103.

- Rubianes, E., Menchaca, A., Carbajal, B., 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00046-0)
- Ryan, K.E., Casey, S.M., Canty, M.J., Crowe, M.A., Martin, F., Evans, A.C.O., 2007. Akt and Erk signal transduction pathways are early markers of differentiation in dominant and subordinate ovarian follicles in cattle. *Reproduction* 133, 617–626.
- Ryan, K.E., Glistler, C., Lonergan, P., Martin, F., Knight, P.G., Evans, A.C., 2008. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *J. Ovarian Res.* 1, 1–2. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-1-2>
- Ryan, N.K., Woodhouse, C.M., Van der Hoek, K.H., Gilchrist, R.B., Armstrong, D.T., Norman, R.J., 2002. Expression of Leptin and Its Receptor in the Murine Ovary: Possible Role in the Regulation of Oocyte Maturation. *Biol. Reprod.* 66, 1548–1554. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1548>
- Salamon S, 1962. Studies on the artificial insemination of Merino sheep. III. The effect of frequent ejaculation on semen characteristics and fertilizing capacity 13, 1137–1150.
- Salas-Razo, G., Rojo-Martínez, J.A., Garcidueñas-Piña, R., Pablo, J., Perea-Peña, M., Espinoza-Villavicencio, J., 2013a. Effect of Prolonged Treatment with Melengestrol Acetate (MGA) on the Persistence or Non-Persistence of Ovarian Follicles in Ewes 3, 3.
- Salas-Razo, G., Rojo-Martínez, J.A., Gutiérrez-Vázquez, E., Juárez-Caratachea, A., Garcidueñas-Piña, R., Espinoza-Villavicencio, J., 2013b. Follicular Dynamic in Ewes during Melengestrol Acetate (MGA) Treatment 3, 4.
- Sasayama, D., Sugiyama, N., Yonekubo, S., Pawlak, A., Murasawa, H., Nakamura, M., Hayashi, M., Ogawa, T., Moro, M., Washizuka, S., Amano, N., Hongo, K., Ohnota, H., 2017. Novel oestrogen receptor β -selective ligand reduces obesity and depressive-like behaviour in ovariectomized mice. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04946-5>
- Sawyer, H., Smith, P., Heath, D., Juengel, J., McNatty, K., 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66, 1134–1150.
- Scaramuzzi, R., Adams, N., Baird, D., Campbell, B., Downing, J., Findlay, J., Henderson, K., Martin, G., McNatty, K., McNeilly, A., Tsonis, C., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 459. <https://doi.org/10.1071/RD9930459>
- Scaramuzzi, R., Brown, H., Dupont, J., 2010. Nutritional and Metabolic Mechanisms in the Ovary and Their Role in Mediating the Effects of Diet on Folliculogenesis: A Perspective: Nutrient Sensing Mechanisms in the Follicle. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 32–41. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01662.x>
- Scaramuzzi, R., Martin, G., 2008. The Importance of Interactions Among Nutrition, Seasonality and Socio-sexual Factors in the Development of Hormone-free Methods for Controlling Fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01152.x>
- Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T., Campbell, B.K., Driancourt, M.-A., Dupont, J., Fortune, J.E., Gilchrist, R.B., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S., Monget, P., Monniaux, D., Viñoles, C., Webb, R., 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 444. <https://doi.org/10.1071/RD09161>
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M., Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the

- concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 339–354. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006016>
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Souza, C.J.H., Baird, D.T., 2010. Glucose uptake and lactate production by the autotransplanted ovary of the ewe during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle. *Theriogenology* 73, 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.005>
- Scaramuzzi, R.J., Murray, J.F., Downing, J.A., Campbell, B.K., 1999. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17, 269–277. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(99\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(99)00043-0)
- Schmidt, D., Ovitt, E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A., Treier, M., 2004. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933–942. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>
- Schrick, N., Surface, A., Pritchard, J., Dailey, R., Townsend, E., Inskeep, I., 1993. Ovarian Structures during the Estrous Cycle and Early Pregnancy in Ewes¹. *Biol. Reprod.* 49, 1133–1140. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.5.1133>
- Seekallu, S.V., Toosi, B.M., Duggavathi, R., Barrett, D.M.W., Davies, K.L., Waldner, C., Rawlings, N.C., 2010. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology* 73, 670–680. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.007>
- Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., van den Hurk, R., 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71, 1193–1208. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.015>
- Simoes, J., Gérard, B., Azevedo, J., Mascarenhas, R., 2009. Ovarian cysts (persistent follicles) and ultrasonographic texture of uterus in a nulliparous and a primiparous goats. *Veterinaria.com.pt* 1, 1–8.
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.
- Sirotkin, A.V., Mlynček, M., Kotwica, J., Makarevich, A.V., Florkovičová, I., Hetényi, L., 2005. Leptin Directly Controls Secretory Activity of Human Ovarian Granulosa Cells: Possible Inter-Relationship with the IGF/IGFBP System. *Horm. Res. Paediatr.* 64, 198–202. <https://doi.org/10.1159/000089009>
- Somchit, A., 2008. The physiological regulation of folliculogenesis by the glucose-insulin system and by perturbation of the follicular negative feedback system (PhD Thesis). University of London.
- Souza, C., MacDougall, C., Campbell, B., McNeilly, A., Baird, D., 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. *J. Endocrinol.* 169, R1–R6. <https://doi.org/10.1677/joe.0.169r001>
- Spicer, L.J., 2003. The Effect of Leptin on Ovarian Steroidogenesis, in: Henson, M.C., Castracane, V.D. (Eds.), *Leptin and Reproduction*. Springer US, Boston, MA, pp. 97–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0157-2_6
- Spicer, L.J., Chamberlain, C.S., Francisco, C.C., 2000. Ovarian Action of Leptin: Effects on Insulin-Like Growth Factor-I-Stimulated Function of Granulosa and Thecal Cells. *Endocrine* 12, 53–60. <https://doi.org/10.1385/ENDO:12:1:53>
- Stewart, R., Oldham, C., 1986. Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Anim Prod Aust* 16, 367–370.

- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- Thomas, F.H., Campbell, B.K., Armstrong, D.G., Telfer, E.E., 2007. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reproduction* 133, 1121–1128. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0382>
- Toosi, B.M., Seekallu, S.V., Pierson, R.A., Rawlings, N.C., 2009. Evaluation of the ultrasound image attributes of developing ovarian follicles in the four follicular waves of the interovulatory interval in ewes. *Theriogenology* 72, 902–909. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.006>
- Torres, A.M.R., Sánchez, A.G., 2011. Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 3, 89–111.
- Tosca, L., Chabrolle, C., Dupont, J., 2008. L'ampk : un lien entre métabolisme et reproduction ? *médecine/sciences* 24, 297–300. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008243297>
- Tosca, L., Chabrolle, C., Uzbekova, S., Dupont, J., 2007. Effects of Metformin on Bovine Granulosa Cells Steroidogenesis: Possible Involvement of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK)1. *Biol. Reprod.* 76, 368–378. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055749>
- Trombly, D.J., Woodruff, T.K., Mayo, K.E., 2009. Suppression of Notch Signaling in the Neonatal Mouse Ovary Decreases Primordial Follicle Formation. *Endocrinology* 150, 1014–1024. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0213>
- Turnbull, K., Braden, A., Mattner, P., 1977. The Pattern of Follicular Growth and Atresia in the Ovine Ovary. *Aust. J. Biol. Sci.* 30, 229. <https://doi.org/10.1071/BI9770229>
- Valencia, J., Roldán, A., 2013. La estacionalidad reproductiva y la producción animal. La oveja Pelibuey: una opción. Presented at the Curso de Actualización en Ganadería, FMVZ, Organismo de Certificación Ganadera (OCEGAN), pp. 1–5.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993–1004. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00460-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00460-5)
- Viñoles, C., Forsberg, M., Martin, G.B., Cajarville, C., Repetto, J., Meikle, A., 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129, 299–309. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00536>
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., 2004. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 69–79. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00141-6)
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E., 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51, 1351–1361. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00079-5)
- Wagenmaker, E.R., Breen, K.M., Oakley, A.E., Pierce, B.N., Tilbrook, A.J., Turner, A.I., Karsch, F.J., 2009. Cortisol Interferes with the Estradiol-Induced Surge of Luteinizing Hormone in the Ewe1. *Biol. Reprod.* 80, 458–463. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074252>
- Walters, D., Schams, D., Bullerman, B., Schallenberger, E., 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 71, 479–491.

- Walters, K.A., Binnie, J.P., Campbell, B.K., Armstrong, D.G., Telfer, E.E., 2006. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction* 131, 515–523. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00682>
- Wang, J.X., Warnes, G.W., Davies, M.J., Norman, R.J., 2004. Overweight infertile patients have a higher fecundity than normal-weight women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 81, 1710–1712. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.10.037>
- Webb, R., Armstrong, D.G., 1998. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livest. Prod. Sci.* 53, 95–112. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(97\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00161-9)
- Webb, R., Campbell, B., 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Reprod. Domest. Rumin.* 6, 141–163. <https://doi.org/10.5661/RDR-VI-141>
- Webb, R., Campbell, B., Garverick, H., Gong, J.G., Gutierrez, C., Armstrong, D., 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 33–48.
- Webb, R., Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., Armstrong, D., 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 82, E63–E74.
- Webb, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Campbell, B.K., Garverick, H., Armstrong, D., 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 61, 71–90.
- Weiser, M.J., Handa, R.J., 2009. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience* 159, 883–895. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.058>
- Wheaton, J.E., Carlson, K.M., Windels, H.F., Johnston, L.J., 1993. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 127–141. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90111-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90111-4)
- Wildeus, S., 2000. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 77, 1. <https://doi.org/10.2527/jas2000.00218812007700ES0040x>
- Williams, S.A., Blache, D., Martin, G.B., Foot, R., Blackberry, M.A., Scaramuzzi, R.J., 2001. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 122, 947–956.
- Willis, D., Franks, S., 1995. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3788–3790.
- Wiltbank, M.C., Gümen, A., Sartori, R., 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57, 21–52. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00656-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00656-2)
- Yang, M.Y., Fortune, J.E., 2008. The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth In Vitro Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes1. *Biol. Reprod.* 78, 1153–1161. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066688>
- Zachow, R., Magoffin, D., 1997. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138, 847–850.

- Zeleznik, A.J., Saxena, D., Little-Ihrig, L., 2003. Protein Kinase B Is Obligatory for Follicle-Stimulating Hormone-Induced Granulosa Cell Differentiation. *Endocrinology* 144, 3985–3994.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0293>
- Zimmermann, R.C., Xiao, E., Bohlen, P., Ferin, M., 2002. Administration of Antivascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Antibody in the Early Follicular Phase Delays Follicular Selection and Development in the Rhesus Monkey. *Endocrinology* 143, 2496–2502.

12.- ANEXOS

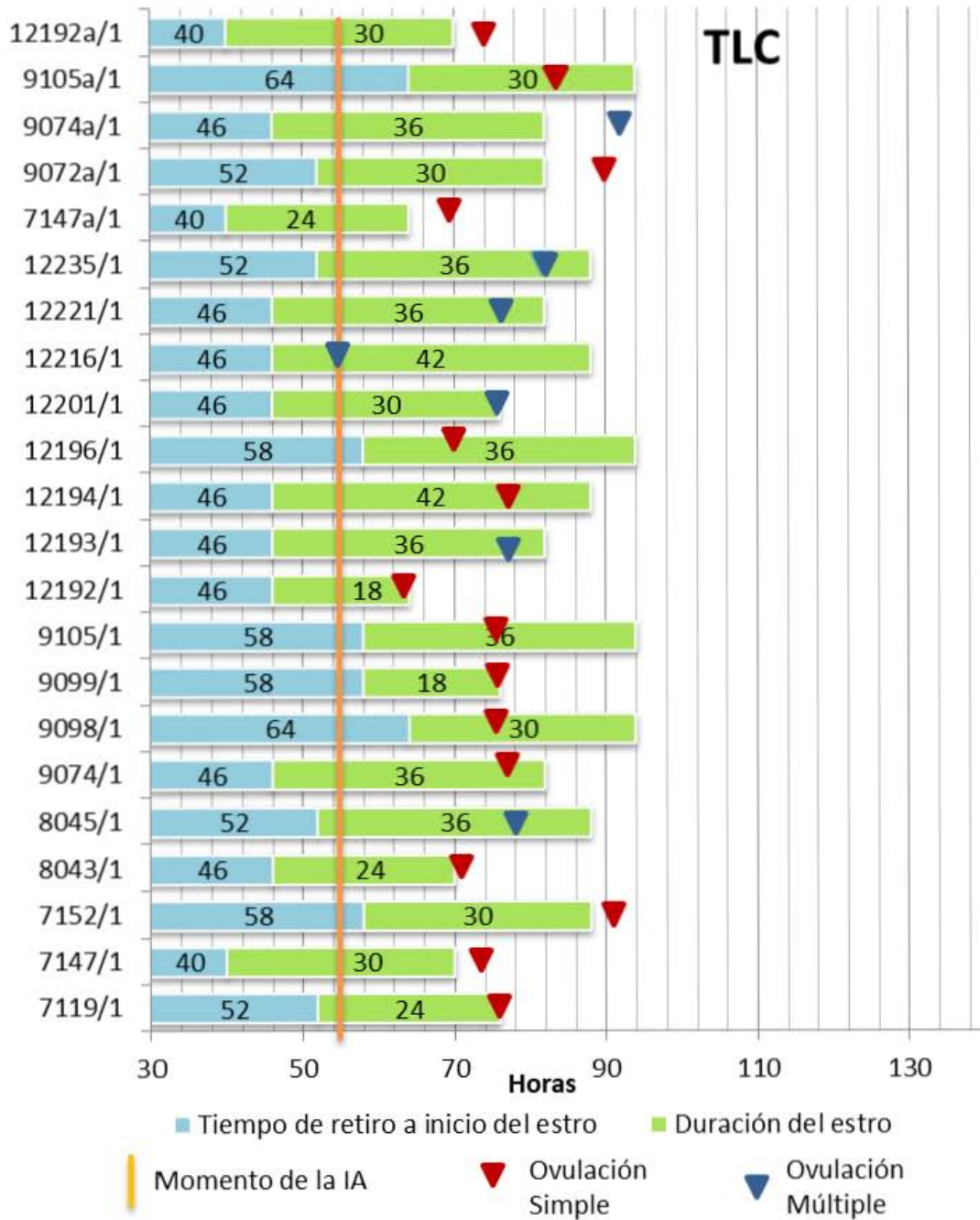


Figura 9.- Comportamiento individual del grupo TLC incluyendo tiempos para el inicio y duración del estro, momento de la inseminación y tipo de ovulación.

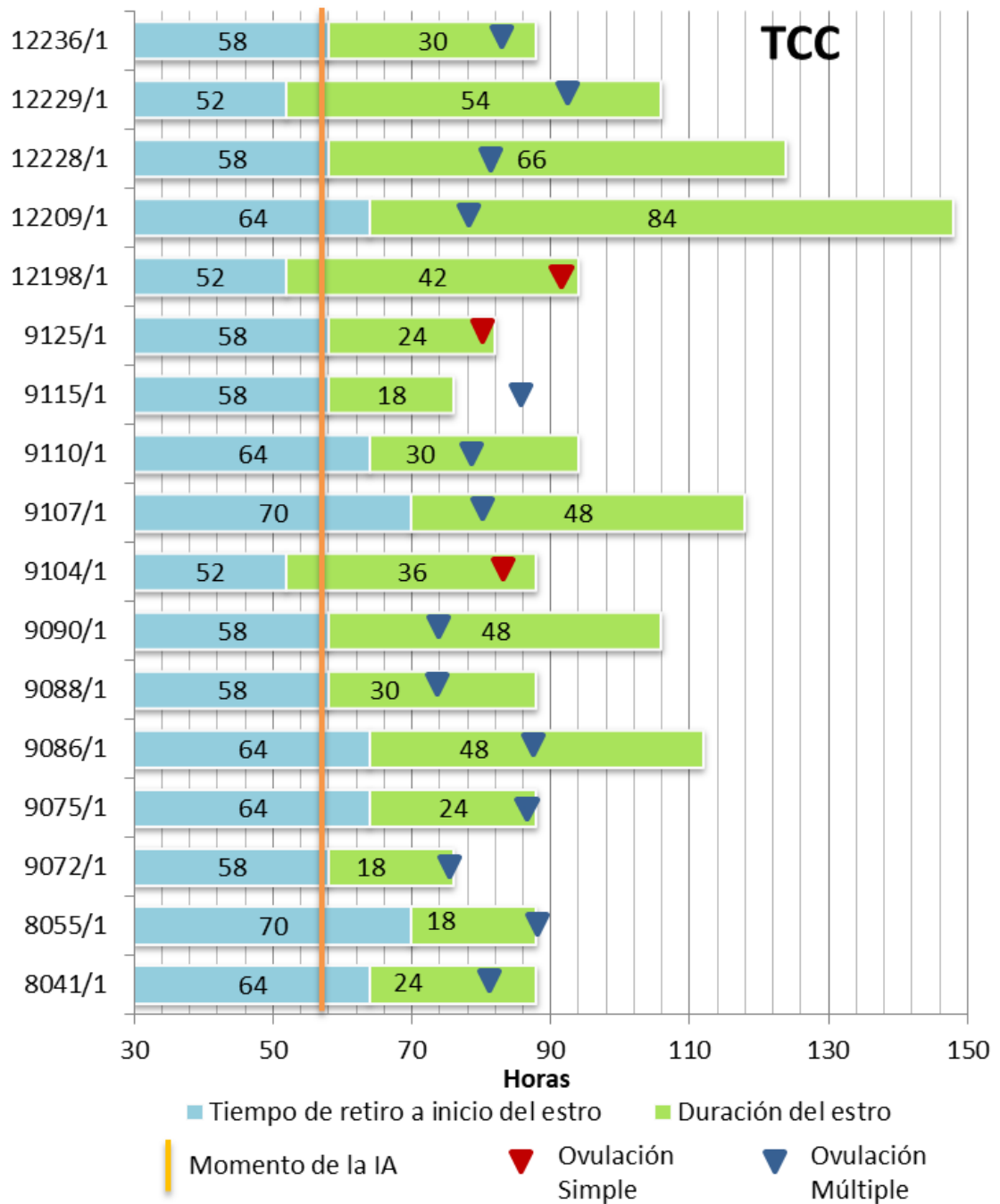


Figura 10.- Comportamiento individual del grupo TCC incluyendo tiempos para el inicio y duración del estro, momento de la inseminación y tipo de ovulación.



Figura 11.- Comportamiento individual del grupo TCG incluyendo tiempos para el inicio y duración del estro, momento de la inseminación y tipo de ovulación.

Desarrollo folicular ovulatorio individual por grupos

A continuación se muestra de manera individual la dinámica de cada folículo ovulatorio en los tres grupos experimentales (TLC, TCC y TCG). Se representa el crecimiento de cada folículo ovulatorio con una línea de diferente color dependiendo de su diámetro y oleada folicular emergente de la que proviene: Oleada más cercana al estro folículo de mayor tamaño (O1O1); Oleada más cercana al estro folículo de tamaño medio (O1O2); Oleada más cercana al estro folículo de menor tamaño (O1O3); Oleada lejana al estro folículo de mayor tamaño (O2O1) y Oleada lejana al estro folículo de menor tamaño (O2O2).

Tratamiento largo control:

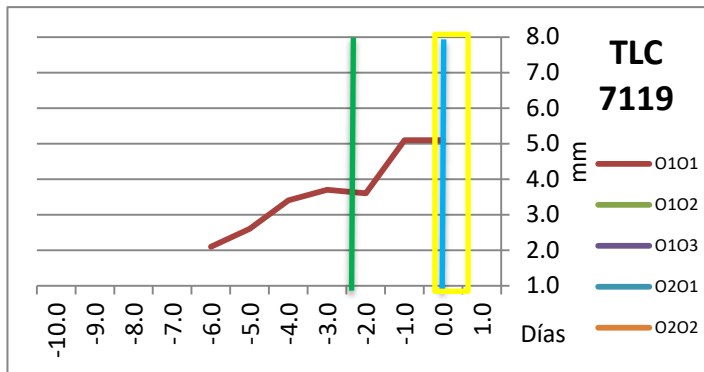


Figura 12.- Crecimiento y duración del folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TLC (7119), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

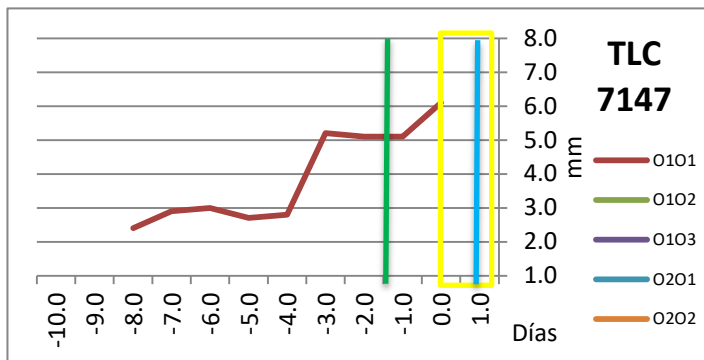


Figura 13.- Crecimiento y duración del folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TLC (7147), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

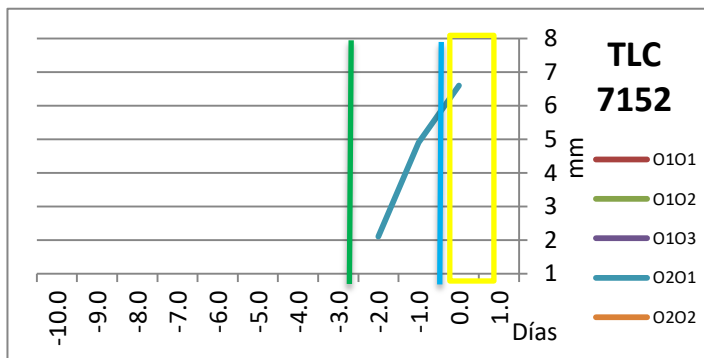


Figura 14.- Crecimiento y duración del folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TLC (7152), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

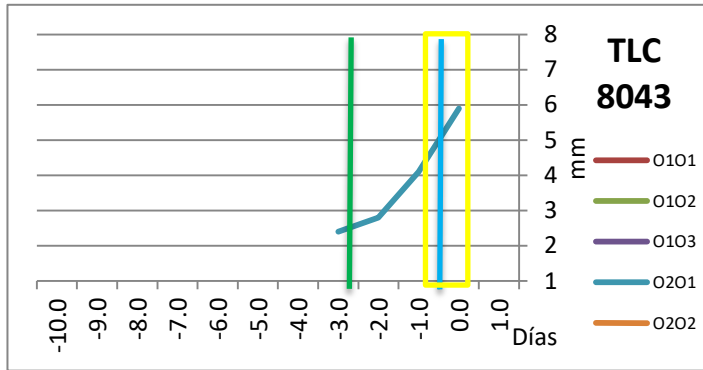


Figura 15.- Crecimiento y duración del folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TLC (8043), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

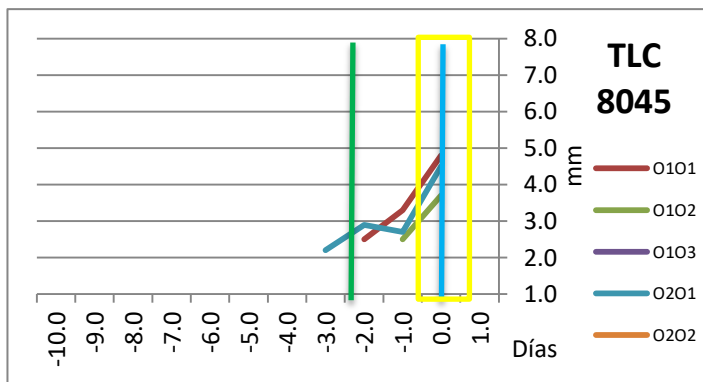


Figura 16.- Crecimiento y duración de 3 folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TLC (8045), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

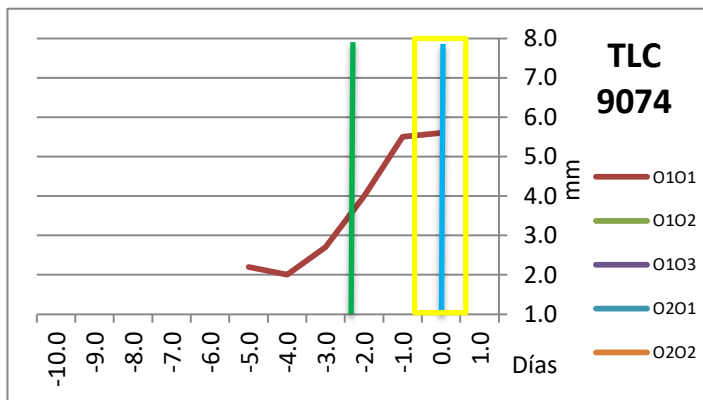


Figura 17.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TLC (9074), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

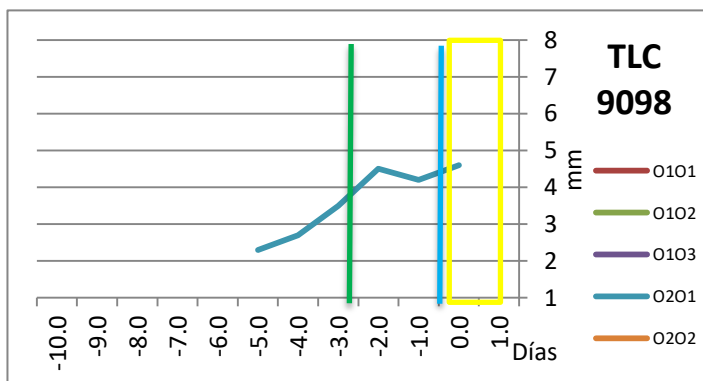


Figura 18.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TLC (9098), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

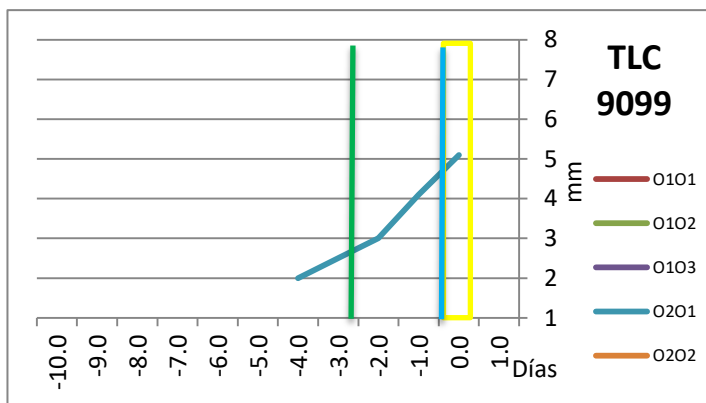


Figura 19.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TLC (9099), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

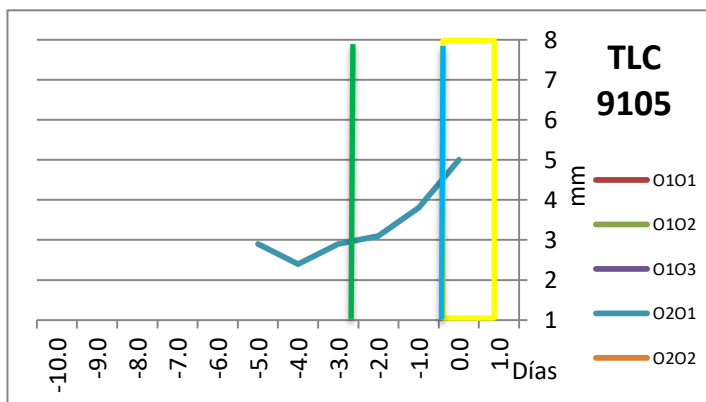


Figura 20.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TLC (9105), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

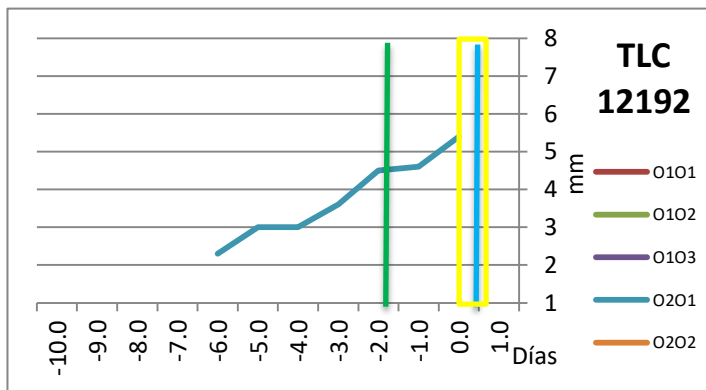


Figura 21.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TLC (12192), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

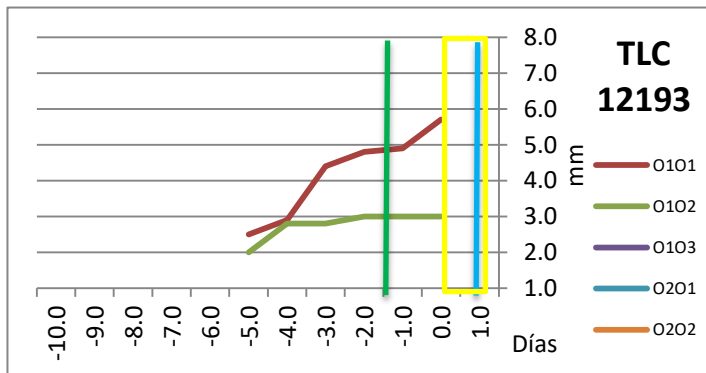


Figura 22.- Crecimiento y duración de 2 folículos ovulatorios (O1O1 y O1O2) en un individuo del grupo TLC (12193), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

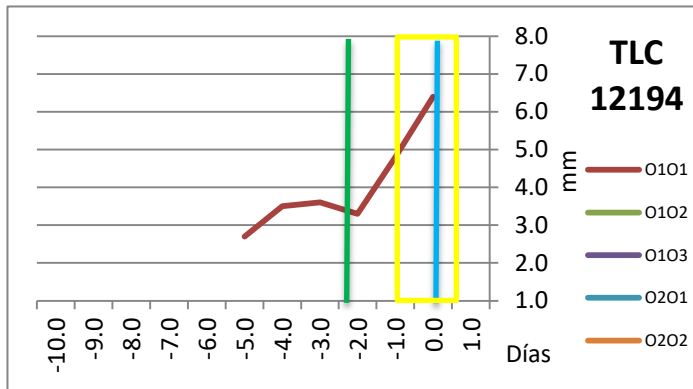


Figura 23.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TLC (12194), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

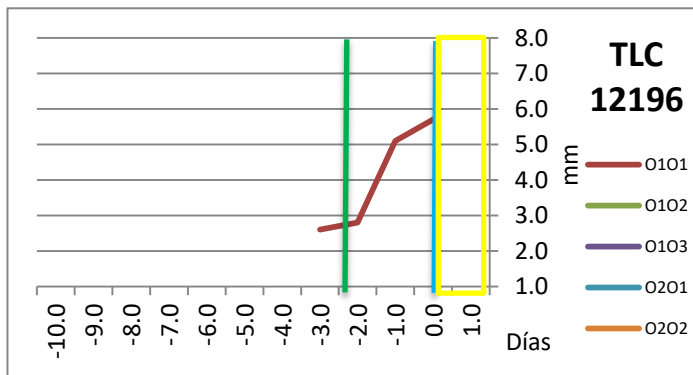


Figura 24.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TLC (12196), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

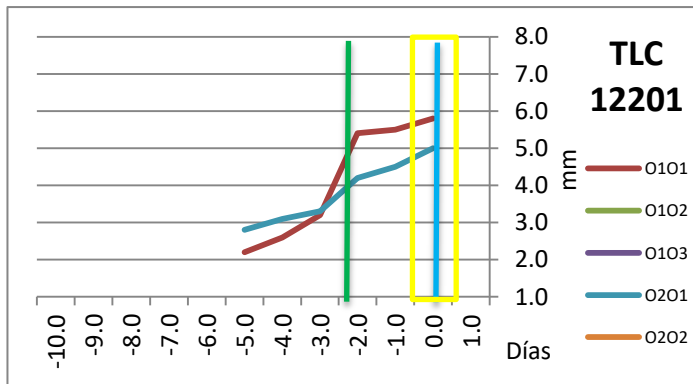


Figura 25.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TLC (12201), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

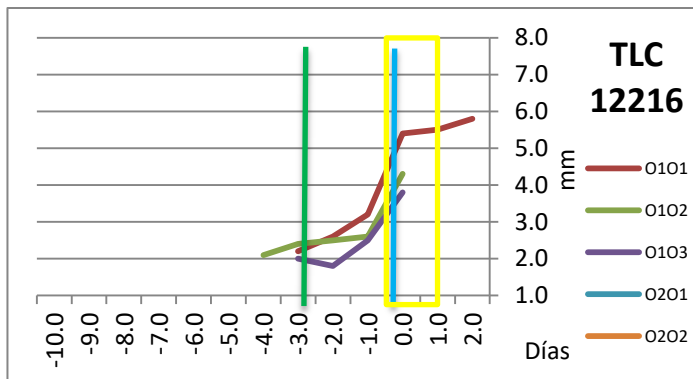


Figura 26.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O1O3) en un individuo del grupo TLC (12201), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

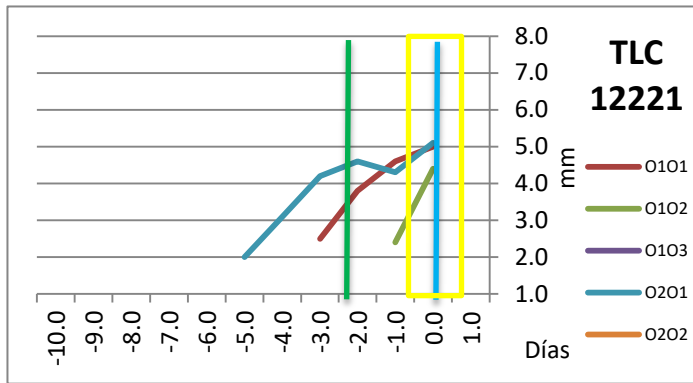


Figura 27.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TLC (12221), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

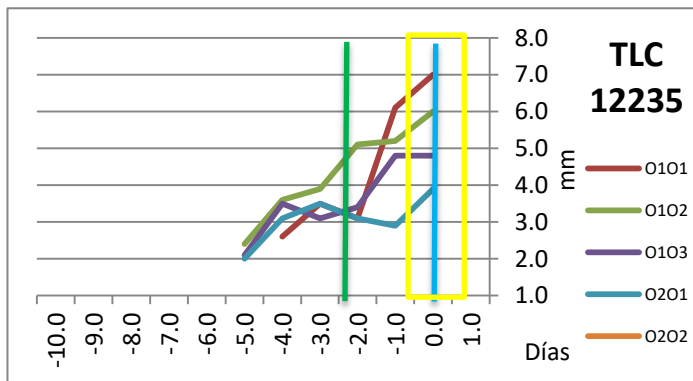


Figura 28.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2, O1O3 y O2O1) en un individuo del grupo TLC (12235), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

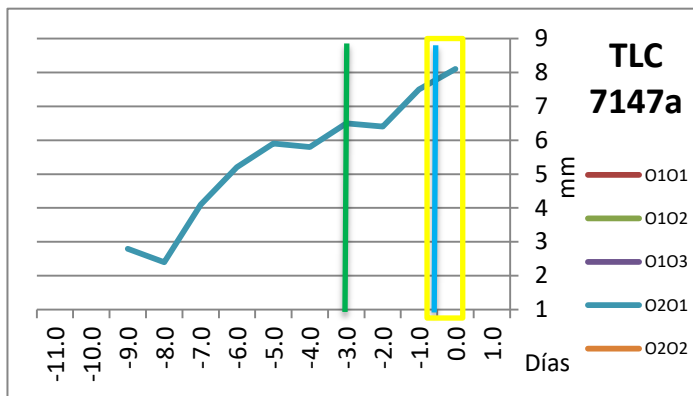


Figura 29.- Crecimiento y duración del folículo ovulatorio (O2O)1 con el mayor diámetro a la ovulación (8.1 mm) en un individuo del grupo TLC (12221), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

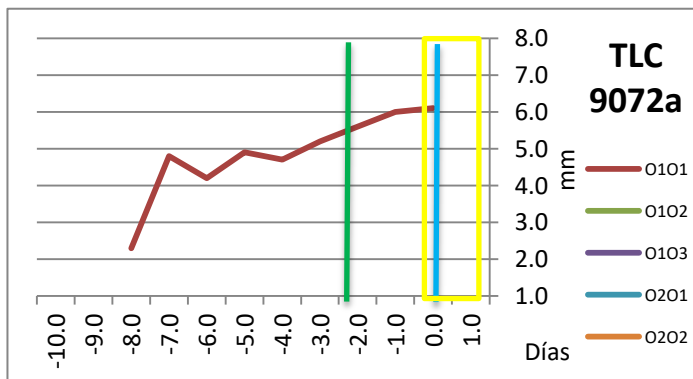


Figura 30.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TLC (9072a), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

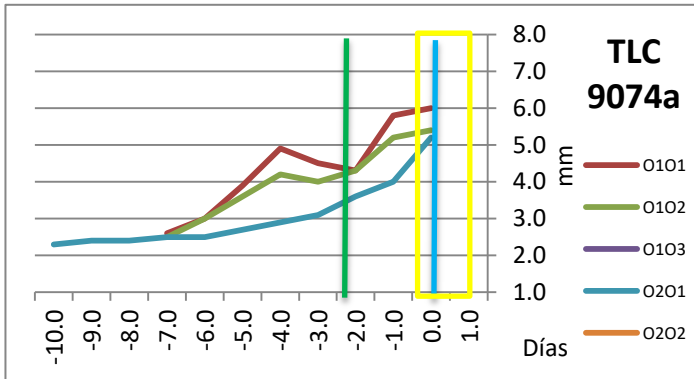


Figura 31.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TLC (9074a), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

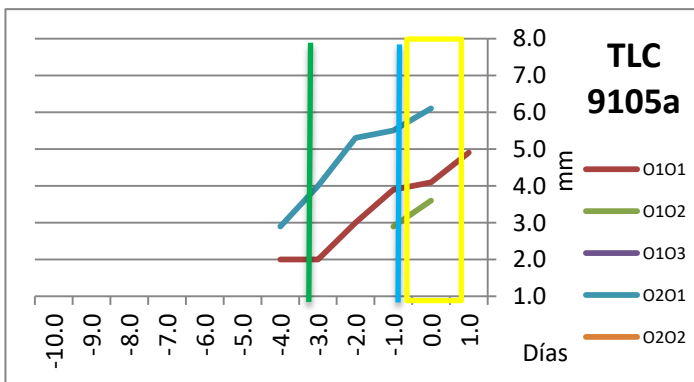


Figura 32.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TLC (9105a), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

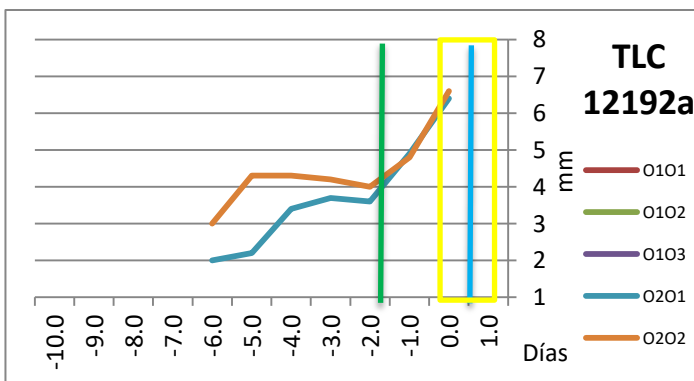


Figura 33.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TLC (12192a), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

Tratamiento corto control:

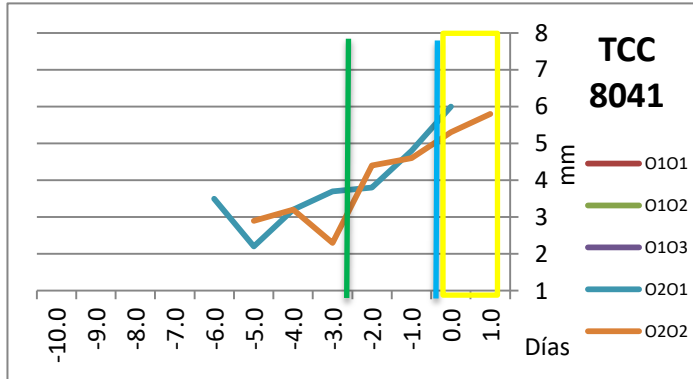


Figura 34.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (8041), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

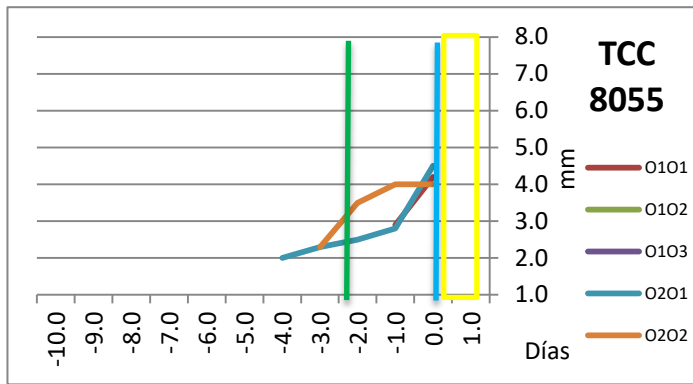


Figura 35.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (8041), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

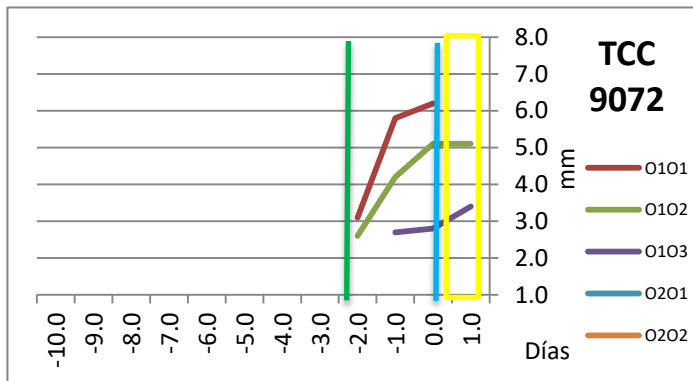


Figura 36.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O1O3) en un individuo del grupo TCC (9072), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

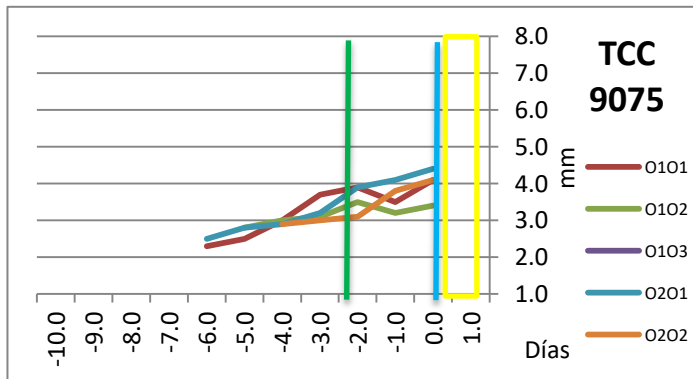


Figura 37.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2, O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (9075), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

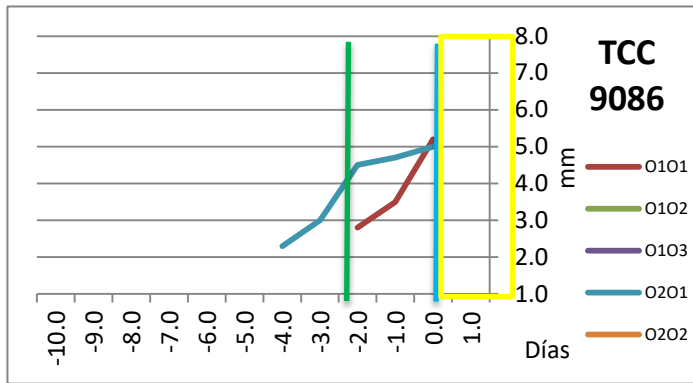


Figura 38.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TCC (9086), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. Esta oveja durante la detección del estro con el macho celador interrumpió el comportamiento por un periodo de 12 horas a la mitad de este.

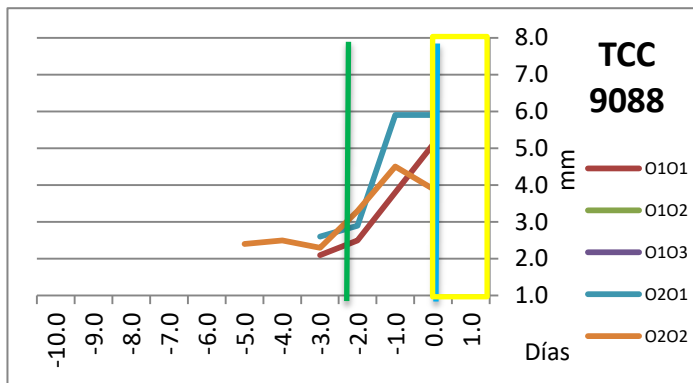


Figura 39.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (9088), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

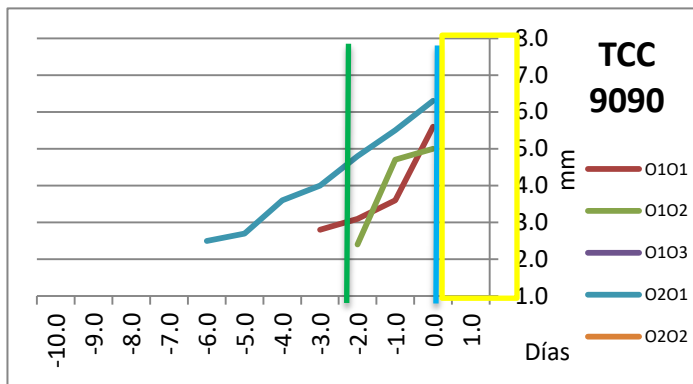


Figura 40.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (9090), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. Esta oveja durante la detección del estro con el macho celador interrumpió el comportamiento por un periodo de 12 horas a la mitad de este.

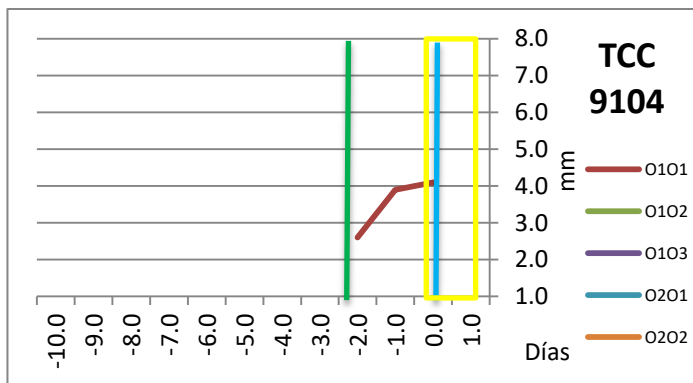


Figura 41.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TCC (9104), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

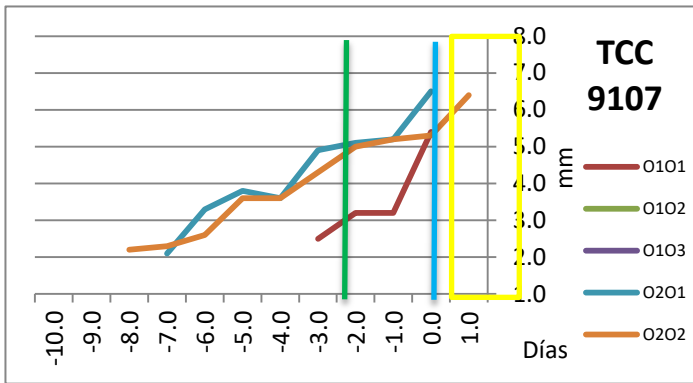


Figura 42.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (9107), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. Esta oveja durante la detección del estro con el macho celador interrumpió el comportamiento por un periodo de 12 horas al final de este.

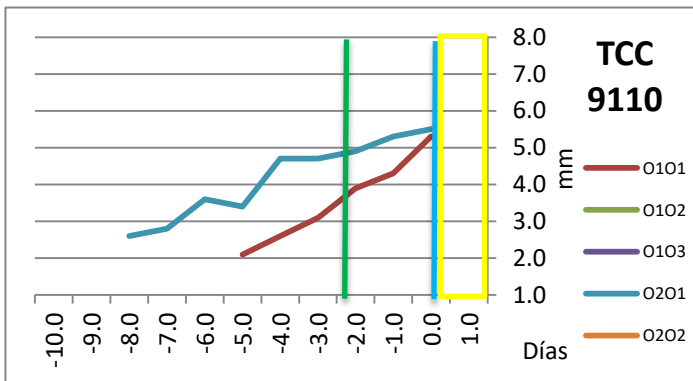


Figura 43.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TCC (9110), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

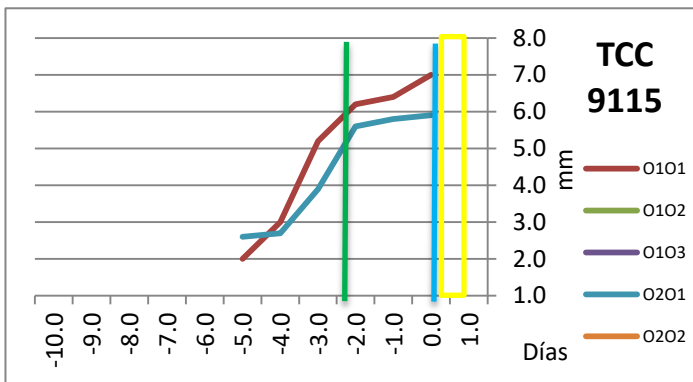


Figura 44.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TCC (9115), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

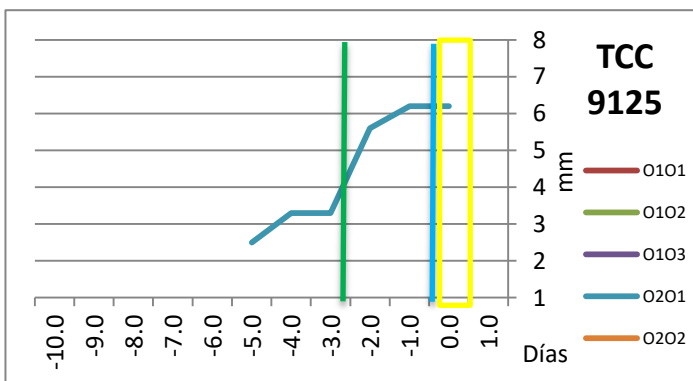


Figura 45.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TCC (9125), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

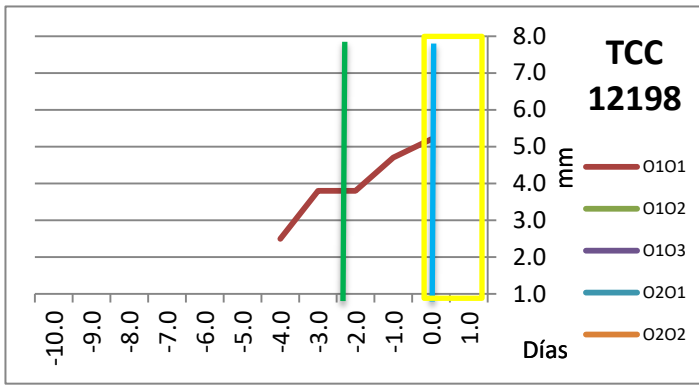


Figura 46.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TCC (12198), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

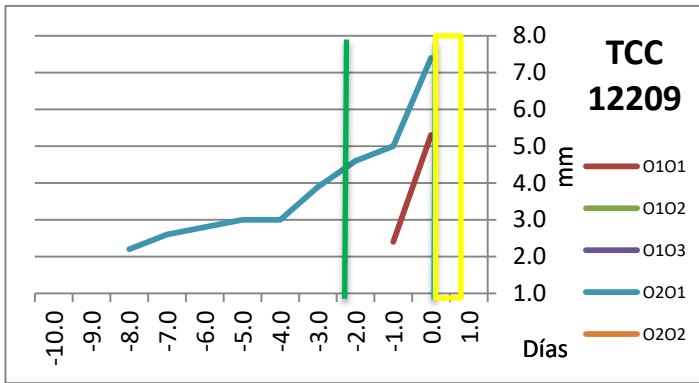


Figura 47.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TCC (12209), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. Esta oveja durante la detección del estro con el macho celador interrumpió el comportamiento por un periodo de 36 horas a 24 horas de iniciado el estro.

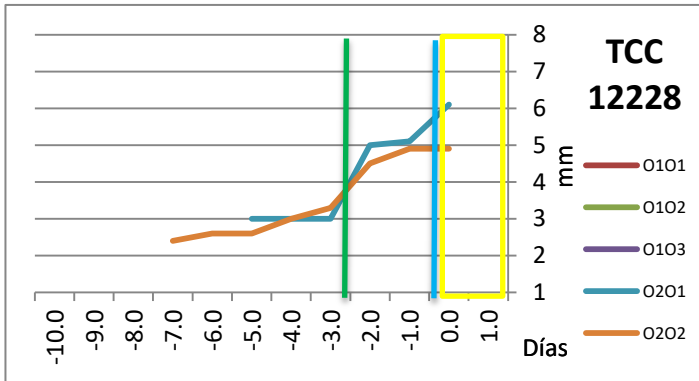


Figura 48.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCC (12228), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. Esta oveja durante la detección del estro con el macho celador interrumpió el comportamiento por un periodo de 12 horas al final de este.

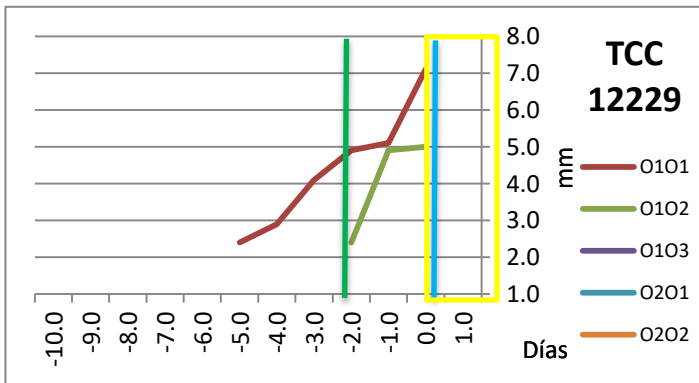


Figura 49.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O1O2) en un individuo del grupo TCC (12229), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

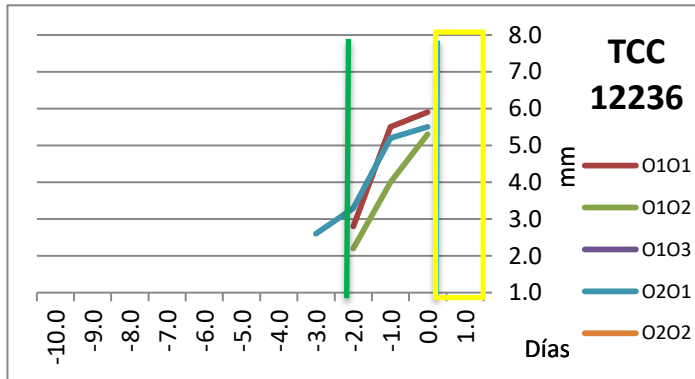


Figura 50.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TCC (12236), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

Tratamiento corto con glicerol:

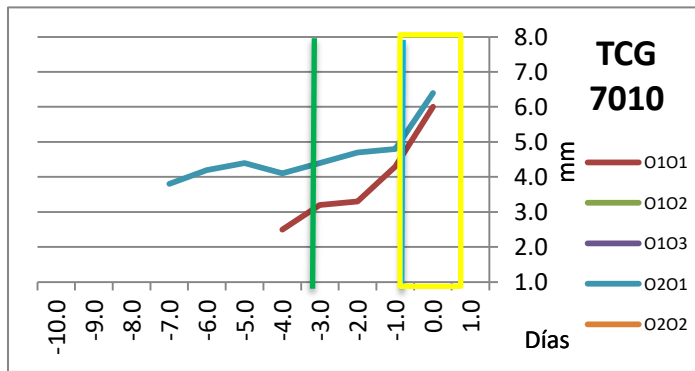


Figura 51.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TCG (7010), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

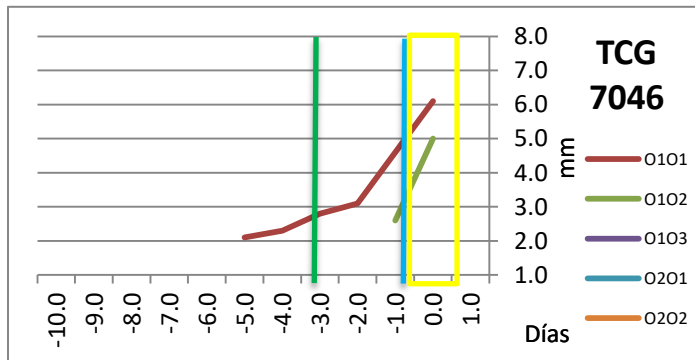


Figura 52.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O1O2) en un individuo del grupo TCG (7046), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

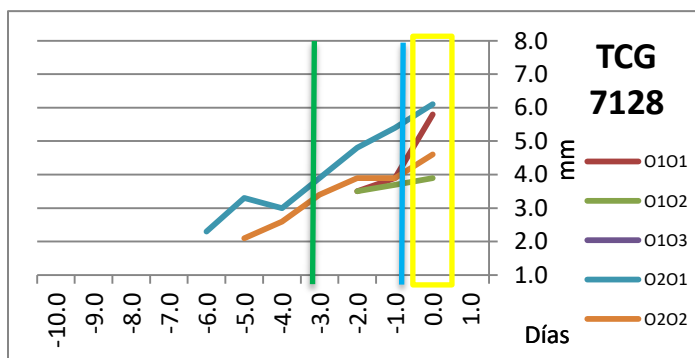


Figura 53.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2, O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCG (7128), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

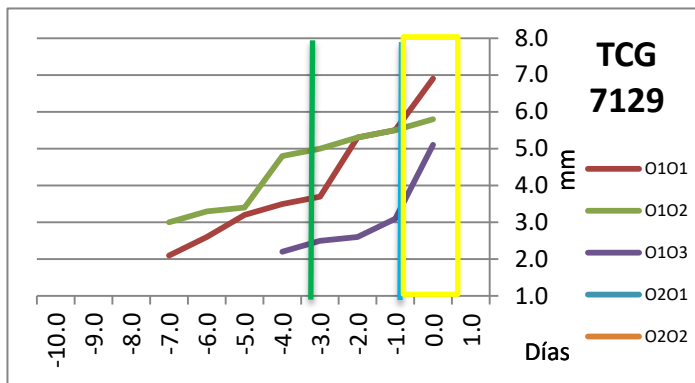


Figura 54.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2, O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCG (7129), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

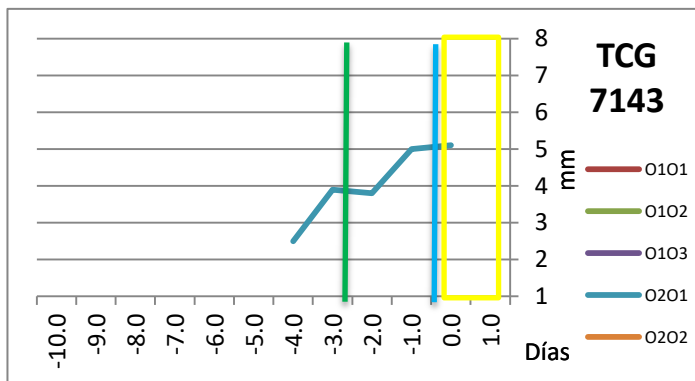


Figura 55.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O2O1) en un individuo del grupo TCG (7143), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

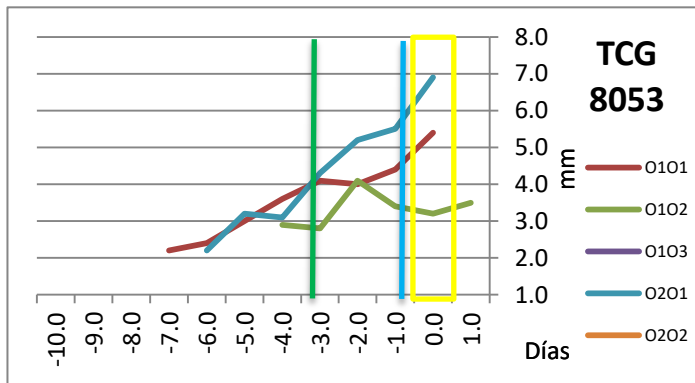


Figura 56.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TCG (8053), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

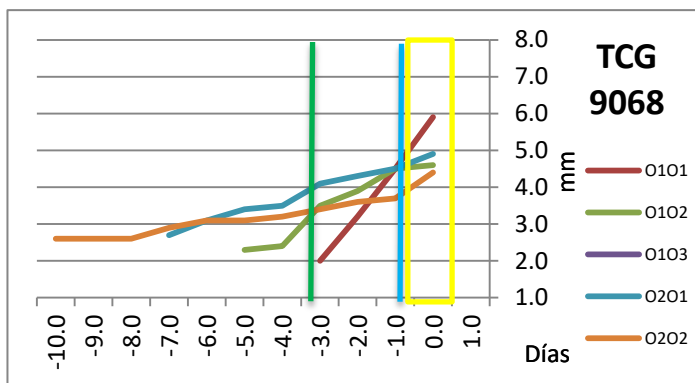


Figura 57.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2, O2O1 y O2O2) en un individuo del grupo TCG (9068), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

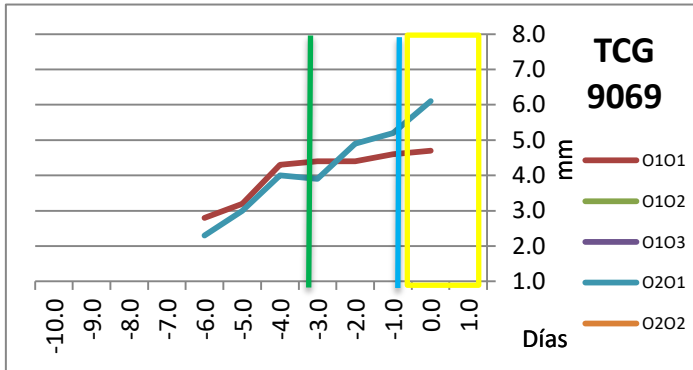


Figura 58.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1 y O2O1) en un individuo del grupo TCG (9069), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

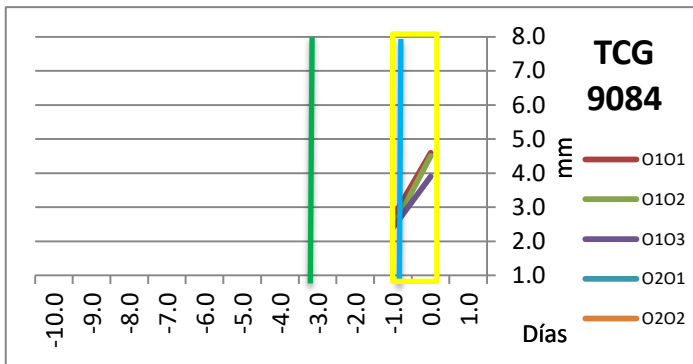


Figura 59.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O1O3) en un individuo del grupo TCG (9084), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

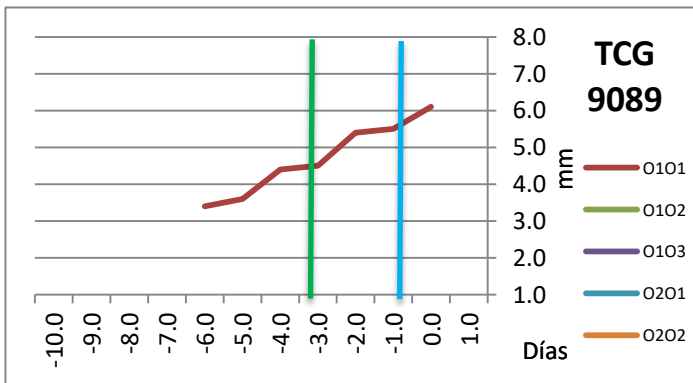


Figura 60.- Crecimiento y duración de un folículo ovulatorio (O1O1) en un individuo del grupo TCG (9089), se muestra el tiempo de retiro del dispositivo y momento de inseminación ya que esta oveja presentó una ovulación silenciosa.

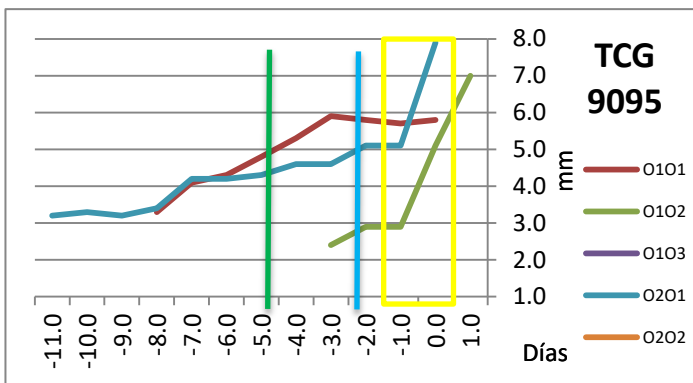


Figura 61.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O1O1, O1O2 y O2O1) en un individuo del grupo TCG (9095), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. En este individuo se presentó el folículo más longevo (O2O1) con 11 días hasta la ovulación.

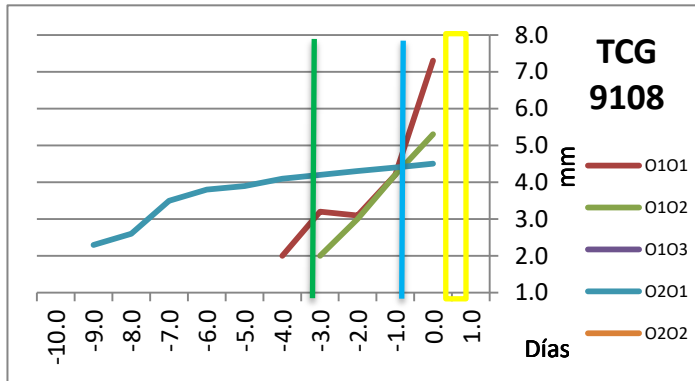


Figura 62.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O101, O102 y O201) en un individuo del grupo TCG (9108), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

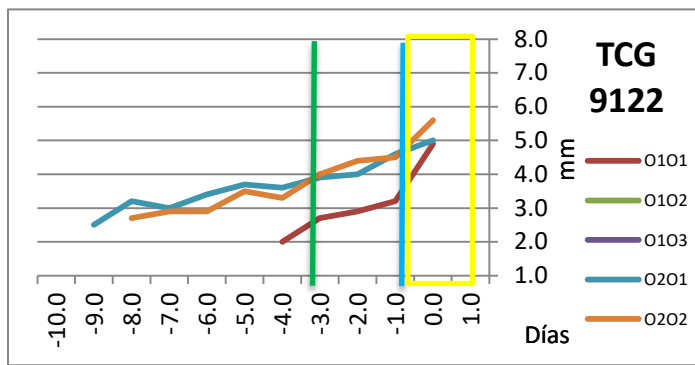


Figura 63.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O101, O201 y O202) en un individuo del grupo TCG (9122), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

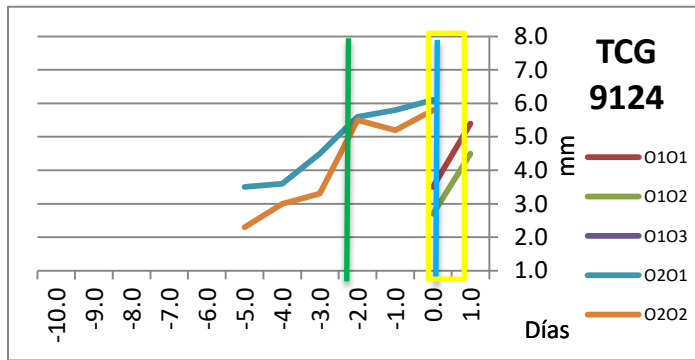


Figura 64.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O101, O102, O201 y O202) en un individuo del grupo TCG (9124), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

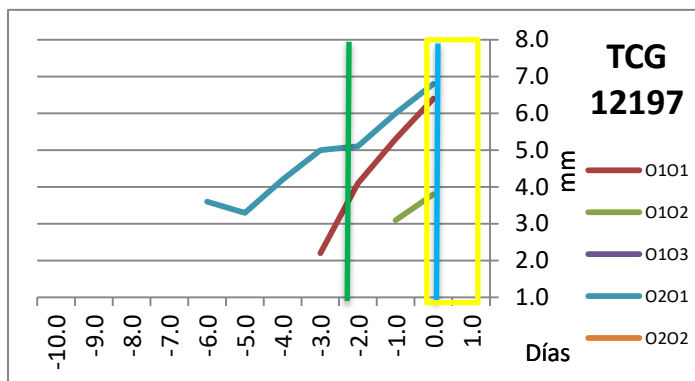


Figura 65.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O101, O102 y O201) en un individuo del grupo TCG (12197), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación. Esta oveja durante la detección del estro con el macho celador interrumpió el comportamiento por un periodo de 12 horas al final de este.

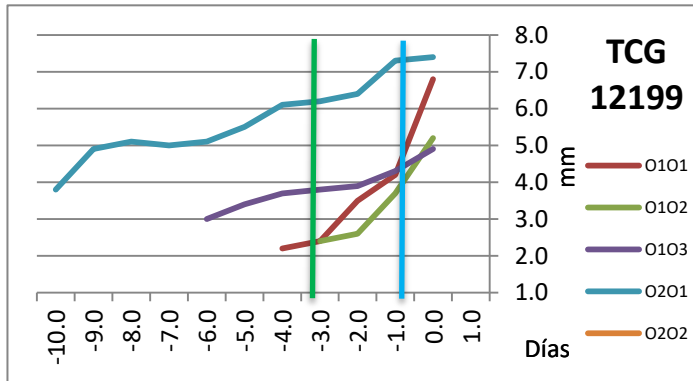


Figura 66.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O101, O102, O103 y O201) en un individuo del grupo TCG (12199), se muestra tiempo de retiro del dispositivo y momento de inseminación ya que esta oveja tuvo ovulaciones silenciosas.

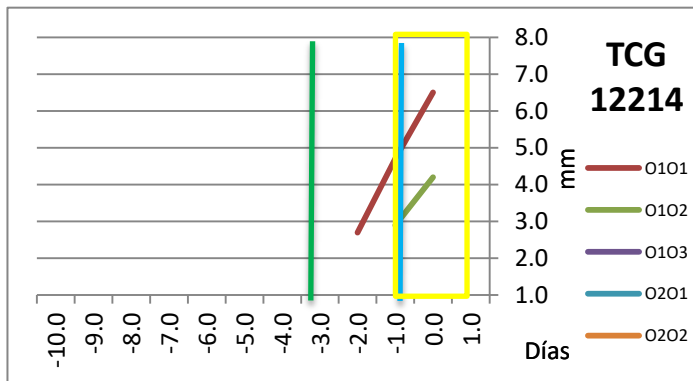


Figura 67.- Crecimiento y duración de los folículos ovulatorios (O101 y O102) en un individuo del grupo TCG (12214), incluyendo la duración del estro y momento de inseminación.

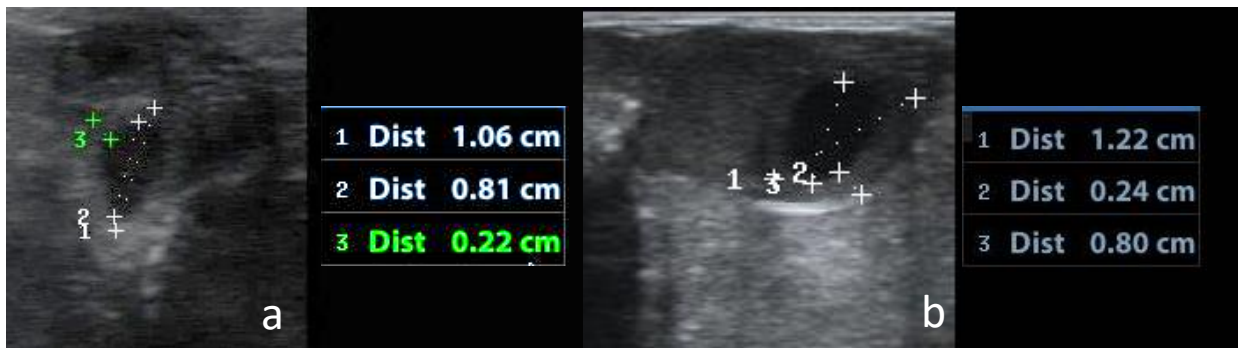


Figura 68.- Quiste folicular presente en un grupo del tratamiento largo control observando el aumento en el diámetro y engrosamiento de la pared folicular, a primer año y b un individuo en el mismo grupo en el segundo año.