01669

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

2 2g.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

RESPUESTA OVARICA A TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION CON DOSIS REDUCIDAS DE eCG, CON Y SIN ANTI-eCG EN OVINOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL: REPRODUCCION

P R E S E N T A :

MVZ ARANTZATZU LETICIA LASSALA IRUESTE

ASESORES: MVZ MPA OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA
MVZ MPA ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ

MEXICO, D. F. 1998

268244

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

DECLARACION

Se autoriza a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

AGRADECIMIENTOS

A Lucía por todas las cosas que hemos pasado y aprendido juntas.

A Coco por estar siempre conmigo y porque este trabajo fue un esfuerzo de los dos.

A Carlos por rescatarme y enseñarme cosas nuevas.

Al Dr. Luis Zarco por su disposición y ejemplo.

A Octavio y a Beto por su asesoría y paciencia.

Al Dr. Javier Valencia por su apoyo en el trabajo de campo.

A Oli y Alfredo por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A Susana, Clara y Gerardo por tolerarme y apoyarme cotidianamente.

Al Dr. Joel Hernández, Verónica, Chepo, Ramón, Javier, Abner, Miguel, Corpus, Memo y todos los integrantes del Departamento de Reproducción por todo su tiempo y ayuda.

Al personal del CEPIER.

Al Dr. Rogelio Flores y a Intervet México por la donación de las esponjas y de la prostaglandina.

A la Dra. Elizabeth Pérez Martínez por sus valiosos comentarios y al Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal de La Habana, Cuba, por el anti-eCG.

A Marcelino Rosas por su ayuda desinteresada.

A los miembros del jurado: Dr. Javier Valencia, Dr. Joel Hernández, Dr. Raymundo Rangel, M.P.A. Adriana Saharrea y M.P.A. Octavio Mejía.

A las borregas por aguantarme y por todo lo que me enseñaron.

INDICE

1. INTRODUCCION 1

2. REVISION DE LITERATURA 7
2.1 Superovulación en la oveja 7
2.2 Características de la *eCG* y su uso en la reproducción 12
a) Propiedades. 12
b) Mecanismo de Acción. 14
c) Modificación de la vida media. 16
d) Variabilidad en la respuesta ovárica a la *eCG*. 18

3. METODOLOGIA 25

4. RESULTADOS 34

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES 41

6. LITERATURA CITADA 49

RESUMEN:

Lassala Irueste Arantzatzu Leticia. RESPUESTA OVARICA A TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION CON DOSIS REDUCIDAS DE *eCG*, CON Y SIN ANTI-*eCG* EN OVINOS. (Asesores: M.P.A. Octavio Mejía Villanueva, M.P.A. Alberto Balcázar Sánchez).

El objetivo de este estudio fue el de evaluar la respuesta ovárica a dosis reducidas de *eCG* (500UI y 750UI), administrando o no anti-*eCG* 12h después de detectado el celo. Se utilizaron 32 borregas criollas cíclicas, que se dividieron aleatoriamente en 4 grupos denominados de acuerdo a la dosis empleada y a la aplicación de anticuerpo: Grupo 500 (n=8), Grupo 500+anti-*eCG* (n=8), Grupo 750 (n=8), Grupo 750+anti-*eCG* (n=8). La eficacia del lote de *eCG* para inducir una respuesta superovulatoria satisfactoria (≥4 cuerpos lúteos), fue comprobada en 4 ovejas, utilizando una dosis convencional de 1000UI, con o sin la adición de antisuero. La manifestación y evolución de las estructuras ováricas se evaluó por laparoscopía en 2 individuos de cada grupo (días -2, 0, 2 y 4/día 0=día en el que fue detectado el estro conductual). En el resto de los animales, la cuantificación y valoración de la respuesta ovárica se llevó a cabo por laparotomía en el día 6 del ciclo estral. Para la determinación de progesterona, se obtuvieron diariamente muestras de sangre de cada oveja por punción yugular, empezando el día de la aplicación de la *eCG* y concluyendo 6 días después de haberse presentado el celo. El promedio de ovulaciones para el total de las borregas fue de 3.81±0.67, observándose gran variabilidad en el número de cuerpos lúteos (rango: 1 a 19). La dosis de 750UI de *eCG* provocó una respuesta superovulatoria de mayor magnitud que la dosis de 500UI (5.21±0.98 *vs* 2.41± 0.93 cuerpos lúteos respectivamente; $P<0.05$). La frecuencia de animales que presentaron folículos mayores a 5mm de diámetro en el día 6 postestro se incrementó igualmente con la dosis ($\chi^2=4.10$; $P<0.04$), sin que se advirtieran diferencias debidas a la inclusión del anticuerpo ($P>0.01$). Las observaciones hechas por laparoscopía demostraron que los folículos grandes observados en el día 4 del ciclo pueden ser de nueva formación. La presencia de cuerpos lúteos de corta duración no difirió entre tratamientos ($P>0.05$). En los animales en los que se estimuló un incremento en las ovulaciones (≥3 cuerpos lúteos), los niveles de progesterona se elevaron y difirieron de cero a partir del día 3 del ciclo estral ($P<0.05$), mientras que en los no estimulados esto sucedió hasta el día 5. Se concluye que la aplicación de 500/750UI de *eCG* no constituye un método efectivo para provocar una respuesta superovulatoria satisfactoria y que bajo las condiciones seguidas en este estudio, el uso de anti-*eCG* no mejora la calidad de la repuesta ovárica.

Palabras clave: Ovejas, Superovulación, *eCG*, Anti-*eCG*.

SUMMARY:

Lassala Irueste Arantzatzu Leticia. OVARIAN RESPONSE TO REDUCED SUPEROVULATORY DOSES OF *eCG*, WITH OR WITHOUT ANTI-*eCG* SERUM IN EWES. (Supervisors: M.P.A. Octavio Mejía Villanueva, M.P.A. Alberto Balcázar Sánchez).

The ovarian response to two reduced superovulatory *eCG* doses (500UI and 750UI) alone (Groups 500/n=8 and 750/n=8) or in combination with anti-*eCG* serum (Groups 500+anti-*eCG* /n=8 and 750+anti-*eCG*/n=8) given 12h after the onset of estrus was studied during the breeding season in 32 mixed-breed ewes. Blood samples were taken for progesterone determination between the day of *eCG* administration and day 6 postestrus. The ovarian response was evaluated by either repeated laparoscopies (Days -2, 0, 2 and 4/day 0=day of estrus) in 2 sheep from each group, or by mid-ventral laparotomy on day 6 postestrus in the rest of the animals. The mean ovulation rate (based on number of corpora lutea) for all ewes was 3.81±0.67 (ranging from 1 to 19 ovulations). The superovulatory response was greater in the 750 than in the 500 Group (5.21±0.98 *vs* 2.41±0.93 corpora lutea respectively). The number of large follicles (>5mm) seen at day 6 differed between the high (750) and low (500) dose of *eCG* (χ^2=4.10; P<0.04), with no difference due to the inclusion of the anti-*eCG* serum. Pooled data from laparoscopies show that some of the large follicles observed at day 4 are newly formed. The proportion of regressing corpora lutea on day 6 of the cycle was similar for all groups (P>0.05). Progesterone profiles for sheep which showed increased ovulation rate due to the treatment (≥3CL) differed from cero by day 3 of the estrous cycle (P<0.05), whilst for unstimulated animals, the difference was observed until day 5. It is concluded that 500/750UI doses of *eCG* are not suitable for the induction of satisfactory superovulation (≥4 CL) and that anti-*eCG* serum does not improve the ovarian response when used with low doses of *eCG*.

Key words: Ewes, Superovulation, *eCG*, Anti-*eCG*.

RESPUESTA OVARICA A TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION CON DOSIS REDUCIDAS DE *eCG*, CON Y SIN ANTI-*eCG* EN OVINOS.

1. INTRODUCCION.

Se cree que el desarrollo folicular empieza antes del nacimiento y se continúa a lo largo de toda la vida en la mayoría de los mamíferos (Baird y McNeilly, 1981). El ovario de la borrega adulta posee una población definitiva de folículos primordiales (entre 12,000 y 86,000), de los cuales algunos crecen y se desarrollan (Cahill *et al.*, 1979; Cahill, 1981) y sólo uno o dos ovulan al final de cada ciclo estral (Driancourt *et al.*, 1985; Bindon *et al.*, 1986). El sistema cuenta entonces con miles de ovocitos que nunca serán utilizados durante el proceso reproductivo normal (Alfuraiji *et al.*, 1993).

El crecimiento de los folículos desde su estado preantral hasta el preovulatorio es continuo y toma aproximadamente 180 días en la hembra ovina (McNeilly *et al.*, 1984). Se lleva a cabo en 2 etapas, proponiéndose que la primera es modulada por factores parácrinos y autócrinos en el ovario, independientemente de la presencia de las hormonas gonadotrópicas, y caracterizándose por el desarrollo del folículo hasta alcanzar aproximadamente los 2 mm de diámetro (Driancourt y Cahill, 1984; Fortune, 1994). En la segunda etapa, en la que las gonadotropinas resultan indispensables y que dura alrededor de 8 a 9 días (Cahill y Mauléon, 1981), el folículo sigue su crecimiento hasta convertirse en preovulatorio (Driancourt y Fry, 1988). Al parecer, ésta última fase se presenta en forma de oleadas constituidas por periodos de reclutamiento, selección y dominancia folicular, similares a las observadas en la vaca. El folículo que por su grado de desarrollo es dominante en el momento en el que ocurre la regresión del cuerpo lúteo es el que llega a convertirse en el folículo ovulatorio (Baird, 1983; Fortune, 1994). Así, sólo una pequeña proporción de los folículos que empiezan a

crecer llega a ovular, ya que la mayor parte de ellos se degenera (Murdoch, 1985; Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El reclutamiento, la selección y la ovulación de un número de folículos mayor al normal para la especie, puede lograrse mediante la administración de gonadotropinas exógenas en el momento adecuado del ciclo estral (Fortune, 1994). Al recuperar ovocitos que de otra manera se perderían como parte de un proceso cíclico natural, se puede incrementar la prolificidad o aumentar significativamente el número de ovulaciones, a lo cual se le conoce como superovulación (Bindon y Piper, 1982), ofreciéndose así, al coordinarse con programas de transferencia de embriones, vías para maximizar la producción comercial y aumentar el potencial genético de la especie (Zeitoun *et al.*, 1991; Martemucci *et al.*, 1995).

En los rumiantes, los esquemas más frecuentemente utilizados para superovular incluyen ya sea a la FSH, obtenida a partir de extracto hipofisiario de diferentes especies (Armstrong y Evans, 1983), o a la gonadotropina coriónica equina (eCG), antes conocida como gonadotropina sérica de la yegua preñada (PMSG), ya que se extrae del suero de yeguas gestantes (Cole y Hart, 1930). Ambas tienen una actividad biológica dual, tanto de hormona folículo estimulante (FSH), como de hormona luteinizante (LH) (Murphy *et al.*, 1984), cuya proporción cambia en las diferentes preparaciones, debido a que el extracto hipofisiario no se obtiene completamente puro y a que las características propias de la eCG se modifican dependiendo del momento en el que el suero es colectado (Aggarwal *et al.*, 1980 ; Murphy *et al.*, 1984).

La respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación es muy poco constante (Boland *et al.*, 1991; Dieleman *et al.*, 1993; Martemucci *et al.*, 1995), lo que ha sido atribuido a diferentes factores, entre los que destaca la variabilidad imputable al individuo, ya que tratamientos idénticos pueden llevar a respuestas muy distintas (Murphy *et al.*, 1984).

Al superovular con gonadotropinas exógenas, la regulación normal del

reclutamiento y la selección folicular se altera (Hyttel *et al.*, 1991), modificándose el balance endócrino en el útero y oviductos, lo que provoca diversos efectos secundarios indeseables que se vinculan a una disminución en la fertilidad (Moore, 1982) y a la variabilidad en la respuesta obtenida (Betteridge, 1993).

Dentro de los diferentes esquemas que se utilizan en los tratamientos para provocar ovulaciones múltiples, la aplicación de FSH en dosis decrecientes produce los mejores y más constantes resultados en cuanto al aumento de la tasa de ovulación se refiere (Armstrong y Evans, 1983). No obstante, requiere de un protocolo de administración que implica la aplicación de entre 6 y 8 inyecciones (Luyando *et al.*, 1995; Mejía *et al.*, 1995), resultando en un tratamiento poco práctico. Por otro lado, a la eCG se le encuentra fácilmente disponible y puede ser administrada como dosis única, debido a que su vida media es larga (Zeitoun *et al.*, 1991; Alfuraiji *et al.*, 1993), sin embargo, la variabilidad en la respuesta ovárica es mayor (Dieleman *et al.*, 1993; Martemucci *et al.*, 1995).

La eCG ha sido utilizada comercialmente y en la investigación durante más de 30 años (Bindon y Piper, 1982). Estructuralmente se parece a la FSH y a la LH ya que es una glicoproteína compuesta por una unidad α y una β disimiles (Christakos y Bahl, 1979). Una particularidad química importante de la eCG es el alto contenido de carbohidratos de su molécula (41-45%), principalmente de ácido siálico o ácido n-acetil-neuramínico (10.8%) (Papkoff *et al.*, 1978; Christakos y Bahl, 1979), el cual juega un papel importante en la regulación de la permanencia en la circulación de la gran mayoría de las glicoproteínas, ya que es el responsable de impedir la degradación de la hormona, pues debe de ser retirado de la molécula para que ésta pueda ser captada por los hepatocitos como parte de su proceso de eliminación de la circulación periférica (Morell *et al.*, 1971). Así, la vida media de la eCG es muy larga (21h) (McIntosh *et al.*, 1975), excediendo en gran medida a la de la LH (28min) (Geschwind y Dewey, 1968) o a la de la FSH (2h) (Akbar *et al.*, 1974), cuyas moléculas contienen una

cantidad mucho menor de este carbohidrato (McIntosh *et al.*, 1975).

El que la eCG permanezca durante largo tiempo en la circulación presenta ciertas desventajas, ya que puede causar una sobreestimulación y/o una estimulación prolongada del ovario, que involucre a la oleada folicular que se presenta después de la ovulación , llevando a un nuevo aumento en los niveles de 17β-estradiol (Nakajima *et al.*, 1992 ; Driancourt y Fry, 1992 ; Alfuraiji *et al.*, 1993). Así, los tratamientos superovulatorios con eCG se asocian frecuentemente a la presencia de un gran número de folículos persistentes (folículos que se encuentran durante el periodo postovulatorio), al momento de la recolección embrionaria (Ungerfeld *et al.*, 1995).

La secreción de concentraciones excesivas de estrógenos puede ser la causa, al menos en parte, de un medio ambiente adverso en útero y en oviducto (Walton y Armstrong, 1981 ; Foote y Ellington 1988), de la alteración del transporte espermático a través del aparato reproductor (Evans y Armstrong, 1984 ; Hyttel *et al.*, 1991), de la modificación en el proceso de maduración y las características del ovocito (Hytell *et al.*, 1991 ; de Loos *et al.*, 1991 ; Driancourt y Fry, 1992) y de la formación de cuerpos lúteos de regresión prematura, afectándose la calidad y la recuperación embrionarias (Cerbón *et al.*, 1995 ; Luyando *et al.*, 1995 ; Rubianes *et al.*, 1996; Espinosa, 1998).

Se ha sugerido que tanto la fertilidad de los animales superovulados con eCG, como la calidad de los embriones que estos producen, podría mejorarse mediante la reducción de las concentraciones de estrógenos después de que la gonadotropina provoque una estimulación folicular suficiente para esperar un aumento en el número de ovulaciones (Nakajima *et al.*, 1992), pero antes del estímulo postovulatorio y del segundo aumento de estradiol (Alfuraiji *et al.*, 1993). Con este propósito, se ha estudiado la inclusión de un antisuero (monoclonal o policlonal) contra la eCG (anti-eCG), (anteriormente anti-PMSG), en los protocolos de superovulación, procurando la remoción selectiva o la neutralización de la eCG, acortando así su periodo de actividad biológica (Nakajima *et al.*, 1992 ; Alfuraiji *et al.*, 1993).

A pesar de que el anti-eCG ha sido ampliamente utilizado en ganado bovino, lográndose mejoras tanto en la tasa de ovulación como en el número de embriones recuperados, los resultados obtenidos han sido muy variables (Armstrong y Evans, 1983; Córdova *et al.*, 1992). Aunque también existen controversias, algunos estudios hechos con pequeños rumiantes indican que el tratamiento con anti-eCG mejora la respuesta superovulatoria y la producción de embriones transferibles cuando se administra pasado el pico de LH (Córdova *et al.*, 1992; Ungerfeld *et al.*, 1995 ; Rubianes *et al.*, 1996).

La dosis de gonadotropina utilizada en los tratamientos de superovulación puede incrementar también la variabilidad en la respuesta ovárica (Evans y Robinson, 1980). En los ovinos se recomiendan dosis de entre 1000 y 1500UI de eCG (Evans y Armstrong, 1984; Martemucci *et al.*, 1995; Mejía *et al.*, 1995), observándose ocasionalmente ovarios sobreestimulados con folículos quísticos múltiples (Armstrong y Evans, 1983). Se ha documentado que las gonadotropinas exógenas a dosis altas (mayores a 1000UI), trastornan el funcionamiento bioquímico del ovocito (Moor *et al.*, 1985), provocan fallas en la ovulación (Moore, 1982) y se asocian además a reducción en la fertilidad y a pérdidas embrionarias tempranas (Armstrong y Evans, 1983). De hecho, el segundo aumento en los niveles de estradiol, que se presenta después de la ovulación en animales tratados con eCG, se observa con mayor frecuencia cuando las dosis de ésta gonadotropina son elevadas (Evans y Armstrong, 1984).

Buscando optimizar los métodos ya existentes y aprovechando las ventajas prácticas que tiene un protocolo de superovulación que incluye el uso de la eCG, se propone que la utilización de dosis reducidas (500 y 750UI), administrando anti-eCG 12 horas después de la presentación del estro, puede redundar en una mejor calidad de los cuerpos lúteos, en la ausencia de folículos anovulatorios y como consecuencia, en una mejor tasa de recuperación embrionaria, así como en una mayor calidad de los embriones recolectados.

La finalidad de este trabajo es entonces la de determinar si las dosis reducidas de eCG proporcionan un método efectivo y repetible para superovular ovejas, sin que se presente una sobreestimulación ovárica y definir la utilidad de la aplicación del anti-eCG cuando se utilizan dosis reducidas de eCG.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Superovulación en la oveja.

Poco después de publicarse el descubrimiento de las hormonas gonadotrópicas en 1927, se comenzó a pensar en estimular el crecimiento folicular y/o controlar la ovulación en los animales domésticos (Hunter, 1984).

El objetivo principal de un tratamiento de superovulación es el de incrementar la cantidad de ovocitos liberados por un animal y por consiguiente el número potencial de embriones. Sin embargo, la producción de embriones viables después de la superovulación es más importante para un programa exitoso de transferencia de embriones que el número de ovulaciones inducidas en cada animal (McDonald, 1989).

En los tratamientos de superovulación se emplean gonadotropinas con actividad biológica de FSH y LH (Smith, 1988), que se derivan por lo general de fuentes naturales (Betteridge, 1993). En los rumiantes, las hormonas más comúnmente utilizadas incluyen a la eCG, obtenida del suero de yeguas que se encuentran entre los días 35 y 65 de gestación, y a la FSH, proveniente de preparaciones obtenidas a partir de adenohipófisis disecadas de caballos, borregos y cerdos (Smith, 1988).

A nivel ovárico, las gonadotropinas exógenas actúan como FSH aumentando la tasa de crecimiento de los folículos y disminuyendo la de degeneración de los mismos (Moor *et al.*, 1984), y como LH permitiendo la maduración final del ovocito y participando en la ovulación (Dott *et al.*, 1979 ; Cupps, 1991).

Las gonadotropinas deben permanecer el tiempo suficiente en la circulación para facultar el crecimiento de los folículos hasta su maduración (Boland *et al.*, 1991). Así, la vida media de las hormonas determina en gran medida el esquema de administración, indicándose una inyección única en el caso de la eCG, debido a que tiene una vida media aproximada en la oveja de 21h (McIntosh *et al.*, 1975), mientras que la FSH, cuya vida media se calcula en 2h (Akbar *et al.*, 1974), debe aplicarse una o dos veces al día durante 3 a 4 días (Betteridge, 1993; Luyando *et al.*, 1995).

Para obtener una respuesta óptima a los tratamientos de superovulación, es fundamental sincronizar la administración de las gonadotropinas exógenas con las oleadas de crecimiento folicular. Así, el tratamiento puede iniciarse durante la fase folicular del ciclo ovárico, idealmente en el momento en el que existen folículos capaces de responder a la acción de las gonadotropinas, para alcanzar el tamaño preovulatorio durante el tiempo que transcurre entre la administración del tratamiento y el pico de LH (Moor, 1984). Sin embargo, es difícil definir con precisión este momento, ya que se tiene el inconveniente de que existe una gran variación en la duración de las etapas del ciclo estral entre animales, con lo que se obtienen tasas de ovulación inconsistentes. Otra opción es la de administrar las gonadotropinas en la fase lútea, sincronizando el estro y manipulando la regresión del cuerpo lúteo para controlar la ovulación (Moore, 1982), consiguiendo así que el celo coincida con los efectos del tratamiento (Smith, 1988). En las hembras cíclicas, el control del momento en el que ocurre la descarga de LH y la ovulación puede lograrse mediante la inducción de la luteólisis con prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) o sus análogos sintéticos, o alargando artificialmente la fase lútea con progesterona o progestágenos exógenos (Thimonier, 1979; Baird, 1983).

La progesterona puede utilizarse en forma de sales en el alimento (Echternkamp *et al.*, 1976), en inyecciones diarias (progesterona en aceite) (Gherardi y Lindsay, 1980) o mediante implantes intravaginales (esponjas) o subcutáneos (silicona polimerisada), (Cunningham *et al.*, 1980). Los tratamientos duran entre 9 y 12 días en los ovinos y el estro y la ovulación ocurren de 36 a 48 horas después de retirar la hormona (Cunningham *et al*, 1980; Ruttle *et al.*, 1988).

La progesterona controla la presentación del estro inhibiendo la retroalimentación positiva del estradiol en el hipotálamo y la hipófisis, con lo que se bloquea la liberación de LH (Goodman *et al.*, 1981; Kesner *et al.*, 1981). Al suprimirse la fuente exógena de progesterona, la inhibición se elimina y se reanudan los eventos que

conducen al estro (Thimonier, 1979 ; McLeod y Haresign, 1984). La regresión natural del cuerpo lúteo ocurre generalmente antes de la remoción del progestágeno exógeno (Fortín *et al.*, 1994).

La prostaglandina, por otra parte, se aplica por lo general 2 días después de la inyección de eCG y al tercer día de la administración de FSH. El estro se presenta en promedio 40 horas después (Thimonier, 1979). En la luteólisis natural, la $PGF_{2\alpha}$ es producida en el útero y secretada a las venas uterinas desde donde se transfiere a las arterias ováricas, sin pasar a la circulación periférica, a través de un intercambio entre los vasos que están yuxtapuestos (Driancourt *et al.*, 1985). Se cree que actúa intracelularmente en la síntesis de esteroides, provocando luteólisis funcional antes de que ocurra la estructural (Diekman *et al.*, 1978). Al causarse la regresión del cuerpo lúteo, se interrumpe la fase progestacional del ciclo estral y se inicia un nuevo ciclo (Inskeep, 1973). Tanto la prostaglandina natural como sus análogos sintéticos son eficientes como agentes luteolíticos por administración sistémica, y la regresión del cuerpo lúteo se completa entre 15 y 20h después de su aplicación (Thimonier, 1979). Para que las prostaglandinas funcionen, es necesario que los animales estén ciclando y que exista un cuerpo lúteo maduro al momento de la administración del tratamiento (días 5 a 14 del ciclo en la oveja) (Smith, 1988).

Cuando se realiza un programa de superovulación, existe una respuesta folicular superior a la que ocurriría en un ciclo normal y no todos los folículos que son estimulados llegan a ovular (Evans y Robinson, 1980; Boland *et al.*, 1991). Debido a esto, los estrógenos son secretados en cantidades superiores a las normales y por periodos más prolongados, sobre todo si se utiliza eCG (Walton y Armstrong, 1981; Moor *et al.*, 1985), modificándose el balance endócrino en útero y oviductos. En consecuencia, algunos de los procesos reproductivos se alteran, causando adelantos en la ovulación (Whyman y Moore, 1980; Vos *et al*, 1994), fallas en el transporte de los espermatozoides a través del cérvix y en la fertilización (particularmente en animales

tratados con dosis altas de gonadotropinas) (Moore, 1982), retrasos en la implantación (Miller, 1981), alteraciones en el desarrollo embrionario (Jabbour *et al.*, 1986), un acelerado transporte de los ovocitos a través del oviducto, ocasionando pérdidas embrionarias tempranas (Whyman y Moore, 1980; Walton y Armstrong, 1981) y anomalías en el desarrollo de los ovocitos (Moor *et al.*, 1985). Además, se observa un alto número de cuerpos lúteos en regresión prematura en los ovarios de los animales tratados, lo que contribuye a la disminución del número de embriones viables recuperados (Foote y Ellington, 1988; Schiewe *et al.*, 1991).

Los tratamientos para sincronizar el estro y la ovulación se han asociado también *per se* con una disminución en las tasas de fertilización (Hawk *et al.*, 1981) y en el número de espermatozoides recuperados en útero y oviductos (Evans y Armstrong, 1984), con alteraciones en las características de los folículos (de Loos *et al.*, 1991) y en el desarrollo temprano del embrión (Smith, 1988) y con una mayor incidencia de regresión lútea prematura (Schiewe *et al.*, 1991).

La ausencia de predictibilidad y los efectos indeseables en la respuesta a los tratamientos de superovulación con gonadotropinas ha llevado a la búsqueda de otros métodos de modular la función reproductiva que permitan reducir la variabilidad (Betteridge, 1993). Algunos han buscado mejorar la respuesta a los tratamientos de superovulación ya existentes, como la utilización conjunta de gonadotropinas exógenas con el factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1), que estimula el crecimiento y maduración folicular (Herrler *et al.*, 1990), o la monensina en bovinos que aumenta la sensibilidad del ovario a la FSH (Saumande y Chupin, 1986), o la inmunización contra el factor liberador de hormonas gonadotrópicas (GnRH), con el propósito de homogeneizar la población folicular al momento de la inyección de las gonadotropinas exógenas (Cupps, 1991). Otros han propuesto formas de aumentar la tasa de ovulación (prolificidad), utilizando nuevos enfoques, como el uso de la respuesta inmune para regular la función endócrina provocando una inmunización activa

o pasiva contra diferentes hormonas. Conceptualmente, este método se basa en la neutralización de la acción biológica de una hormona endógena, mediante un complejo antígeno-anticuerpo que se forma *in vivo*. La inmunización de ovejas contra androstenediona (Campbell *et al.*, 1991), estrona, estradiol, testosterona (Land *et al.*, 1982 ; Scaramuzzi *et al.*, 1984) e inhibina (Cummins *et al.*, 1986; Croy, 1993; O'Shea *et al.*, 1994), o contra varias de estas hormonas simultáneamente (Wilson *et al.*, 1991), se ha asociado con aumentos en la tasa de ovulación (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

Finalmente, se ha informado también que las ovejas inmunizadas contra inhibina o contra algunos de los esteroides ováricos, podrían ser más responsivas a los tratamientos de superovulación con gonadotropinas exógenas (Scaramuzzi *et al.*, 1984; Bindon *et al*, 1986; O'Shea *et al.*, 1994).

La investigación en esta área continúa ya que la sobreestimulación del sistema inmune lleva así mismo a fallas reproductivas, entre las que se encuentran anestro, anovulación, mortalidad embrionaria y disminución en el número de nacimientos (Scaramuzzi *et al.*, 1984), además de que se sigue evaluando la repetibilidad de los tratamientos (O'Shea *et al.*, 1994).

El desarrollo de métodos mejorados para inducir y manejar la ovulación depende en gran medida de una mayor comprensión de los mecanismos responsables del desarrollo y diferenciación de los folículos (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Es necesario seguir obteniendo información básica acerca de procesos tales como la ovogénesis, la foliculogénesis y la ovulación normales, ya que los tratamientos utilizados para superovular se superponen al sistema endócrino endógeno del animal y representan un sólo componente del mecanismo que lleva normalmente a la producción de un ovocito fértil (Betteridge, 1993).

2.2 Características de la eCG y su uso en la reproducción.

La eCG tiene 3 usos potenciales no clínicos, en las hembras domésticas: provocar la superovulación para la transferencia de embriones, inducir la ovulación en animales anovulatorios (bovinos y ovinos en anestro) y promover un leve aumento en la tasa de ovulación en hembras cíclicas, con el objeto de aumentar la fecundidad (Bindon y Piper, 1982).

a) Propiedades.

El primer informe de la existencia de una sustancia gonadotrópica en la sangre de yeguas gestantes fue publicado en 1930 por Cole y colaboradores, quienes pensaban que se trataba de una hormona de origen pituitario. En su trabajo encontraron que el suero de las yeguas en ciertas etapas de la gestación estimulaba el sistema reproductor de ratas y ratones inmaduros. Más tarde se descubrió que la fuente de la eCG era las células del epitelio coriónico en la placenta, llegándose eventualmente a concluir su origen trofoblástico y producción por las copas endometriales (Clegg *et al.*, 1954; Walker-Farmer y Papkoff, 1979).

La eCG se detecta inicialmente en la circulación de la yegua alrededor de los días 35 a 42 de gestación, incrementándose rápidamente los niveles, hasta alcanzar un pico entre los días 55 a 65 y disminuyendo después lentamente hasta llegar a concentraciones basales o no detectables para el día 120 a 150 (Cole *et al.*, 1930). Esta hormona se secreta de manera tónica y no es regulada a través de mecanismos hormonales de retroalimentación como las gonadotropinas de origen hipofisiario (Thompson *et al.*, 1982). La eCG deja de secretarse cuando se induce la regresión de las copas endometriales, a través de una repuesta inmunológica materna (Ungerfeld, 1998).

Una molécula de eCG consiste de 2 subunidades disimiles, denominadas α y β que se encuentran unidas no covalentemente (Christakos y Bahl, 1979; Ungerfeld,

1998). En forma aislada, las subunidades son biológicamente inertes, pero su actividad es restaurada en gran medida cuando son recombinadas (Christakos y Bahl, 1979) y esto se debe a que algunas regiones de ambas subunidades están implicadas en el reconocimiento por parte del receptor celular (Pierce y Parsons, 1981). La secuencia de aminoácidos de la subunidad β tiene 149 unidades y la misma estructura primaria que la subunidad β de la LH equina ($_{e}$LH) (Sugino *et al.*, 1987; Bousfield *et al.*, 1987). Aparentemente, los equinos cuentan con un solo gen para producir esta subunidad en ambas hormonas (Cupps, 1991). De hecho, la eCG es más parecida inmunologicamente a la LH que a la FSH (Walker-Farmer y Papkoff, 1979).

De las hormonas glicoproteícas provenientes de diferentes especies animales, la eCG ha sido caracterizada como la más compleja en su estructura de carbohidratos, que incluye azucares neutrales, hexosaminas y un contenido excepcionalmente alto de ácido siálico, mismo que determina la vida media de la molécula (Morell *et al.*, 1971; Papkoff *et al.*, 1978).Tanto la subunidad α como la β están glicosiladas (Christakos y Bahl, 1979; Cupps, 1991).

Como ocurre con otras glicoproteínas (LH, FSH), distintas formas de la eCG son liberadas de acuerdo a los cambios fisiológicos, existiendo diferencias en las propiedades químicas, biológicas e inmunológicas dependiendo de la conformación (González-Menció *et al.*, 1978). Las diferentes formas tienen distinta composición tanto de aminoácidos como de carbohidratos (Aggarwal *et al.*, 1980). Así, González-Menció y colaboradores en 1978, reportaron que la actividad de FSH es mayor en la eCG obtenida entre los días 60 y 90 de gestación y que la actividad de LH disminuye al día 90. Se propone que las variaciones en la bioactividad durante la gestación son función de la heterogeneidad del contenido de carbohidratos, ya que se modifica la vida media de las glicoproteínas en la circulación, al afectarse la unión a receptores (Matteri y Papkoff, 1986). La variación de la actividad biológica de la eCG se da también entre yeguas y entre razas (González-Menció *et al.*, 1978).

La eCG puede ser aislada de su tejido fuente (Cole *et al.*, 1940), pero las propiedades de ésta al compararla con la que se obtiene del suero son así mismo diferentes, encontrándose que la gonadotropina que proviene directamente de las copas endometriales es menos potente. La eCG se excreta también en mínimas cantidades en la orina y aunque se trata de la molécula intacta, la cantidad no es suficiente para que resulte ventajoso obtenerla a partir de este fluido biológico (Walker-Farmer y Papkoff, 1979).

En las preparaciones comerciales hay que considerar que los procedimientos de purificación y extracción pueden eliminar parcialmente a los carbohidratos, explicándose parte de la variabilidad que existe en la actividad biológica de los diferentes lotes y productos disponibles (González-Menció, 1978; Cupps, 1991).

En su eliminación de la circulación, la molécula de eCG es captada por los receptores calcio-dependientes de las células parenquimatosas del hígado, una vez que ha perdido al ácido siálico (Morell *et al.*, 1971; McIntosh *et al.*, 1975).

Para la cuantificación de la eCG, se consideró inicialmente su efecto biológico en ratas, designándose en primera instancia a la Unidad Rata (Rat Unit/RU), que se definía de acuerdo a cambios en el peso del aparato reproductivo (Cole y Saunders, 1935 citados por Ungerfeld, 1998). Más tarde, con la intención de unificar criterios, se adoptó a la Unidad Internacional (UI) (D'Amour y D'Amour, 1940). La actividad biológica de la eCG se compara actualmente con el Segundo Estándar Internacional definido por Bangham y Woodward en 1966 (Ungerfeld, 1998).

b) Mecanismo de acción.

La importancia de las gonadotropinas en el crecimiento folicular depende de la fase de desarrollo en la que se encuentren los folículos (McNeilly *et al.*, 1991). El reclutamiento y desarrollo de los folículos antrales en la oveja es completamente

dependiente de la FSH y el número de folículos que crecen depende tanto de la cantidad de FSH, como del tiempo de exposición a la misma (Picton *et al.*, 1990).

Las gonadotropinas exógenas, que tienen una actividad mixta de FSH y LH, actúan principalmente a través de su actividad de FSH para aumentar la tasa de ovulación (Hay y Moor, 1975; McNeilly *et al.*, 1991). Aunque la interacción que se da entre la FSH y la LH en el control del número de folículos preovulatorios que se desarrollan no esta muy clara, la presencia de LH no se relaciona a un aumento en el número de ovulaciones (McNeilly *et al.*, 1991).

En la oveja, la *eCG* actúa como agente superovulatorio, aumentando el número de folículos primordiales que entran en fase de crecimiento (Lintern y Moore, 1977; Turnbull, 1977), protegiendo a los folículos antrales de sufrir atresia (Moor *et al*, 1984) pero no revirtiéndola (Dott *et al*, 1979), aumentando el índice mitótico de las células de la granulosa de los folículos preantrales y de este modo la tasa de crecimiento (Turnbull, 1977; Monniaux *et al.*, 1984), y disminuyendo el tamaño de los folículos preovulatorios (Driancourt y Fry, 1992). Así, la gonadotropina moviliza folículos más pequeños de los que normalmente crecerían durante el ciclo estral y luego los protege (Driancourt y Fry, 1992), incrementándose el número de folículos ovulatorios disponibles (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El mecanismo por el cual la *eCG* aumenta la tasa de ovulación pudiera también centrarse en su capacidad de activar los sistemas enzimáticos de aromatización de las células de la granulosa, acrecentando la secreción de estradiol por los folículos antrales (Dott *et al.*, 1979 ; McNatty *et al*, 1982). La sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas esta determinada por el número de receptores para LH y FSH presentes en las células de la granulosa (Richards y Midgley, 1976) y la síntesis de estos receptores esta influenciada por la concentración local de hormonas esteroides (Baird y McNeilly, 1981 ; Webb y England, 1982). Los estrógenos incrementan entonces la sensibilidad de las células de la granulosa a la FSH y junto con la FSH

generan receptores para LH (Baird y McNeilly, 1981 ; McNatty *et al.*, 1991). Así, es posible que aquellos folículos en los que las células de la granulosa contengan suficientes receptores de LH puedan ovular en respuesta al pico de LH (Webb y England, 1982; Baird, 1983).

En las ratas se ha reportado también que la integridad del complejo de intercomunicación entre las células de la granulosa y entre éstas y el ovocito (brechas comunicantes o "gap-junctions"), puede ser estrógeno-dependiente (Merk *et al.*, 1972).

c) Modificación de la vida media de la *eCG*.

La vida media larga que faculta a la *eCG* a inducir desarrollo folicular y aumentar la tasa de ovulación, permite también que se estimule el crecimiento de los folículos y que haya un nuevo aumento en la secreción de estradiol después de la ovulación (Driancourt y Fry, 1992). Esto contribuye a la presentación de una gran variedad de efectos secundarios indeseables, que aumentan la variabilidad y disminuyen la eficiencia de la respuesta a los tratamientos de superovulación con esta hormona. El controlar la vida media de la molécula podría limitar el grado de estimulación folicular y la secreción excesiva de esteroides ováricos, aumentándose así su eficiencia biológica (Bindon y Piper, 1977; Moor *et al*, 1984; Jabbour y Evans, 1991).

Se sabe que el ácido siálico juega un papel importante en la regulación de la permanencia en la circulación de las glicoproteínas (Morell *et al.*, 1971) y que la variabilidad en la respuesta ovulatoria puede afectarse por la cinética de la eliminación de la hormona administrada para superovular (Cupps, 1991). La desialización parcial, química o enzimática de la molécula de *eCG*, lleva entonces a la reducción de su vida media (Morell *et al.*, 1971; McIntosh *et al.*, 1975; Cupps, 1991). Sin embargo, esto tiene como consecuencia una considerable disminución de la bioactividad (Martinuk *et al.*, 1991). Además, cuando se aminora la cantidad de ácido siálico, se aumenta la actividad de LH de la hormona, lo que provoca la luteinización de los folículos e inhibe

la aromatización de andrógenos a estrógenos y por lo tanto la ovulación, reduciéndose la eficiencia superovulatoria (Murphy *et al.*, 1984 ; Martinuk *et al.*, 1991). Si el ácido siálico se retira completamente, la molécula se vuelve biológicamente inerte, ya que desaparece rápidamente de la circulación al ser captada por el hígado (Morell *et al.*, 1971).

Otra alternativa ha sido la de controlar la actividad biológica de la eCG, neutralizando a la molécula en sí (Bindon y Piper, 1977; Moor *et al*, 1984; Jabbour y Evans, 1991). Para ello se han desarrollado anticuerpos monoclonales y policlonales, (Pérez *et al.* 1988; Nell y Gielen, 1995), que anulan tanto a la hormona que se encuentra unida a los tejidos como a la que esta circulando (Walton y Armstrong, 1981). El momento en el que se aplica el anti-eCG es muy importante para que sea eficiente (Martemucci *et al.*, 1995; Rubianes *et al.*, 1996), ya que la neutralización de la eCG antes de la concentración máxima del pico preovulatorio de LH deprime la funcionalidad de los folículos estimulados, disminuyendo la tasa de ovulación en las vacas (Vos *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando el antisuero es aplicado pasado el pico de LH, ejerce su efecto durante la fase final de la maduración folicular y/o después de la ovulación, mejorando la respuesta ovulatoria (Ungerfeld *et al.*, 1995; Rubianes *et al.*, 1996).

Aunque se ha reportado que el anti-eCG no afecta a la FSH o a la LH *in vivo* o *in vitro* (Walton y Armstrong, 1981; Nell y Gielen, 1995), Saumande y Chupin (1986) indicaron que existe una cierta reactividad cruzada con la LH en la vaca.

El tratamiento con antisuero no supera la variación en la respuesta primaria de cada individuo a la superovulación (Dieleman *et al.*, 1993; González *et al.*, 1994), con lo que los resultados obtenidos al incorporar el anti-eCG a los tratamientos de superovulación siguen siendo poco predecibles (Armstrong y Evans, 1983; Córdova *et al.*, 1992).

d) Variabilidad en la respuesta a la eCG.

Existen diversos factores que contribuyen a la variabilidad de la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación en los ovinos. La expresión fenotípica de la tasa de ovulación esta determinada por un mecanismo fisiológico que se ve afectado por factores medio-ambientales, dentro de un rango genéticamente predeterminado (Campbell *et al.*, 1995). Al existir interacciones entre los diferentes factores, se dificulta el separar la contribución de cada uno de ellos en el resultado (Armstrong y Evans, 1983).

① Momento de aplicación de la hormona:

- Condición ovárica: En cualquier momento dado existen folículos de diferente tamaño y etapa de desarrollo en el ovario de la oveja adulta (Driancourt *et al.*, 1985). Los folículos preovulatorios están presentes a través del ciclo estral y durante el anestro y se relacionan numéricamente a la tasa de ovulación de la raza (Campbell *et al.*, 1995). El que no existan ovulaciones durante la fase lútea o en el anestro se explica por la falta de exposición de los folículos a una cantidad adecuada de gonadotropinas y a la incapacidad resultante de generar el pulso preovulatorio de LH (McNeilly *et al.*, 1991). En la oveja, el número de folículos que ovulan, en un ciclo no estimulado, se determina en los 3 días que preceden al inicio del estro (Land, 1973).

Se piensa que la obtención de un buen número de embriones viables en la superovulación esta determinado en gran parte por la presencia de folículos responsivos al momento de la administración de la gonadotropina y el grado de estimulación depende del número, tamaño, distribución y condición de las clases foliculares. Así, cuando los folículos responsivos tienen una condición similar de maduración, el estímulo dado por las gonadotropinas es seguido por un proceso apropiado de ovulaciones múltiples, mientras que si el grupo muestra una gran

heterogeneidad, la respuesta puede caracterizase por una asincronía en el crecimiento folicular y luteinización de los folículos (Rubianes *et al.*, 1996).

Driancourt (1987), propone que la tasa de ovulación inducida por la *eCG* no está correlacionada con la población de folículos antrales, está significativamente correlacionada con el número de folículos sanos de entre 0.8 y 2mm de diámetro y está negativamente correlacionada con el número de folículos sanos mayores a 2mm de diámetro, concluyendo que los ovarios libres de folículos grandes y ricos en folículos chicos tienen la mejor respuesta.

La variabilidad que existe en la respuesta a los esquemas de superovulación entre individuos podría ser principalmente entonces de origen ovárico (Driancourt, 1987) y depender de la fase de crecimiento folicular en la que se empiece el tratamiento. Sin embargo, las diferencias macroscópicas en la población folicular al momento de la administración de la *eCG* no se han relacionado consistentemente a la subsecuente respuesta ovulatoria, ya que la destrucción de todos los folículos mayores a 1mm de diámetro en ganado bovino no alteró los resultados al utilizar *eCG* (Driancourt y Fry, 1988). En los borregos también se conoce que el efecto de la etapa del ciclo ovárico en la respuesta superovulatoria es mínimo (McMillan *et al*, 1990).

- Dominancia folicular: En los ciclos estrales espontáneos, se produce una reducción en el número de folículos preovulatorios grandes que maduran durante la fase folicular, debido principalmente a la competencia por la FSH (Cahill y Mauleón, 1980; Driancourt y Fry, 1988). En los bovinos, se ha dado una asociación entre la presencia de folículos grandes y una respuesta pobre a la superovulación (Grasso *et al.*, 1989), mientras que en las borregas, el o los folículos dominantes emergen entre 12 y 24h después de la luteólisis y no afectan significativamente la tasa de ovulación inducida por la *eCG* ni los parámetros de diferenciación morfológica (tamaño, atresia), ni funcional (esteroidogénesis) dentro del ovario *in vivo* (Tsonis

et al., 1984; Driancourt, 1991). La dominancia folicular puede ser además compartida entre varios folículos, dependiendo de la tasa ovulatoria (Greenwald y Terranova, 1988). Esto indica que el grado de dominancia es mucho menos marcado en la oveja (Campbell *et al.*, 1995; Ginther *et al.*, 1995) y que puede ser superado aumentando las concentraciones de gonadotropinas (Driancourt *et al.*, 1991).

② Genética: La tasa de ovulación en la oveja esta determinada por su genotipo y es característica de la raza (Campbell *et al.*, 1995). De hecho, puede darse una variación considerable en el número de ovulaciones entre las líneas dentro de las razas (Driancourt *et al.*, 1986; Scaramuzzi *et al.*, 1993), lo que se debe a que existen diferentes mecanismos de control ovárico que operan en cada una de ellas. Tanto los patrones de crecimiento folicular terminal como la diferenciación morfológica y funcional de los folículos ovulatorios son distintos entre razas y las estrategias utilizadas para generar tasas de ovulación elevadas en borregas de razas prolíficas, se asocian a un reclutamiento prolongado durante la fase folicular (Booroola), a un número grande de folículos reclutados (Romanov), a una incidencia reducida de degeneración folicular al momento de la selección (Finn) (Driancourt *et al*, 1986; Cupps, 1991), a una menor sensibilidad a la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales, a una mayor susceptibilidad ovárica a la FSH y la LH (Cahill *et al.*, 1979; Bindon *et al.*, 1986), a una mayor secreción de LH a mitad del ciclo (Land *et al.*, 1972), y a una mayor eficiencia de la FSH circulante (Driancourt *et al.*, 1986). Se ha propuesto también que los niveles de estradiol son mayores en las hembras de fertilidad alta, pero como la sensibilidad a la retroalimentación es menor, el pico de LH ocurre más tarde, lo que extiende el desarrollo folicular preovulatorio y permite un mayor tiempo de exposición a las gonadotropinas (Cahill, 1981 ; McLeod y Haresign, 1984).

La tasa de ovulación naturalmente alta está relacionada positivamente con la tasa de ovulación inducida por la eCG (Bindon *et al.*, 1986).

③ Edad: Como regla general, se sostiene que la respuesta ovulatoria esta a su máximo cuando la fecundidad de los animales se encuentra en su punto más alto (3-5 años), y que la edad avanzada puede deprimir la respuesta ovulatoria (Moore, 1982). En cuanto a los animales jóvenes, Armstrong y Evans (1983) proponen que el cuerpo lúteo podría no estar produciendo progesterona en cantidades suficientes para preparar adecuadamente al sistema hipotálamo-hipofisiario para que induzca la ovulación y al cérvix y al útero para permitir la fertilización.

En un estudio hecho por Ruttle y colaboradores (1988), con borregas Rambouillet, no se encontraron diferencias entre edades (borregas de 2 a 7 años de edad), en cuanto al número de cuerpos lúteos observados por laparotomía, después de administrar FSH para inducir la superovulación. Sin embargo, los animales de 3, 4 y 5 años de edad, produjeron más embriones totales que los de 6 años y el mayor y menor número de embriones transferibles se obtuvieron de las ovejas de 3 y 7 años, respectivamente.

④ Nivel nutricional: Los cambios en la ingesta de alimento, la condición y el peso corporales provocan variaciones en la tasa de ovulación en la oveja. Esto puede estar mediado por modificaciones en los niveles de FSH en sangre, alterándose el patrón de exposición de los folículos a esta gonadotropina, o por un efecto directo en el ovario, donde nutrientes específicos como la glucosa, la insulina y el IGF-1 aumentan la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas (Downing y Scaramuzzi, 1991; Foxcroft, 1993).

En animales que fueron alimentados con una dieta de submantenimiento, la administración de eCG aumentó el número de folículos, sugiriendo que los efectos

nutricionales en la actividad ovárica de las borregas se relacionan a la concentración de gonadotropina en sangre que llega al ovario (Downing y Scaramuzzi, 1991).

Aunque en algunos casos se ha observado que las ovejas más pesadas presentan más ovulaciones para una dosis dada de *eCG*, la magnitud de los coeficientes de regresión entre la ovulación y el peso corporal, no justifica la administración de *eCG* con base en el peso vivo (Bindon y Piper, 1982).

⑤ Producción de anticuerpos: Las preparaciones hormonales de naturaleza proteica tienen la capacidad de provocar antigenicidad. La formación de anticuerpos podría llevar a una disminución en la respuesta ovárica inducida por gonadotropinas como la *eCG*, después de varias aplicaciones (Jainudeen *et al.*, 1966). Sin embargo, debido a que el intervalo entre los tratamientos varía y a que la preparación de la hormona utilizada cambia, existe gran controversia al comparar los resultados entre estudios (Christie *et al.*, 1979). En las vacas, la administración repetida de *eCG* provocó una condición refractaria de la respuesta ovárica, a partir de la tercera inyección, aunque no se observaron efectos adversos en el desarrollo folicular y la ovulación dada por las gonadotropinas endógenas (Jainudeen *et al.*, 1966), o no se presentó ningún cambio en la tasa de ovulación ni en el promedio de ovocitos recuperados después de 5 a 10 aplicaciones de *eCG* (Christie *et al.*, 1979; Gherardi y Lindsay, 1980).

Hay poca evidencia que sugiera que la respuesta ovulatoria a tratamientos repetidos con *eCG* en la oveja se vea afectada por tratamientos previos (Hunter, 1984).

⑥ Estación del año: Las ovejas muestran un patrón distintivo de reproducción estacional, aunque existen variaciones entre razas. Durante el anestro, hay una inhibición de la secreción tónica de LH que se da por un aumento en la sensibilidad a

la retroalimentación negativa de los estrógenos de origen ovárico (Land, 1978). El incremento en el fotoperiodo, es la señal que desencadena estos cambios, estando mediada por la secreción de melatonina por la glándula pineal (McNatty *et al.*, 1984; Foxcroft, 1993). La incidencia de atresia folicular esta también claramente asociada al fotoperiodo, de manera que después de una etapa de días largos, se observa una marcada reducción, mientras que después de un periodo de días cortos, los animales muestran mayores niveles de regresión folicular (Cahill *et al*, 1984 ; Ryan *et al.*, 1987).

El número de ovulaciones sigue un patrón estacional, con una tasa mayor a la mitad de la época reproductiva y relativamente menor al principio y al final de la misma (Gherardi y Lindsay, 1980; Scaramuzzi *et al.*, 1993). La calidad de los ovocitos puede verse afectada así mismo por la estación (Betteridge, 1993).

El ovario cambia su sensibilidad a la *eCG* durante el año, probablemente como reflejo de la interacción con los niveles endógenos de LH (Gherardi y Lindsay, 1980).

⑦ Dosis: Los niveles de estradiol y progesterona secretados después de la estimulación ovárica con *eCG*, son dependientes de la dosis administrada y del tiempo de exposición de los folículos a la gonadotropina (Evans y Robinson, 1980). El aumento en las concentraciones de estrógenos provoca alteraciones en diversos procesos reproductivos, afectándose la respuesta a la superovulación (Moor *et al.*, 1985; Driancourt y Fry, 1992 ; Rubianes *et al.*, 1996).

A mayores dosis de *eCG*, asociadas a ovarios sobreestimulados, se deprime la tasa de ovulación (Moore, 1981), se reduce la tasa de recuperación, probablemente porque la fimbria es incapaz de envolver a todo el ovario y parte de los ovocitos se pierden en la cavidad abdominal (Nellenschulte y Niemann, 1992), y se aumenta la incidencia de cuerpos lúteos de corta duración (Ryan *et al.*, 1987).

⑧ Lote/Preparación: La cantidad relativa de la actividad biológica como FSH o como LH de la eCG en los diferentes lotes y preparaciones comerciales contribuye a la falta de predictibilidad en la respuesta superovulatoria (Murphy *et al.*, 1984). Esta proporción puede variar dependiendo del momento en el que la hormona sea obtenida (día de la gestación), así como del animal y de la raza de los que se trate (Murphy *et al.*, 1984; González-Menció *et al.*, 1978); o al utilizar diferentes procedimientos de purificación y extracción que pueden eliminar parcialmente el contenido de carbohidratos de la molécula (González-Menció, 1978).

⑨ Otros factores: Las diferentes tasas de absorción de la eCG desde su sitio de aplicación (Meinecke-Tillmann *et al.*, 1987), el momento en el que se da la monta, el número de servicios (Armstrong y Evans, 1983), el sistema por el cual se determina la tasa de ovulación y recuperación de los embriones y los métodos utilizados para el mantenimiento y el manejo de los animales (Monniaux *et al.*, 1983), pueden contribuir a la variabilidad que se presenta en la respuesta superovulatoria. Sin embargo, resulta difícil estimar la importancia relativa de cada uno de estos elementos (Armstrong y Evans, 1983).

3. METODOLOGIA

3.1 Localización.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el Km 28.9 de la carretera federal México-Cuernavaca, en Topilejo, Delegación Tlalpan, Distrito Federal.

El CEPIER se encuentra a una latitud norte de 19° 11', una longitud oeste de 99° 1' y una altura sobre el nivel del mar de 2760m. El clima de la región es de tipo c(w) (w)b (ij) que corresponde a semifrío subhúmedo con lluvias en verano, una temperatura promedio de 13.7°C y una precipitación pluvial de 800 a 1200mm anuales (García, 1988).

3.2 Animales.

Para este estudio se utilizaron 36 borregas criollas adultas, de diferente edad y número de parto y con un peso promedio de 45Kg. Se incluyeron solamente individuos cuya ciclicidad fue previamente verificada por medio de la detección de estros por machos celadores provistos de un mandil.

Los animales se mantuvieron en estabulación, bajo condiciones de luz natural y recibieron como alimento ensilado de maíz y heno de avena. El agua de bebida estuvo continuamente disponible.

El experimento se llevó a cabo dentro de la época de actividad reproductiva, durante los meses de noviembre de 1997 a enero de 1998.

3.3 Sincronización del ciclo estral.

El ciclo estral de las ovejas fue sincronizado mediante esponjas intravaginales impregnadas con 40mg de Acetato de Fluogestona (Chronogest, Intervet México), que

permanecieron *in situ* durante 12 días. Tanto la aplicación como el retiro de las esponjas se hizo a primera hora de la mañana (8:00h). Setenta y dos horas antes de quitar el progestágeno, se aplicó una inyección intramuscular de 5mg de dinoprost (Lutalyse, Upjohn, México), con el objeto de eliminar la presencia de cuerpos lúteos funcionales al momento de finalizar el tratamiento.

3.4 Superovulación.

Las ovejas fueron superovuladas con eCG (Folligon, Intervet México) y, en su caso, con anti-eCG policlonal, desarrollado en bovinos (Pérez *et al.*, 1988), en el Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal en La Habana, Cuba en mayo de 1996. El lote de anticuerpo utilizado (FC50H) fue reevaluado, antes del experimento, en su lugar de origen para descartar que el tiempo de almacenamiento hubiera afectado su capacidad inhibitoria, confirmándose que 2ml del anti-eCG son capaces de neutralizar 3000UI de eCG. Dentro de cada grupo, se aplicó la cantidad suficiente de anticuerpo para inhibir a las UI de eCG administradas.

Las 36 borregas fueron divididas aleatoriamente en 6 grupos :

- Grupo 500 (n=8): Se aplicaron 500UI de eCG por vía intramuscular en una inyección única 2 días antes del retiro del progestágeno.
- Grupo 500 + anti-eCG (n=8): Se siguió el mismo tratamiento que en el Grupo 500, administrando además 0.33ml de anti-eCG por vía intramuscular 12h después de la detección del estro en cada individuo (Rubianes *et al.*, 1996).
- Grupo 750 (n=8): 2 días antes del retiro del progestágeno intravaginal, se administraron 750UI de eCG, vía intramuscular en una dosis única.
- Grupo 750 + anti-eCG (n=8): Se siguió el mismo tratamiento que para el Grupo 750, aplicando además 0.5ml de anti-eCG (i.m.), 12h después de haberse presentado el celo.

- Grupo testigo: Con el propósito de verificar que el lote de eCG utilizado tuviera la capacidad de provocar una respuesta superovulatoria aplicando 1000UI de eCG, de acuerdo con las dosis recomendadas en la literatura (Evans y Armstrong, 1984; Martemucci *et al.*, 1995; Mejía *et al.*, 1995), se incluyeron como testigos a 2 animales a los que se les administraron únicamente 1000UI de eCG (Grupo 1000), y a otros 2 que recibieron 1000UI de eCG y 0.7ml de anti-eCG (Grupo 1000 + anti-eCG), siguiendo el mismo protocolo que se usó para los demás grupos.

3.4.1 Laparoscopía transabdominal.

Con la finalidad de darle un seguimiento al surgimiento y evolución de las diferentes estructuras ováricas originadas por los distintos tratamientos de superovulación utilizados en este estudio, se tomaron 2 animales de cada grupo y se observaron, valoraron y cuantificaron los folículos y cuerpos lúteos presentes en cada ovario mediante laparoscopía. Para ello, se empleó un laparoscopio operatorio recto de 20cmx5mm (Storz, Alemania), acoplado a un sistema de fibra óptica flexible, y un bastón manipulador de 5mm de diámetro. Los folículos fueron clasificados por tamaño, destacando a aquellos que fueran mayores a 5mm de diámetro. Los cuerpos lúteos se designaron como normales, cuando se mostraban bien definidos, bien irrigados y con una coloración naranja o roja y como en regresión, cuando el color era amarillo pálido o blanco-azulado y sin irrigación marcada (Oldham y Lindsay, 1980; Cerbón *et al.*, 1995). Tanto la preparación quirúrgica del área, como la anestesia se llevaron a cabo de manera similar a la descrita más adelante para la laparotomía medio-ventral. Las borregas fueron sometidas a este procedimiento cada tercer día, empezando 24h después de la administración de la eCG y concluyendo 2 días antes del día en el que la recolección de embriones fue programada en el resto de los animales. Así, se hicieron en total 4 observaciones por individuo, siguiendo la técnica descrita por Oldham *et al.*, en 1976. En el día en el que se realizó la segunda observación (día 0 del ciclo), se

marcaron los folículos de mayor tamaño, que para ese momento debían corresponder a aquellos seleccionados para ovular (Driancourt y Cahill, 1984), lo que permitió un seguimiento de la evolución y desenlace de los mismos en las observaciones posteriores. Para ello, se hizo una tercera incisión por la cual se introdujo, a través de una cánula, una pistola de inseminación intrauterina metálica (Pistolet Universel, IMV, Francia) (Cerbón *et al.*, 1995), que contenía una pajilla de plástico desechable de 0.25cm llena de tinta china comercial, que iba dentro de una pipeta con punta (ASPICS pailletes, IMV, Francia). Observando a través del laparoscopio, se insertó la punta de la pipeta en el estroma ovárico adyacente a los folículos y se depositó la tinta, con lo que quedaron señalados por un punto obscuro. Debido a la intensa manipulación de útero, oviductos y ovarios que se dio al llevar a cabo las observaciones laparoscópicas y a la suposición de que esto modificaría la calidad y cantidad de los embriones y/u ovocitos que pudieran recuperarse, se decidió no realizar la recolección en estos animales.

3.5 Detección de celos y monta.

La detección de calores se llevó a cabo tres veces al día (a las 8:00, 14:00 y 20:00h), empezando 24h después del retiro del progestágeno intravaginal y utilizando machos celadores provistos de un mandil. La presentación del estro se definió como el momento en el que la hembra aceptó la monta.

Los animales detectados en celo fueron servidos por monta natural dirigida, utilizando machos de fertilidad probada. El día en el que se presentó el estro y se llevó a cabo el primer servicio fue considerado como el *día 0* del ciclo. Las montas se continuaron durante el tiempo en el que las hembras permanecieron receptivas.

3.6 Laparotomía medio-ventral y recolección de embriones.

En el día 6 del ciclo (Killeen, 1982), se llevó a cabo la observación de las estructuras ováricas y la recolección de embriones mediante la técnica de laparotomía medio-ventral, en aquellos animales a los que no se les realizaron observaciones laparoscópicas repetidas.

La recolección de embriones se realizó solamente en los individuos cuyos ovarios presentaban por lo menos 4 cuerpos lúteos, ya que a este número se le señala como evidencia de respuesta satisfactoria a la superovulación (Mejía *et al.*, 1995; Kühholzer *et al.*, 1998). Además, debido a que se ha informado que la presencia de cuerpos lúteos en regresión prematura afecta la producción y recuperación de embriones (Schiewe *et al.*, 1990; Cerbón *et al.*, 1995; Luyando *et al.*, 1995), este procedimiento se siguió en los animales que, habiendo superovulado, tuvieran únicamente cuerpos lúteos sanos. En los individuos en los que estas condiciones no se observaron, la laparotomía permitió la cuantificación y valoración de las estructuras ováricas.

Las ovejas se dietaron tanto de alimento como de agua durante las 24 horas previas a la cirugía. El procedimiento inició con la tranquilización preanestésica del animal, administrando intramuscularmente hidrocloruro de xilacina al 2%, a una dosis de 0.01g/50kg de peso vivo. Diez minutos más tarde, se procedió con la preparación quirúrgica del área, que consistió en el afeitado, lavado y desinfección del abdomen en un área anterior a la ubre de aproximadamente 20cm^2. Se utilizó Ketamina como anestésico disociativo a razón de 2mg/kg de peso vivo, vía endovenosa (Mejía *et al.*, 1995). La cirugía se realizó colocando al animal en decúbito dorsal sobre una mesa de cirugía reclinable. Tomando como referencia el punto de inicio a 4cm adelante de la glándula mamaria, se hizo una incisión de aproximadamente 7 cm de largo sobre la línea media. Se exteriorizó el útero y se examinaron los ovarios para valorar la respuesta al tratamiento superovulatorio. Para el lavado de cada uno de los cuernos uterinos, que se

llevó a cabo de manera individual, se introdujo una sonda de Foley (calibre 8Fr, Adex), en la base del cuerno mediante una punción realizada con un catéter intravenoso (14G X 5 1/2, Abbocath). El globo de la sonda se infló con una cantidad suficiente de aire para que se bloqueara el paso de la solución infundida y se mantuviera firme en su lugar, sin provocar presión excesiva ni dañar a las paredes con las que estaba en contacto. A través de un segundo catéter intravenoso (18G X 1 1/4, Surflo), que se insertó en la punta del cuerno, se introdujeron 40ml de solución salina amortiguada fosfatada (PBS), adicionada con 4% de albúmina sérica bovina (Moore, 1982) y 100UI/ml de penicilina G sódica, que se encontraba a una temperatura de 37°C. Con el objeto de evitar la pérdida de embriones por reflujo del medio infundido hacia el oviducto, se hizo presión digital en la unión útero-tubárica. El PBS fue recolectado en un filtro concentrador y llevado al laboratorio, donde se localizaron, valoraron y clasificaron los embriones y ovocitos. Concluida la recolección, se suturó la incisión por la que se introdujo la sonda de Foley mediante un punto sencillo con dexon de cuatro ceros y el útero se regresó gentilmente a la cavidad abdominal. Durante todo el procedimiento el útero se irrigó constantemente con solución salina fisiológica con el fin de evitar la deshidratación y minimizar las adherencias. La intervención finalizó suturando tanto el peritoneo, como la línea alba con puntos en equis (dexon de dos ceros), y la piel con puntos separados, utilizando nylon de dos ceros.

Finalmente, una dosis de 5mg de dinoprost les fue aplicada a los animales en los que se llevó a cabo el lavado, con la finalidad de provocar la regresión de los cuerpos lúteos y evitar que quedaran embriones en el útero.

A todos los individuos que fueron sometidos a cirugía, se les administró un antibiótico parenteral de larga acción como tratamiento preventivo.

3.7 Evaluación de embriones.

Las estructuras obtenidas en el lavado se evaluaron y separaron, con un microscopio estereoscópico, en ovocitos y embriones, clasificando a estos últimos de acuerdo a su estado de desarrollo en mórulas y blastocistos (Wintenberger y Sevellec, 1992), y de acuerdo a su calidad morfológica en 1=excelente- esférico, compacto, simétrico, bien definido, la zona pelúcida intacta; 2=bueno- ligeramente asimétrico, bien definido, algunos blastómeros extruidos, zona pelúcida intacta; 3=regular- descompactación marcada, blastómeros extruidos, contorno impreciso, ligeramente asimétrico, zona pelúcida intacta y 4=pobre- descompactación, degeneración marcada, contorno impreciso, retraso en el desarrollo (Linder y Raymond, 1983; Ruttle *et al.*, 1988).

Los embriones fueron mantenidos a temperatura ambiente (16-20°C), durante la observación y valoración al microscopio.

3.8 Muestreo.

Se obtuvieron diariamente muestras de sangre de todos los animales por punción yugular (2ml aproximadamente), utilizando tubos heparinizados y al vacío, empezando el día de la aplicación de la eCG y concluyendo el día del lavado para la recuperación embrionaria.

Las muestras colectadas se centrifugaron a 2500rpm, durante 10min dentro de la hora siguiente a su obtención, el plasma se separó y almacenó a -20°C hasta el momento en el que los niveles de progesterona fueron determinados mediante radioinmunoanálisis de fase sólida (Srikandakumar *et al.*, 1986).

3.9 Análisis estadístico.

El efecto de la dosis de eCG y de la aplicación del anticuerpo sobre el número total de cuerpos lúteos en el día 6 del ciclo se evaluó por medio de análisis de varianza,

utilizando un modelo que incluyó la dosis, el anticuerpo (si fue administrado o no), la interacción de primer orden entre estos dos factores y el error. Con el objeto de aproximar el cumplimiento de las suposiciones que fundamentan al análisis de varianza, se utilizó la transformación de raíz cuadrada de los datos para el análisis. Las comparaciones múltiples se calcularon utilizando la diferencia mínima significativa. La homogeneidad de varianzas se verificó después de la transformación con una prueba de Bartlett (P=0.11).

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la presencia o ausencia de folículos mayores a 5mm de diámetro observados por laparotomía medio-ventral en el día 6 postestro, se utilizó una prueba de ji-cuadrada.

La relación existente entre los niveles plasmáticos de progesterona y los cuerpos lúteos (totales, normales y en regresión), observados en el día 6 del ciclo, y entre la presencia de folículos mayores a 5mm de diámetro y los cuerpos lúteos en regresión vistos en ese mismo día, se determinó mediante coeficientes de correlación por rangos de Spearman.

Los perfiles plasmáticos de progesterona observados entre los días 2 y 6 del ciclo estral en cada grupo se compararon utilizando un análisis de varianza para mediciones repetidas, mediante el procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM), del paquete de análisis estadístico SAS.

Finalmente, se subdividió a las ovejas como animales no estimulados cuando mostraron de 1 a 2 cuerpos lúteos en los ovarios (NE), como animales estimulados a los que presentaron por lo menos 3 cuerpos lúteos (E), y como animales estimulados con cuerpos lúteos en regresión (E/Clreg) a aquellos que además de tener ≥3 cuerpos lúteos, presentaran la regresión de alguno(s) de estos. Cabe aclarar que no se dio ninguna observación en la que coincidiera la ausencia de estimulación con la presencia de cuerpos lúteos en regresión prematura. Para comparar el patrón de secreción de progesterona entre estas tres categorías, se utilizó un análisis de regresión que

incluyó como variable de respuesta a la concentración de progesterona, y como variables independientes a la categoría, al individuo anidado dentro de la categoría, al día del ciclo, al efecto cuadrático del día del ciclo y a las interacciones correspondientes (día x categoría).

El número total de cuerpos lúteos y las concentraciones plasmáticas de progesterona se presentan en forma de medias ± error estándar (x±.e.e).

Las diferencias significativas se consideran cuando $P<0.05$.

4. RESULTADOS

De los 36 animales incluidos inicialmente en el experimento, fue necesario excluir a uno por enfermedad (Gpo.750+anti-eCG), y a otro por no presentar celo (Gpo.750).

Los grupos testigo que recibieron 1000UI de eCG y 1000UI de eCG+anti-eCG, mostraron una respuesta superovulatoria media de 6±2.16 cuerpos lúteos totales, comprobándose que el lote de eCG utilizado tuvo la capacidad de inducir superovulación satisfactoriamente. Estos animales no fueron considerados posteriormente para la presentación de los resultados.

4.1 Estro y respuesta superovulatoria.

Con la excepción de un solo individuo que no presentó estro conductual (Gpo.750), todos los animales entraron en celo dentro de las 36h siguientes al retiro del progestágeno intravaginal.

◆ Número total de cuerpos lúteos como indicador de la tasa ovulatoria:

El 87% de las borregas incluidas en este trabajo presentó 2 ovulaciones o más en respuesta a los tratamientos empleados. El promedio de ovulaciones para el total de las ovejas utilizadas fue de 3.81±0.67. La dosis de 750UI de eCG provocó una respuesta superovulatoria de mayor magnitud que la dosis de 500UI ($P<0.05$) (Cuadro 1). Así mismo, los animales a los que se les aplicaron anticuerpos, mostraron una respuesta mayor que los que no los recibieron (Cuadro 1) ($P<0.05$). Por otro lado, las comparaciones entre tratamientos muestran que cuando se aplicaron 500UI de eCG, el número de ovulaciones entre los animales que recibieron o no al antisuero fue similar ($P>0.05$), mientras que al administrar 750UI de la hormona e incluir al anticuerpo, la diferencia fue significativa (Cuadro 2) ($P< 0.05$).

Cuadro 1: Medias del total de cuerpos lúteos observados por laparotomía medio-ventral en el día 6 del ciclo en ovejas a las que se les administraron 2 dosis diferentes de *eCG*, sin considerar la aplicación de anticuerpo, o en las que se incluyó o no al anti-*eCG* en el esquema de superovulación, independientemente de la dosis.

Tratamiento	n	Total de cuerpos lúteos x±e.e
eCG		
- 500UI	12	2.41±0.93 a
- 750UI	11	5.21±0.98 b
Anti-eCG		
- ausencia	11	2.38±0.98 a
- presencia	12	5.25±0.93 b

n=número de animales, x=media, e.e= error estándar.
a,b Medias con diferente literal P<0.05.

Cuadro 2: Promedio del total de cuerpos lúteos observados por laparotomía medio-ventral en el día 6 del ciclo en ovejas tratadas con 500UI o con 750UI de *eCG*, incluyendo o no la administración de antisuero.

Grupo	n	Total de cuerpos lúteos x±e.e
500	6	2.16±0.47 b
500+anti-*eCG*	6	2.66±0.49 b
750	5	2.60±0.67 b
750+anti-*eCG*	6	7.83±2.42 a

n=número de animales, x=media, e.e= error estándar.
a,b medias con diferente literal dentro de columna (P<0.05).

La aplicación de *eCG* a dosis reducidas produjo una respuesta superovulatoria satisfactoria (≥4 cuerpos lúteos, ver metodología), únicamente en el 25% y el 45.45% de las borregas para los tratamientos de 500UI y 750UI de *eCG* respectivamente, agrupándolas sin considerar la administración del anticuerpo.

◆ Persistencia folicular:

Al evaluarse el efecto del tratamiento sobre la presencia de folículos mayores a 5mm de diámetro en el día 6 postestro, se advirtió que la frecuencia de animales que presentaron estas estructuras se incrementó con la dosis (1/12 animales cuando se utilizan 500UI de eCG y 5/11 animales cuando se administran 750UI) (χ^2=4.10; P<0.04). Sin embargo, la inclusión del anticuerpo no tuvo efecto aparente sobre el número de folículos observados en esta fecha (P>0.1).

Considerando a los animales en los que se llevaron a cabo laparoscopías repetidas, el marcaje con tinta china de los folículos mayores a 5mm de diámetro se logró en 6 de 7 individuos, señalándose por lo menos un folículo en cada uno de ellos (día 0), y obteniéndose un total de 8 folículos marcados. En el séptimo sujeto, los folículos cubrían casi por completo al estroma ovárico, imposibilitándose el depósito de la tinta. Cuatro de las señales se perdieron a partir de la laparoscopía siguiente al marcaje y la presencia de 3 cuerpos lúteos con un punto negro adyacente indicó que hubo 3 ovulaciones de folículos marcados entre la observación hecha en el día 0 y la efectuada en el día 2. La señal que identificaba al folículo restante pudo distinguirse, en cada una de las laparoscopías hechas hasta el día 4, sin que se diera la ovulación, lo que indicó la persistencia del folículo. En el animal en el que no se logró el marcaje, se observó un folículo mayor a 5mm de diámetro en el mismo ovario y posición durante las tres laparoscopías consecutivas que se hicieron entre el día 0 y el día 4 del ciclo, sugiriendo también una persistencia folicular. Por otro lado, en dos de las borregas en las que la laparoscopía había revelado la ausencia de folículos grandes en el día 2, se advirtieron folículos mayores a 5mm de diámetro en el día 4, por lo que se consideraron como de nueva formación (Cuadro 3).

Cuadro 3: Presencia de folículos mayores a 5mm de diámetro entre el día 0 y el día 4 del ciclo en los animales a los que se le hicieron observaciones laparoscópicas repetidas.

Tratamiento	Identificación del animal	Número de folículos >5mm de diámetro		
		Día 0	Día 2	Día 4
500	-E50	1	0	0
	-E70	2	0	2•
500+anti-eCG	-E11	2	1*	1*
	-E63	4	0	0
750	-E51	1	1	0
	-642	1	0	2•
750+anti-eCG	-E72	5	1*?	1*?

* Folículos persistentes desde el día 0.
• Folículos de nueva formación.

◆ Cuerpos lúteos de corta duración:

No existió un efecto aparente del tratamiento en la presencia de cuerpos lúteos de corta duración (P>0.05).

En las observaciones hechas por laparotomía en el día 6 del ciclo, pudo hacerse una distinción entre cuerpos lúteos normales y cuerpos lúteos en regresión, de acuerdo a las características morfológicas macroscópicas definidas en la metodología. Cabe señalar que los cuerpos lúteos en regresión fueron observados únicamente en las borregas que tenían, en todos los casos, por lo menos 3 cuerpos lúteos en los ovarios (n=7). La coexistencia de cuerpos lúteos normales y cuerpos lúteos de corta duración en el mismo individuo pudo advertirse en 3 de éstos animales.

La relación entre la presencia de folículos >5mm y la formación de cuerpos lúteos que regresan tempranamente mostró una correlación positiva significativa (r:0.54 ; P=0.011), cuando se consideró a todos los tratamientos en conjunto.

4.2 Perfil endócrino.

En el cuadro 4 se muestran los niveles de progesterona a partir del día 2 después del estro, donde se observa un aumento progresivo al avanzar los días del

ciclo (P<0.01). Además, los resultados indicaron que las concentraciones de progesterona dentro de cada día no variaron entre grupos (P>0.05) y que no fue posible distinguir una interacción entre el día y el grupo (P>0.05).

Cuadro 4: Concentraciones plasmáticas medias de progesterona (ng/ml) en los días 2 a 6 del ciclo en los animales de los diferentes grupos.

	Grupo			
	500	**500+anti-eCG**	**750**	**750+anti-eCG**
	n=8	n=8	n=7	n=7
Día del ciclo	x ± e.e.	x ± e.e.	x ± e.e.	x ± e.e.
2	0.01 ± 0.07	0.0 ± 0.07	0.2 ± 0.08	0.1 ± 0.09
3	0.6 ± 0.47	0.4 ± 0.47	1.3 ± 0.49	1.7 ± 0.57
4	1.7 ± 0.59	1.4 ± 0.59	1.9 ± 0.62	3.1 ± 0.71
5	4.6 ± 1.15	3.4 ± 1.15	3.0 ± 1.22	3.8 ± 1.39
6	6.9 ± 1.66	4.3 ± 1.66	3.8 ± 1.75	7.3 ± 2.0

n=número de animales, x=medias de cuadrados mínimos, e.e.=error estándar.
No se encontraron diferencias entre grupos (P>0.05).
Se observa un aumento progresivo al avanzar los días del ciclo dentro de cada grupo (P>0.01)

En el día 6 postestro, los niveles de progesterona no variaron entre los animales tratados con diferentes dosis de *eCG* (500UI=5.5±1.2 *vs* 750UI=5.37± 1.4; P>0.05), cuando los animales se agruparon independientemente de la inclusión del anticuerpo.

Las concentraciones plasmáticas de progesterona para las ovejas agrupadas de acuerdo a la respuesta superovulatoria en ovejas no estimuladas (NE), ovejas estimuladas (E) y ovejas estimuladas con cuerpos lúteos en regresión (E/CLreg), se presentan en la Figura 1. El análisis de regresión mostró que para las dos categorías en las que el tratamiento superovulatorio estimuló un incremento en las ovulaciones, los niveles de progesterona se elevan y difieren de cero a partir del día 3 del ciclo estral (P<0.05), mientras que en los animales no estimulados, esto sucede hasta el día 5. Además, se observaron diferencias en los días 4,5 y 6 entre las borregas E y las E/Clreg, y en los días 5 y 6 entre las primeras y las NE (P<0.05). El único día en el que se observaron diferencias entre las ovejas NE y las E/Clreg fue en el día 4 (P<0.05).

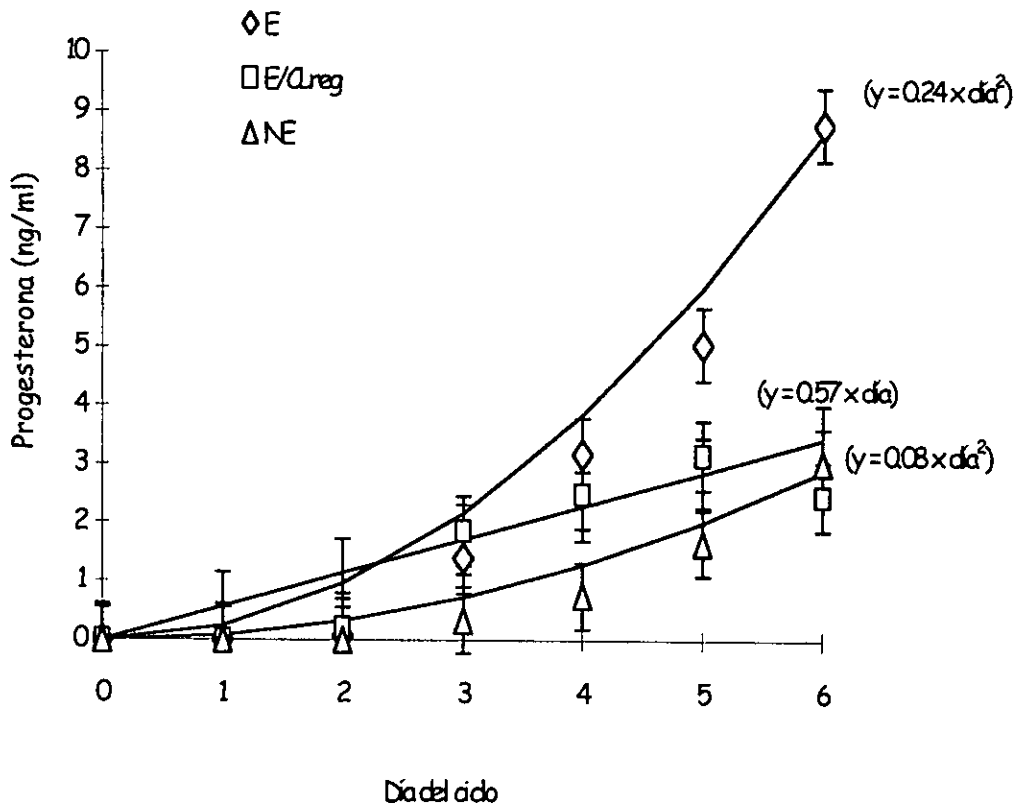

Fig.1: Concentración plasmática media de progesterona (ng/ml) en ovejas no estimuladas (NE; ≤2 CL), ovejas estimuladas (E; ≥3 CL) y ovejas estimuladas con cuerpos lúteos en regresión prematura (E/Clreg), del día 0 hasta el día 6 del ciclo estral. Las líneas representan a la regresión de mejor ajuste para la categoría, incluyendo a las ecuaciones correspondientes.

En cuanto a la existencia de una relación entre la concentración de progesterona en plasma y el número de cuerpos lúteos totales, cuerpos lúteos normales y cuerpos lúteos en regresión presentes en el día 6 postestro, pudo observarse una correlación positiva significativa (r:0.83; P=0.0001), entre los cuerpos lúteos normales y el nivel de progesterona. Además, se observó una correlación negativa entre la presencia de cuerpos lúteos en regresión y la concentración de progesterona (r:-0.64; P=0.002).

4.3 Recolección de embriones.

El lavado para la recolección de embriones pudo efectuarse en solamente 5 de un total de 14 borregas que tuvieron una respuesta de superovulación a los diferentes tratamientos. Esto se debió a que, de los 9 animales restantes, 3 presentaron cuerpos lúteos en regresión y los otros 6 sufrieron laparoscopías repetidas, lo que los excluyó como candidatos para someterse a dicho procedimiento (ver metodología).

De las ovejas en las que se llevó a cabo el lavado se obtuvo lo siguiente: 4 ovocitos, 16 mórulas calidad 1, 2 mórulas calidad 2, 3 blastocistos calidad 1 y 1 embrión de 2 células. Cabe aclarar que de las 24 estructuras recuperadas en total, 12 se obtuvieron de una sola borrega.

A pesar de la buena calidad de los embriones obtenidos (18 mórulas y 3 blastocistos), de los que un 87.5% eran transferibles, el bajo número de observaciones impidió la realización de comparaciones entre grupos.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la administración de eCG a dosis reducidas aumentó la tasa de ovulación en ovejas (cuerpos lúteos totales: 3.81±0.67) ($P<0.05$). Este incremento es sin embargo menor al que se logra con las dosis convencionales utilizadas en los tratamientos superovulatorios (Oyedipe *et al.*, 1989, con 1000UI de eCG, 7±1.2 cuerpos lúteos; Jabbour y Evans, 1991 y Rubianes *et al.*, 1996, con 1200UI, 9.8±0.9 cuerpos lúteos y 8.8±1.5 cuerpos lúteos respectivamente). Así mismo, se observó que el número de ovulaciones se aumenta al incrementarse la dosis (2.41±0.93 *vs* 5.21±0.98 para las dosis de 500UI y 750UI de eCG respectivamente). Lo anterior concuerda con los estudios hechos por Oyedipe *et al.*, (1989) y Samartzi *et al.*, (1995), quienes encontraron que con dosis bajas de eCG la tasa de ovulación se incrementó de 3.9±0.5 a 5.5±0.5 y de 3.9±0.05 a 5.9±1.0 cuando se aumentó la dosis de 500UI a 750UI respectivamente. Estos resultados en conjunto sugieren que la administración de dosis reducidas de eCG puede ser un método eficaz para incrementar la prolificidad en los rebaños, lo que ha sido sugerido anteriormente por otros autores como Boland *et al.*, (1981), McNatty *et al.*, (1982) y Robinson, (1988), quienes utilizaron dosis de 250UI a 750UI de eCG con la finalidad principal de lograr una mayor precisión en la sincronización de los estros. El uso de las dosis convencionales en los tratamientos superovulatorios (1000-1500UI de eCG), puede ocasionar una estimulación ovárica exagerada que modifica el medio ambiente endócrino (Armstrong y Evans, 1983; Foote y Ellington, 1988), alterando el patrón de desarrollo del folículo y ovocito (Moor *et al.*, 1985), lo que resulta contraproducente para la tasa de recuperación y calidad de los embriones (Nellenschulte y Niemann, 1992; Samartzi *et al.*, 1995). Aunque se observó que la utilización de dosis reducidas de eCG disminuye la incidencia de sobreestimulación ovárica y aumenta la tasa de ovulación, el objetivo de obtener un número suficiente y predecible de ovulaciones no

se cumple, por lo que no puede considerarse como una buena técnica para provocar superovulación en las borregas.

La aplicación de antisuero modificó el número de ovulaciones (reflejado en el número de cuerpos lúteos totales), cuando las borregas se agruparon sin considerar la dosis de *eCG*. También se observó un número mayor de cuerpos lúteos cuando los anticuerpos se aplicaron en el tratamiento 750+anti-*eCG*. Esto coincide con lo informado por Martemucci *et al.*, (1995), quienes proponen que el anti-*eCG* evita que se presenten fallas durante el proceso de maduración final de los folículos que pudieran interferir con la ovulación; pero difiere con lo descrito por Ungerfeld *et al.*, (1995) y Rubianes *et al.*, (1996), cuyos resultados indican que el aumento en el número de ovulaciones está directamente relacionado a la administración de la gonadotropina, y no se modifica con la adición de los anticuerpos. Cuando se compararon los tratamientos 500 y 500+anti*eCG*, no se observaron diferencias en el promedio de cuerpos lúteos totales, lo que podría sugerir que una acción eficiente del anticuerpo esta relacionada con la dosis de *eCG* administrada, supuesto señalado anteriormente por Wang *et al.*, en 1988. Sin embargo, cabe señalar que la acción del anticuerpo debe valorarse considerando la calidad de la respuesta ovárica (presencia de cuerpos lúteos en regresión y de folículos persistentes), en la que no pudieron observarse diferencias entre los tratamientos utilizados en este trabajo. Así, las diferencias encontradas en el número de ovulaciones al agrupar a las borregas de acuerdo a si recibieron o no al antisuero, sin considerar la dosis de *eCG* administrada y entre el tratamiento 750+anti-*eCG* y los demás grupos (500, 500+anti-*eCG* y 750), podrían deberse a sesgos resultantes del reducido número de animales utilizados y no a una acción directa del anticuerpo. Por otra parte, si se considera que la dosis de *eCG* utilizada fue baja, resulta probable que las concentraciones circulantes fueran mínimas para el momento en el que se administró al antisuero (3 a 4 días después de aplicar la *eCG*), por lo que un efecto favorable podría no ser evidente.

Los tratamientos superovulatorios se caracterizan por una gran variabilidad en la respuesta ovárica (Armstrong y Evans, 1983; Murphy, 1984; Boland *et al.*, 1991; Martemucci, 1995). Los resultados de este trabajo concuerdan con lo anterior, mostrándose un amplio rango en el número de ovulaciones en cada animal, el cual fluctuó entre 1 y 19, de acuerdo al número de cuerpos lúteos observados. Cuando se utilizó la dosis de 500UI de *eCG*, un 25% de las borregas no fueron estimuladas (<2 cuerpos lúteos), un 50% mostró un aumento en la tasa de ovulación (2-3 cuerpos lúteos) y solo un 25% logró una respuesta superovulatoria satisfactoria (≥4 cuerpos lúteos). Al administrar 750UI de *eCG*, solo el 9% de las ovejas no fueron estimuladas, el 46% presentó entre 2 y 3 ovulaciones, y se obtuvo una respuesta superovulatoria satisfactoria en el restante 45%. Estos resultados sugieren que se tienen que aplicar dosis mayores a 750UI de *eCG* para obtener una tasa de ovulación de ≥4 folículos, cuya repetibilidad y manifestación sean concordantes con los programas de superovulación y transferencia de embriones (Samartzi *et al.*, 1995, Mejía *et al.*, 1995). Cabe señalar que la adición de antisuero a los tratamientos de superovulación con *eCG* no redujo la variabilidad individual que se presenta en el número de ovulaciones, lo que coincide con lo especificado por González *et al.*, en 1994 y por Martemucci *et al.*, en 1995.

A diferencia de lo descrito por Schiewe *et al.*, (1990), Ungerfeld *et al.*, (1995) y Rubianes *et al.* (1996), y de acuerdo con lo informado por Cerbón *et al.*, (1995), Luyando *et al.*, (1995), y Espinosa, (1998), en este trabajo pudieron advertirse cuerpos lúteos normales y cuerpos lúteos de corta duración coexistentes en el mismo individuo. Diekman *et al.*, (1978), proponen que la regresión del cuerpo lúteo se inicia con una lisis funcional, que más tarde es seguida por la estructural. De este modo, resulta probable que los cuerpos lúteos que morfológicamente se consideraron como normales, hubieran iniciado ya su proceso de regresión, sin que esto pudiera advertirse macroscópicamente. Esto último podría reafirmarse por el marcado descenso en los

niveles plasmáticos de progesterona que se observó a partir del cuarto o quinto días del ciclo, tanto en las borregas que presentaron solamente cuerpos lúteos en regresión, como en las que mostraron cuerpos lúteos aparentemente normales, coincidentes con cuerpos lúteos en regresión en este estudio.

El porcentaje de cuerpos lúteos de corta duración encontrados en este trabajo (30%) es similar al especificado por Ryan *et al.*, 1987 quien utilizó 800UI de eCG (29%), y menor a lo descrito para dosis más altas de la gonadotropina (50% con 1200UI de eCG, Ungerfeld *et al.*, 1995 y Rubianes *et al.*, 1996). La causa de la regresión lútea temprana sigue siendo controvertida, pero se piensa que la presencia de folículos estrogénicos en animales sobreestimulados podría estar relacionada a ella (Ryan *et al.*, 1987; Beard y Hunter, 1994). Aparentemente, las concentraciones altas de estradiol estimulan la producción de receptores funcionales para oxitocina en el útero (Hixon y Flint, 1987; Hunter, 1991; Beard y Hunter,1994) y favorecen tanto la acumulación de precursores, como la actividad de algunas enzimas implicadas en la síntesis de $PGF_{2\alpha}$, contribuyendo así con la activación del mecanismo luteolítico (Beard y Hunter, 1994). Se ha demostrado además que la supresión de las concentraciones de estradiol mediante la utilización de líquido folicular equino (que inhibe el desarrollo folicular en borregas en anestro inducidas a ovular), retrasa la regresión del cuerpo lúteo (Balcázar, 1995; Hernández, 1996). La eliminación física de los folículos ováricos tiene también este efecto (Ginther, 1971; Thimonier, 1979; Zhang *et al.*, 1991). La correlación positiva que se encontró entre la presencia de folículos ≥5mm de diámetro en el día 6 del ciclo estral y los cuerpos lúteos que regresaron prematuramente (r:0.54; P=0.01), así como el hecho de que la luteólisis temprana se haya presentado solamente en las ovejas con ≥3 cuerpos lúteos, apoyan esta teoría. Sin embargo, la incidencia en la falla lútea no se alteró al administrar el anticuerpo, ni tampoco aumentó al incrementarse la dosis de eCG, lo que podría favorecer la hipótesis de que esta condición se genera en estadios preovulatorios de desarrollo. En este sentido,

Garverick *et al.*, (1992) y Wiltbank y Niswender (1992), mencionan que la fase lútea es una continuación de la maduración folicular y por tal motivo, las características funcionales del cuerpo lúteo son consecuencia de las condiciones en las que se desarrolló el folículo ovulatorio. Otros autores como Hunter, (1991) y Baird, (1992), indican que el medio ambiente endócrino al que esta expuesto el folículo antes de la ovulación tiene una influencia fundamental en la formación del cuerpo lúteo. De este modo y a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, podría pensarse que tanto la activación prematura del mecanismo luteolítico como un desarrollo folicular inadecuado contribuyen con la presentación de los cuerpos lúteos de corta duración.

La frecuencia de animales que presentaron folículos mayores a 5mm de diámetro en el día 6 del ciclo estral se incrementó con la dosis de eCG administrada (8% *vs* 40% para los tratamientos con 500 y 750UI de eCG respectivamente), lo que coincide con lo descrito por Martemucci *et al.*, (1995) y Samartzi *et al.*, (1995). Este resultado encaja con la teoría de que el número de folículos que crecen depende tanto de la cantidad de FSH como del tiempo de exposición a la misma (Picton *et al.*, 1990; O'Shea *et al.*, 1994). Cuando se realiza un programa de superovulación, no todos los folículos que son estimulados llegan a ovular, algunos sufren atresia y otros permanecen durante algún tiempo como folículos anovulatorios (Boland *et al.*, 1991; Ungerfeld *et al.*, 1995). En este estudio, las observaciones hechas por laparoscopía de manera repetida demostraron persistencia folicular en dos de las ovejas examinadas (del día 0 al día 4 postestro, mediante el marcaje con tinta china). Sin embargo, también se advirtió que dos animales cuyos ovarios carecían de folículos grandes en la observación realizada en el día 2 del ciclo estral, contenían folículos ≥5mm de diámetro en el día 4 postestro (cuadro 3). Esto último concuerda con los hallazgos recientes en relación al desarrollo folicular en las ovejas (Souza *et al.*, 1996), donde cada 5 a 10 días, surgen oleadas de crecimiento folicular que se presentan a lo largo del ciclo estral e incluso durante el anestro (Beard y Lamming, 1994; Noël *et al.*,

1994). Así, los folículos ≥5mm de diámetro observados por laparotomía en el día 6 postestro en este trabajo podrían ser de nueva formación, ya que el pico de crecimiento de la oleada folicular puede coincidir con dicha fecha.

Se piensa que el neutralizar la actividad biológica de la eCG en las etapas finales de la maduración folicular y/o después de la ovulación, mejora la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación, reduciendo la presencia de folículos persistentes en los ovarios (Jabbour y Evans, 1991), y probablemente la incidencia de cuerpos lúteos en regresión prematura (Rubianes *et al.*, 1996). Sin embargo, en este trabajo la administración de anti-eCG 12h después de la detección del estro no tuvo efecto sobre la presencia de folículos persistentes o de cuerpos lúteos de corta duración. Esto coincide con lo indicado por Wang *et al.*, (1988), quienes trabajando en bovinos, sugieren que la utilización de anti-eCG a dosis bajas de eCG resulta poco eficiente. Por otro lado, se sabe que el efecto benéfico del uso de los anticuerpos en la respuesta superovulatoria se da cuando estos se aplican después del pico de LH (Alfuraiji *et al.*, 1993; Rubianes *et al.*, 1996). Así, la frecuencia en la detección de celos y la definición del inicio del estro puede ser un factor decisivo en el resultado al utilizar anti-eCG (Dieleman *et al.*, 1993). De hecho, la administración del antisuero a tiempos fijos después del inicio del estro conductual puede ser insatisfactoria debido a la variabilidad en la presentación del pico de LH en relación a este evento (Alfuraiji *et al.*, 1993). En este trabajo los celos fueron detectados cada 6h durante el día (a las 8:00, 14:00 y 20:00h), existiendo periodos abiertos de entre 6 y 12h que pudieron haber contribuido a la baja respuesta obtenida con el uso del antisuero.

Las concentraciones diarias de progesterona no difirieron entre tratamientos (Gpo. 500, Gpo 500+anti-eCG, Gpo. 750 y Gpo 750+anti-eCG) ($P>0.05$). Sin embargo, cuando las ovejas fueron agrupadas de acuerdo a la respuesta superovulatoria (NE, E y E/Clreg), pudo observarse que en los animales estimulados, los niveles de progesterona se incrementaron más rápidamente que en las ovejas que no respondieron (Fig.1). Este

aumento podría ser consecuencia de una luteinización temprana debida al tratamiento superovulatorio, de la presentación de ovulaciones prematuras (Sharma *et al.*, 1993) o ser un reflejo del mayor número de cuerpos lúteos que se observaron en las ovejas en las que la tasa de ovulación se incrementó (Oyedipe *et al.*, 1989; Schiewe *et al.*, 1990; Kühholzer *et al.*, 1998). En relación a lo primero, Vos *et al.*, (1994) proponen que existen diferencias de desarrollo en la población de folículos susceptibles a ser estimulados por la eCG, ya que, cuando existe una gran heterogeneidad, la respuesta ovárica puede caracterizarse por asincronía en el proceso de crecimiento folicular (incluyendo el momento de adquisición de receptores para LH), y de luteinización (McNatty *et al.*, 1991; Rubianes *et al.*, 1996). Además, una actividad aumentada de LH de la eCG puede provocar luteinización de los folículos e inhibir la aromatización de andrógenos a estrógenos y por lo tanto la ovulación (Murphy *et al.*, 1984; Martinuk *et al.*, 1991). Aunque no existe evidencia que sugiera una inhibición de la ovulación ni de luteinización folicular en este estudio, cuando se consideran las características de las estructuras ováricas observadas, lo anterior podría relacionarse con una maduración temprana de los cuerpos lúteos. Por otro lado, al considerar la posibilidad de las ovulaciones prematuras, Robinson (1988), indicó que la liberación temprana de LH se asocia solo con una estimulación excesiva de la eCG, que causa un incremento en los folículos ovulatorios y un alza en los niveles de estrógenos. Además, la ausencia de cuerpos lúteos antes del día 2 del ciclo en los ovarios de las ovejas sometidas a laparoscopía discrepa con lo que se esperaría si se hubieran dado ovulaciones tempranas. Cabe señalar así mismo que las concentraciones de progesterona medidas en este estudio empezaron a diferir de cero hasta el tercer día después de iniciado el estro, lo que no sustenta ni la suposición de luteinización o maduración tempranas, ni la de ovulaciones prematuras. Por lo tanto, resulta probable que el incremento más temprano en los niveles de progesterona observados en las borregas cuya tasa de

ovulación se incrementó en este trabajo, haya sido debido a un mayor número de cuerpos lúteos presentes.

Tanto la incidencia como la distribución de los estros observados en este estudio concuerdan con lo descrito anteriormente por otros autores, sin que se hayan observado diferencias debidas a la dosis de eCG administrada (Smith, 1988; Oyedipe *et al.*, 1989; Samartzi *et al.*, 1995; Echegaray *et al.*, 1997).

En resumen, este trabajo demostró que: a) La tasa de ovulación en ovejas puede incrementarse utilizando dosis reducidas de eCG y que este aumento es proporcional a la dosis administrada. y b) Los folículos mayores a 5mm de diámetro observados en el día 6 del ciclo estral pueden ser tanto folículos persistentes como de nueva formación. Así mismo, se concluye que la aplicación de 500UI-750UI de eCG no constituye un método efectivo y repetible para provocar una respuesta superovulatoria satisfactoria que pudiera recomendarse para un programa de transferencia de embriones; y que bajo las condiciones que se siguieron en este estudio, no fue posible observar un beneficio en la calidad de la respuesta ovárica con el uso del anti-eCG. Además, se reafirma que la variabilidad individual sigue siendo un factor limitante importante en los programas de superovulación.

6. LITERATURA CITADA

Aggarwal, B.B., Walker Farmer, S., Papkoff, H. and Seidel, G.E. Jr.: Biochemical properties of Equine Chorionic Gonadotropin from two different pools of pregnant mare sera. *Biol. Reprod., 23*:570-576 (1980).

Akbar, A.M., Nett, T.M. and Niswender, G.D.: Metabolic clearance and secretion rates of gonadotropins at different stages of the estrous cycle in ewes. *Endocrinology, 94*:1318-1324 (1974).

Alfuraiji, M. M., Atkinson, T., Broadbent, P.J. and Hutchinson, J.S.M.: Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. *Anim. Reprod. Sci., 33*:99-109 (1993).

Armstrong, D. T.and Evans, G.: Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology, 19*:31-42 (1983).

Baird, D.T.: Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J. Reprod. Fertil., 69*:343-352 (1983).

Baird, D.T.: Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci., 28*:95-102 (1992).

Baird, D.T. and McNeilly, A.S.: Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J. Reprod. Fertil., Suppl.30*:119-133 (1981).

Balcazar Sánchez, J.A.: Efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo folicular, duración de la fase lútea y fertilidad de ovejas inducidas a ovular mediante la administración de hCG. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1995).

Beard, A.P. and Hunter, M.G.: Effects of bovine follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil., 100*:211-217 (1994).

Beard, A.P. and Lamming, G.E.: Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced $PGF_{2\alpha}$ release in ewes. *J. Reprod. Fertil., 100*:469-475 (1994).

Betteridge, K.J.: Embryo transfer, en King, G.J.: World Animal Science: Reproduction in Domesticated Animals. *Ed. Elsevier Science Publishers B.V.*, Holanda, 1993.

Bindon, B. M.and Piper, L. R. : Induction of ovulation in sheep and cattle by injection of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum. *Theriogenology, 8*:171 (1977).

Bindon, B.M. and Piper, L.R.: Physiological basis of the ovarian response to PMSG in sheep and cattle. Embryo transfer in cattle, sheep and goats. Memorias del Congreso de Canberra, Australia, Mayo 1981. *Australian Society for Reproductive Biology*, Australia, 1982.

Bindon, B.M., Piper, L.R., Cahill, L.P., Driancourt, M.A. and O'Shea, T.O.: Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology, 25*:53-70 (1986).

Boland, M.P., Crosby, T.F. and Gordon, I.: Effect of mating management and PMSG dose on lambing outcome in ewes bred in late anoestrus. *J. Agric. Sci., 97*: 445-447 (1981).

Boland, M.P., Goulding, D. and Roche, J.F.: Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology, 35*:5-17 (1991).

Bousfield, G.R., Liu W.K., Sugino, H. and Ward, D.N.: Structural studies on equine glycoprotein hormones. *J. Biol. Chem., 262*:8610-8620 (1987).

Cahill, L.P.: Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil., suppl. 30*:135-142 (1981).

Cahill, L.P., Mariana, J.C. and Mauleón, P.: Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fertil., 55*:27-36 (1979).

Cahill, L.P. and Mauléon, P.: A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J. Reprod. Fertil., 61*:201-206 (1981).

Cahill, L.P. and Mauleón, P.: Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fertil., 58*:321-328 (1980).

Cahill, L.P., Oldham, C.M., Cogmie, Y., Ravault, J.P. and Mauleón, P.: Season and photoperiod effects on follicles and atresia in the sheep ovary. *Aust. J. Biol. Sci., 37*:71-77 (1984).

Campbell, B. K., Scaramuzzi, R. J., Evans, G. and Downing, J. A. : Increased ovulation rate in androstenedione-immune ewes is not due to elevated plasma concentrations of FSH. *J. Reprod. Fertil., 91*:655-666 (1991).

Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J. and Webb, R. : Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil., supl. 49*:335-350 (1995).

Cerbón G., J., Valencia M., J., Balcázar S., A., Zarco Q., L., Luyando G., C., Saharrea M., A., Mejía V., O. Y Gutiérrez M., J.: Inseminación intauterina con semen congelado en

ovejas superovuladas. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación pecuaria. Universidad Nacional Autónoma de México. *Vet. Méx., 26*: Supl. 2. Noviembre, 1995.

Clegg, M.T., Boda, J.M. and Cole, H.H.: The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. *Endocrinology, 54*:448-463 (1954).

Christakos, S. and Bahl, O.P.: Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Purification and physicochemical, biological and immunological characterization. *J. Biol. Chem., 254*:4253-4261 (1979).

Christie, W.B., Newcomb, R. and Rowson, L.E.A.: Ovulation rate and egg recovery in cattle treated repeatedly with pregnant mare serum gonadotropin and prostaglandin. *Vet. Rec., 104*:281-283 (1979).

Cole, H.H. and Hart, G.H.: The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Amer. J. Physiol., 93*:57-68 (1930).

Cole, H.H., Pencharz, R.I. and Goss, H.: On the biological properties of highly purified gonadotropin from pregnant mare serum. *Endocrinology, 27*:548-553 (1940).

Córdova, L. A., Jiménez Krasel, F., y Hernández Ledezma, J.J.: Superovulación con hormona folículo estimulante (FSH) o gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y anticuerpos monoclonales contra PMSG en cabras fuera de la época reproductiva. *Vet. Méx., 23*:319-324 (1992).

Croy, B.A.: Immunoreproduction, en King, G.J.: World Animal Science: Reproduction in Domesticated Animals. *Ed.Elsevier Science Publishers B.V.*, Holanda, 1993.

Cummins, L.J., O'Shea, T., Al-obaidi, S.A.R., Bindon, B.M. and Findlay, J.K.: Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine folicular fluid containing inhibin activity. *J. Reprod. Fertil., 77*:365-372 (1986).

Cunningham, N.F., Saba, N., Boarer, C.H.D. and Hattersley, J.J.P.: Plasma hormone levels and reproductive behaviour in anoestrus ewes after treatment with progesterone and PMSG. *J. Reprod. Fertil., 60*:177-185 (1980).

Cupps, P.T.: Reproduction in Domestic Animals. 4a ed., *Ed. Academic Press Inc.*, San Diego, California, 1991.

D'Amour, F.E. and D'Amour, M.C.: A comparison of the international gonadotropin standars. *Endocrinology, 27*:68-70 (1940).

de Loos, F.A.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. and Kruip, Th.A.M.: Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology, 35*:537-546 (1991).

Diekman, M.A., O'Callaghan, P., Nett, T.M. and Niswender, G.D.: Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the number of LH receptors in ovine corpora lutea. *Biol. Reprod., 19*:1010-1013 (1978).

Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Vos, P.L.A.M., and de Loos, F.A.M.: PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment ? *Theriogenology, 39*:25-41 (1993).

Driancourt, M. A.: Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology, 35*:55-79 (1991).

Driancourt, M.A.: Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J. Reprod. Fertil. 80*:207-212 (1987).

Driancourt, M.A. and Cahill, L.P.: Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fertil., 71*:205-211 (1984).

Driancourt, M.A. and Fry, R.C.: Differentiation of ovulatory follicles in the sheep. *J. Anim. Sci. 66 Suppl., 2*:9-20 (1988).

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

Driancourt, M.A., Gauld, I.K., Terqui, M. and Webb, R.:Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil., 78*:565-575 (1986).

Driancourt, M.A., Gibson, W.R. and Cahill, L.P.: Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reprod. Nutr. Dévelop., 25*:1-15 (1985).

Dott, H. M., Hay, M. F., Cran, D. G. and Moor, R. M. : Effect of exogenous gonadotrophin (PMSG) on the antral follicle population in the sheep. *J. Reprod. Fertil., 56*:683-689 (1979).

Downing, J.A. and Scaramuzzi, R.J.: Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J. Reprod. Fertil., supl. 43*:209-227 (1991).

Echegaray T, J.L., Rangel S, R., Sánchez T.E, M.T. y Suárez O, M.E.: Efecto de dosis de PMSG en la respuesta ovárica de ovejas. Memorias del IX Congreso Nacional de Producción Ovina., 2 a 5 de junio, Qro., Qro. 1997. *Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinocultura, A.C.*. México, (1997).

Echternkamp, S.E., Bolt, D.J. and Hawk, H.W.:Ovarian and pituitary hormones in blood of progesterone treated ewes. *J. Anim. Sci., 42*:893-900 (1976).

Espinosa, F.: Administración de acetato de fluorogestona postmonta en ovejas superovuladas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1998).

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

Evans, G. and Robinson, T.J.: The control of fertility in sheep : endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and anoestrus. *J. Agric. Sci., 94*:69-88 (1980).

Foote, R.H. and Ellington, J.E.: Is a superovulated oocyte normal ? *Theriogenology, 29*:111-123 (1988).

Fortín, S., Sayre, L. and Lewis, G.S. : Does exogenous progestogen alter the relationships among PGF2α, 13,14-dihydro-15-keto-PGF2α, progesterone and estrogens in ovarian-intact ewes around the time of luteolysis?. *Prostaglandins, 47*:171-187 (1994).

Fortune, J.E.: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod., 50*:225-232 (1994).

Foxcroft, G.R.: Female Reproduction, en King, G.J.: World Animal Science: Reproduction in Domesticated Animals. *Ed.Elsevier Science Publishers B.V.*, Amsterdam, 1993.

García, E.: Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4a *Ed., SIGSA*, México, D.F. 1988.

Garverick, H.A., Zollers, W.G., Jr. and Smith, M.F.: Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim. Reprod. Sci., 28*:111-124 (1992).

Geschwind, I.I. and Dewey, R.: Dynamics of Luteinizing Hormone (LH) secretion in the cycling ewe: A radioimmunoassay study. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129*:451-455 (1968).

Gherardi, P.B. and Lindsay, D.R.: The effect of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. *J. Reprod. Fertil., 60*:425-429 (1980).

Ginther, O.J.: Response of corpora lutea to cauterization of follicles in sheep. *Am. J. Vet. Res., 32*:59-62 (1971).

Ginther, O.J., Kot, K., and Wiltbank, M.C.: Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology, 43*:689-703 (1995).

González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J.: Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology, 41*:1631-1642 (1994).

González-Menció, F., Manns, J. and Murphy, B.D.: FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod. Sci., 1*:137-144 (1978).

Goodman, R.L., Pickover, S.M. and Karsch, F.J.: Ovarian feedback control of follicle-stimulating hormone in the ewe: evidence for selective supression. *Endocrinology,108*:772-777 (1981).

Grasso, F., Guibault, L.A., Roy, GL., Matton, P. and Lussier, J.G.: The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. *Theriogenology, 31*:199 (1989).

Greenwald, G.S. and Terranova, R.F.: Follicular selection and its control, in Knobil, E.: The Physiology of Reproduction, *Raven Press, L.T.D.*, Nueva York, 1988.

Hawk, H.W., Cooper, B.S. and Pursel, V.G.: Increased sperm death in the cervix and uterus of oestrus ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J. Anim. Sci., 52*:601-607 (1981).

Hay, M.F. and Moor, R.M.: Functional and structural relationships in the graafian follicle population of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil., 45*:583-593 (1975).

Hernández, J.: Control de la longitud de la fase lútea en ovejas mediante la administración de líquido folicular equino libre de esteroides. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad nacional Autónoma de México. México, D.F. (1996).

Herrler, A., Farries, E. and Niemann, H.: A trial to stimulate insuline like growth factor 1 levels to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology, 33*:248 (1990).

Hixon, J.E. and Flint, A.P.F.: Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F2α secretion in sheep. *J. Reprod.Fertil., 79*:457-467 (1987).

Hunter, M.G.: Characteristics and causes of inadequate corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.,Suppl.43*:91-99 (1991).

Hunter, R.H.F.: Fisiología y Tecnología de la Reproducción de la Hembra de los Animales Domésticos. *Ed. Acribia*, Zaragoza, 1984.

Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T. and Schmidt, M.: Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology, 35*:91-108 (1991).

Inskeep, E.K.: Potential uses of prostaglandins in the control of reproductive cycles of domestic animals. *J. Anim. Sci., 36*:1149-1157 (1973).

Jabbour, H.N. and Evans, G.: Ovarian and endocrine responses of merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim Reprod Sci, 24*:259-270 (1991).

Jabbour, H.N., Evans, G. and Moore, N.W. : Steroidogenic and ovulatory response of Merino ewes to PMSG and porcine FSH. Proceedings of the 15th Annual Conference, Brisbane, Australia, Ago.31 a Sep.3. *Australian Society for Reproductive Biology*, Australia, 1986.

Jainudeen, E.R., Hafez, E.S.E., Gollnick, P.D. and Moustafa, A.: Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. *Amer. J. Vet. Res., 27*:669-675 (1966).

Kesner, J.S., Convey, E.M. and Anderson, C.R.: Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology, 108*:1386-1391 (1981).

Killeen, I.D.: Embryo transfer procedures in the sheep ; the factors which have a major influence on success rate. Embryo transfer in cattle, sheep and goats. Memorias del Congreso de Canberra, Australia, Mayo 1981. *Australian Society for Reproductive Biology*, Australia, 1982.

Kühholzer, B., Schmoll, F., Besenfelder, U., Möstl, E., Krüger, E., Brem, G. and Schellander, K.: Ultrasonographic examination of ovarian structure dynamics in superovulated ewes. *Reprod. Dom Anim., 33*:343-346 (1998).

Land, R.B.: Ovulation rate of finn-dorset sheep following unilateral ovariectomy or chlopromazine treatment at different stages of the oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil., 33*:99-105 (1973).

Land, R.B.: Reproduction in young sheep:some genetic and environmental sources of variation. *J Reprod. Fertil., 52*:427-436 (1978).

Land, R.B., Crighton, D.B. and Lamming, G.E.: Gonadotrophin content of the pituitaries of sheep of differing fertility at three stages of the estrous cycle. *J. Reprod. Fertil., 30*:313-316 (1972).

Land, R.B., Morris, B.A., Baxter, G., Fordyce, M. and Forster, J.: Improvement of sheep fecundity by treatment with antisera to gonadal steroids. *J. Reprod. Fertil., 66*:625-634 (1982).

Linder, G.M. and Raymond, W.W.: Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology, 20*:407-416 (1983).

Lintern-Moore, S.: Initiation of follicular growth in the infant mouse ovary by exogenous gonadotropin. *Biol. Reprod., 17*:635-639 (1977).

Luyando G., C., Mejía V., O, Balcázar S., A., Valencia M., J., Zarco Q., L., Caballero G., V. y Brito F., I.: Respuesta ovárica y recuperación de embriones ovinos utilizando dos dosis de FSH-p. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Universidad Nacional Autónoma de México. *Vet. Méx., 26*: Supl. 2. Noviembre, 1995.

Martemucci, G., D'Alessandro, A., Toteda, F., Facciolongo, A. M. and Gambacorta, M.: Embryo production and endocrine response in ewes superovulated with PMSG, with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. *Theriogenology, 44*:691-703 (1995).

Martinuk, S.D., Manning, A.W., Black W.D. and Murphy, B.D.: Effect of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biol. Reprod., 45*:598-604 (1991).

Matteri, R.L. and Papkoff, H.: Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. *Biol. Reprod., 34*: 571-578 (1986).

McDonald, L.E.: Endocrinología Veterinaria y Reproducción. *Ed. Interamericana*, España, 1989.

McIntosh, J.E.A., Moor, R.M. and Allen, W.R.: Pregnant mare serum gonadotrophin:rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Reprod. Fertil., 44*:95-100 (1975).

McLeod, B.J. and Haresign, W.: Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *J. Reprod. Fertil., 71*:381-386 (1984).

McMillan, W.H., Hall, D.R.H. and Evans, P.H.: Are follicle numbers a source of variation in superovulation rate in sheep?. Proceedings of the 23rd Annual Conference, University of Sydney, Australia, Sep.30 a Oct.2, 1991. *Australian Society for Reproductive Biology*, Australia, 1991.

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

McNatty, K.P., Hudson, N.L., Henderson, K.M., Lun, S., Heath, D.A., Gibb, M., Ball, K., McDiarmid, J.M. and Thurley, D.C.: Changes in gonadotrophin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J. Reprod. Fertil., 70*:309-321 (1984).

McNatty, K.P., Hudson, N.L., Shaw, L., Heath, D.A. and Lun, S.: Effect of chronic follicle stimulating hormone (FSH) administration on ovarian follicular development, ovulation rate and corpora lutea formation in sheep. Australian Society for Reproductive Biology, Proceedings of the 23rd Annual Conference, University of Sydney, Australia, Sept 30- Oct.2, 1991.

McNeilly, A.S., Fraser, H.M. and Baird, D.T.: Effect of immunoneutralization of LH releasing hormone on LH, FSH and ovarian steroid secretion in the preovulatory phase of the oestrus cycle in the ewe. *J. Endocr., 101*:213-219 (1984).

McNeilly, A.S., Picton, H.M., Campbell, B.K. and Baird, D.T.: Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fertil., 43*:177-186 (1991).

Meinecke-Tillman, S., Evers, P. and Meincke, B.: Relationships between PMSG-plasma concentrations and ovarian response after superovulatory treatment in Merino ewes. *Theriogenoly, 27*:259 (1987).

Mejía V., O., Balcázar S., A., Luyando G., C., Valencia M., J., Rojas M., S., Saharrea M., A., Caballero G., V. y Cerbón G., J.: Implementación de la transferencia de embriones en pequeños rumiantes. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación pecuaria. Universidad Nacional Autónoma de México. *Vet. Méx., 26*: Supl. 2. Noviembre, 1995.

Merk, F.B., Botticelli, C.R. and Albright, J.T.: An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary ; an electron microscope study. *Endocrinol., 90*:992-1007 (1972).

Miller, B.G. and Armstrong, D.T.: Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. *Biol. Reprod.,25*:261-271 (1981).

Monniaux, D., Chupin, D. and Saumande, J.: Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology, 19*:55-81 (1983).

Monniaux, D., Mariana, J.C. and Gibson, W.R.: Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J. Reprod. Fertil., 70*:243-253 (1984).

Moor, R.M., Kruip, Th.A.M. and Green, D.: Intraovarian control of folliculogenesis : limits to superovulation? *Theriogenology, 21*:103-116 (1984).

Moor, R.M., Osborn, J.C. and Crosby, I.M.: Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil., 74*:167-172 (1985).

Moore, N.W.: Embryo transfer in sheep: teatment and preparation of donors. Embryo transfer in cattle, sheep and goats. Memorias del Congreso de Canberra, Australia, Mayo 1981. *Australian Society for Reproductive Biology*, Australia, 1982.

Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Hickman, J. and Ashwell, G.: The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem., 246*:1461-1467 (1971).

Murdoch, W.J.: Follicular determinants of ovulation in the ewe. *Dom. Anim. Endocrinol., 2*:105-121 (1985).

Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J. and Humphrey, W.D.: Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology, 21*:117-125 (1984).

Nakajima, A., Hiraizumi, S., Onodera, K., Suzuki, H., Kudo, Y. and Domeki, Y.: The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation. *J. Vet. Med. Sci., 54*:95-98 (1992).

Nell, T. and Gielen, J.: The development of a monoclonal antibody against PMSG for veterinary application. *Livest. Prod. Sci., 42*:223-228 (1995).

Nellenschulte, E. and Niemann, H.: Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Anim. Reprod. Sci., 27*:293-304 (1992).

Noël, B., Bister, J.L., Pierquin, B. and Paquay, R.: Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology, 41*:719-727 (1994).

Oldham, C.M., Knight, T.W. and Lindsay, D.R.: A comparison of the effects on reproductive performance in sheep, of two methods of estimation of ovulation rate. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 16*:24-27 (1976).

Oldham, C.M. and Lindsay, D.R.: Laparoscopy in the ewe : a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrus cycles. *Anim. Reprod. Sci., 3*:119-124 (1980).

O'Shea, T., Hillard, M.A., Anderson, S.T., Bindon, B.M., Findlay, J.K., Tsonis, C.G. and Wilkins, J.F.: Inhibin immunization for increasing ovulation rate and superovulation. *Theriogenology, 41*:3-17 (1994).

Oyedipe, E.O., Pathiraja, N., Gyang, E.O. and Edqvist, L.E.: Effect of dose of pregnant mare serum gonadotrophin on estrus parameters, ovulation rate and peripheral progesterone concentrations in Yankasa ewes. *Anim. Prod. Sci., 20*:255-264 (1989).

Papkoff, H., Bewley, T.A. and Ramachandran, J.: Physicochemical and biological characterizations of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits. *Biochem. Biophys. Acta, 532*:185-194 (1978).

Pérez, E., Pedroso, R., Felipe, N., Baumande, J. y De Armas, R.: Producción de inmunosuero anti-PMSG en ganado bovino. *Rev. Cub. Reprod. Anim., 14*:51-60 (1988).

Picton, H.M., Tsonis, C.G. and McNeilly, A.S.: FSH causes a time-dependant stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocr., 126*:297-307 (1990).

Pierce, J.G. and Parsons, T.F.: Glycoprotein hormones : structure and function. *Ann. Rev. Biochem. 50*:465-495 (1981).

Richards, J.S. and Midgley, A.R. Jr.: Protein hormone action : A key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol. Reprod., 14*:82-94 (1976).

Robinson, T.J.: Controlled sheep breeding: Update 1980-1985. *Aust. J. Biol. Sci., 41*:1-13 (1988).

Rubianes, E., Ungerfeld, R. and Ibarra, D.: Serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. *Small Rum. Res., 21*:105-111 (1996).

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

Ryan, J.P., Maxwell, W.M.C. and Hunton, J.R.: Factors affecting the incidence of prematurely regressing corpora lutea in superovulated ewes. Proceedings of the 19th Annual Conference, Sydney, Australia, Ago. 24 a 26, 1987. *Australian Society for Reproductive Biology,* Australia, 1987.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Samartzi, F., Boscos, C., Vainas, E., Tsakalof, P.: Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during sping and autumn. *Anim. Reprod. Sci., 39*:215-222 (1995).

Saumande, J. And Chupin, D.: The effect of monensin on ovarian response of cyclic heifers to a superovulatory treatment. *Theriogenology, 25*:193 (1986).

Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, G.M., McNatty, K.P., McNeilly, A.S. and Tsonis, C. G.: A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fert. Dev., 5*:459-478 (1993).

Scaramuzzi, R.J. and Hoskinson, R.M.: Active immunization against steroid hormones for increasing fecundity, en Crighton, D.B.: Immunological Aspects of Reproduction in Mammals. *Ed. Butterworths*, Inglaterra, 1984.

Schiewe, M.C., Fitz, T.A., Brown, J.L., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F2α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J. Reprod. Fertil., 93*:19-30 (1991).

Schiewe, M.C., Howard, J.G., Goodrowe, K.L., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin $F_{2\alpha}$ synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology, 34*:469-486 (1990).

Sharma, V.K., Gupta, R.C., Khar, S.K. and Khurana, N.K.: Plasma progesterone profiles, ovarian response and embryo recovery in crossbred ewes superovulated during breeding and non-breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci., 34*:119-126 (1993).

Smith, C.L.: Superovulation in sheep. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 12*:1415-1423 (1988).

Souza, C.J.H, Campbell, B.K. and Baird, D.T.: Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J. Reprod. Fertil., 108*:101-106 (1996).

Srikandakumar, A., Ingraham, R.H., Ellsworth, M., Archbald, L.F., Liao, A. and Godke, R.A.: Comparison of a solid-phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. *Theriogenology, 26*:779-793 (1986).

Sugino, H., Bousfield, G.R., Moore, W.T. and Ward, D.N.: Structural studies on equine glycoprotein hormones. *J. Biol. Chem., 262*:8603-8605 (1987).

Thimonier, J.: Hormonal control of oestrus cycle in the ewe (A review). *Livestock Prod. Sci., 6*:39-50 (1979).

Thompson, D.L., Jr., Reville, S.I. and Derrick, D.J.: Short-term mode of secretion of eCG and effect on GnRH. *Theriogenology, 18*:583-591 (1982).

Tsonis, C.G., Cahill, L.P., Carson, R.S. and Findlay, J.K.: Identification at the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fertil., 70*:609-614 (1984).

Turnbull, K.E., Braden, A.W.H. and Mattner, P.E.: The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci., 30*:229-241 (1977).

Ungerfeld, R: Gonadotrofina Coriónica Equina : Caracterización y utilización. Center for Reproductive Biology, *Swedish University of Agricultural Sciences*, Uppsala, Suecia, 1998.

Ungerfeld, R., Ibarra, D. and Rubianes, E.: Use of eCG antiserum improves the ovarian response of ewes with eCG. *Theriogenology, 43*:342 (1995).

Vos, P.L.A.M., van der Schans, A., de Wit, A.A.C., Bevers, M.M., Willemse, A.H. and Dieleman, S.J.: Effects of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. *J. Reprod. Fertil., 100*:387-393 (1994).

Walker-Farmer, S. and Papkoff, H.: Immunochemical studies with pregnant mare serum gonadotropin. *Biol. Reprod., 21*:425-431 (1979).

Walton, E.A. and Armstrong, D.T.: Ovarian function and early embryo development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG, later neutralized by antiserum. *Biol. Reprod., 25*:272-280 (1981).

Wang, H., Wu, M., Patt, D., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J.: Superovulation in beef heifers with PMSG: effect of dose and monoclonal antibodies to PMSG. *Theriogenology, 29*:323 (Abstr.), 1988.

Webb, R. and England, B.G.: Identification of the ovulatory follicle in the ewe: associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology, 110*:873-881 (1982).

Whyman, D. and Moore, R.W.: Effects of PMSG and the prostaglandin F2α analogue, cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J. Reprod. Fertil., 60*:267-272 (1980).

Wilson, P.A., Cox, R.I., Wong, M.S.F. and Paull, D.R.: Comparison of multiple steroid vaccines to improve the fecundity and reproductive rate of Merino ewes.Proceedings

of the 23rd. Annual Conference, Sydney, Australia, Sep.30 a Oct.2, 1991. *Australian Society for Reproductive Biology,* Australia, 1991.

Wiltbank, M.C. and Niswender, G.D.: Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci., 28*:103-119 (1992).

Wintenberger-Torres, S. et Sevellec, C.: Atlas du developpement embryonnaire precoce chez les ovins. *Institut National de la Recherche Agronomique.* Paris, Francia, 1992.

Zeitoun, M.M., Yassen, A.M., Hassan, A.A., Fathelbab, A.Z., Echternkamp, S.E., Wise, T.H. and Maurer, R.R.: Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology, 35*:653-667 (1991).

Zhang, J., Weston, P.G. and Hixon, J.E.: Influence on the secretion of oxytocin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ during luteolysis in the ewe. *Biol. Reprod., 45*:395-403 (1991).