

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

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

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON UNA SOLUCIÓN  
GLUCOGÉNICA ORAL SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN EN  
OVEJAS PELIBUEY**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

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

**VICTOR MANUEL MARTÍNEZ TORRES**

**T U T O R :**

**CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR**

**COMITÉ TUTORAL:**

**JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ  
OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA**

**MÉXICO D.F.**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## RESUMEN

**MARTÍNEZ TORRES VICTOR MANUEL. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UNA SOLUCIÓN GLUCOGÉNICA ORAL SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN EN OVEJAS PELIBUEY (Tutor: Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar).** Con el objetivo de determinar el efecto de una solución glucogénica oral (glicerol:agua, 90%) sobre la tasa ovulatoria (TO) en ovejas Pelibuey realizamos 5 experimentos. En los experimentos 1 y 2 se evaluó el efecto de 300 ml de glicerol en la TO en ovejas sincronizadas con PGF2 $\alpha$  (exp1) o progestágenos (exp 2). En ambos casos, se encontró que el glicerol aumentó la TO de  $1.6 \pm 0.06$  a  $2.08 \pm 0.06$  ( $P < 0.0001$ ) y de  $1.64 \pm 0.7$  a  $2.41 \pm 0.09$  ( $P < 0.05$ ) para los exp 1 y 2 respectivamente. En el tercer estudio se evaluó el efecto del glicerol en la dinámica y selección folicular. El desarrollo folicular se observó diariamente por medio de ultrasonografía de los ovarios. No hubo diferencia entre grupos para el número de folículos chicos ( $P > 0.8644$ ) ni grandes ( $P > 0.5189$ ) a lo largo del ciclo. Tampoco se observaron diferencias en el diámetro de los tres folículos más grandes ( $P > 0.10$ ). En el cuarto estudio se determinó el efecto de una toma de glicerol en las concentraciones sanguíneas de glicerol y glucosa a corto plazo. Se tomaron muestras a los minutos -30, 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 y 600 (0= administración glicerol). El tratamiento con glicerol aumentó su concentración sanguínea inmediatamente después del tratamiento ( $P > 0.0001$ ) y alcanzó su concentración máxima al minuto 240; mientras que en el grupo testigo no mostró alteración. La glucosa sanguínea no cambió en el grupo testigo pero aumentó en el grupo tratado inmediatamente después del tratamiento ( $P > 0.0001$ ) para alcanzar su máximo en el minuto 120. En el quinto estudio se determinó la dosis mínima efectiva de glicerol para incrementar la TO. Se aplicaron dosis de glicerol de 50, 100, 200 y 300 ml en el momento de administrar la PGF2 $\alpha$ . La TO previa fue  $1.68 \pm 0.05$  y el tratamiento aumentó ( $P < 0.05$ ) la TO a  $2 \pm 0.08$ ,  $2.3 \pm 0.15$ ,  $2.21 \pm 0.15$  y  $2.03 \pm 0.12$  para los grupos de 50, 100, 200 y 300 ml respectivamente. Con base en los resultados se concluye que la administración de una dosis única de una solución glucogénica oral al momento de la luteólisis, es efectiva para incrementar la TO en ovejas.

Palabras clave: flushing, glicerol, tasa de ovulación, glucosa, ovejas.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Martínez Torres  
Victor Manuel

FECHA: 8/10/04

FIRMA: [Firma]

## SUMMARY

**MARTÍNEZ TORRES VICTOR MANUEL. THE EFFECT OF A GLUCOGENIC TREATMENT ON THE OVULATION RATE OF PELIBUEY EWES. (Supervisor: PhD. Carlos G. Gutiérrez Aguilar).** The objective of these studies were to determine the effect of a glycogenic solution treatment on the ovulation rate (OR) of Pelibuey ewes. On experiments 1 and 2 the effect of 300 ml de glycerol (glycerol:water, 90%) on the OR of ewes synchronized with either PGF2 $\alpha$  (exp1) or progestins (exp 2) was tested. In both studies, glycerol treatment increased the OR from  $1.6 \pm 0.06$  to  $2.08 \pm 0.06$  ( $P < 0.0001$ ) and from  $1.64 \pm 0.7$  to  $2.41 \pm 0.09$  ( $P < 0.05$ ) for exp 1 and 2 respectively. The third study evaluated the effect of the glycerol treatment on follicular dynamics and selection. Treatment with the glycogenic solution did not affect ( $P > 0.05$ ) the number of small or large follicles present in the ovaries, nor did it affect ( $P > 0.05$ ) the diameter of the three largest follicles. Further, the effect of glycerol treatment on plasmatic concentrations of glycerol and glucose were determined. Samples were collected 30 min before treatment (-30) and at 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 and 600 min after treatment. Both glycerol and glucose plasmatic concentrations increased ( $P > 0.0001$ ) after treatment. Glycerol concentrations reached a peak at 240 min after treatment, whilst glucose concentrations peaked at 120 min. No changes were observed in the control group. Finally, in the fifth study the minimum quantity of glycogenic solution needed to increase the ovulation rate was determined. Ewes were treated with 50, 100, 200 and 300 ml at the time of PGF2 $\alpha$  injection. Ovulation rate before treatment was  $1.68 \pm 0.05$ , glycerol treatment increased the number of corpora lutea ( $P < 0.05$ ) to  $2 \pm 0.08$ ,  $2.3 \pm 0.15$ ,  $2.21 \pm 0.15$  and  $2.03 \pm 0.12$  for the 50, 100, 200 and 300 ml groups, respectively. It is concluded that a single glycerol treatment at the time of luteólisis can effectively increase the ovulation rate in ewes.

Key words: flushing, glycerol, ovulation rate, glucose, ewes.

## **DEDICATORIA**

A Dios

¡Tuyo es el Reino, tuyo el poder y la gloria por siempre Señor!

## AGRADECIMIENTOS

A Edmée, por su paciencia, apoyo, impulso y compañía durante mis estudios y por llenar mi vida con tu amor.

A mi Mamá, Ma. del Refugio Torres, por ser mi refugio, por tus consejos, por tu amor.

A mi Papá, Manuel Martínez, por tu esfuerzo, por el apoyo y el respaldo sin límites que me has brindado siempre.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, por tu confianza, amistad, apoyo y consejos, por ser un asesor siempre dispuesto a trabajar y a hacer las cosas mejor.

A mi comité tutorial, Dr. Jaime Gallegos y Dr. Octavio Mejía. Por la gran disposición que siempre mostraron por colaborar con este trabajo, por procurar hacer siempre aportaciones positivas.

A los integrantes de mi comité ampliado: Dr. Everardo González Padilla y Dr. Alejandro Villa Godoy, por dedicar parte de su tiempo a enriquecer esta tesis.

A Arantza, Lucy, Nicolás, Esperanza, César, Adriana, Bárbara, Ramón y a todos los compañeros y alumnos del Departamento de Reproducción que colaboraron conmigo durante la fase experimental de esta tesis.

Especialmente a Rocío Juárez, alumna de servicio social del CEIEGT quién dedicó su trabajo día a día a la primera fase experimental de este trabajo.

A Gerardo, Clara y Susana por su valiosa colaboración a este trabajo en las mediciones de laboratorio

Al Dr. Jorge Armando Álvarez y Dr. Hugo Pérez por su apoyo y colaboración durante mi trabajo en el CEIEGT.

A todos los alumnos del CEIEGT que en algún momento me dieron la oportunidad de contar con su ayuda.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, donde me he formado como profesionista y como ser humano, institución de la que estoy orgulloso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

## **DECLARACIÓN**

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

Victor Manuel Martínez Torres, MVZ.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
RESUMEN	
SUMMARY	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. OBJETIVO.....	4
5. HIPOTESIS.....	4
6. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Características generales de la reproducción en la oveja.....	5
Desarrollo folicular.....	6
Oleadas foliculares.....	11
Relación entre oleadas foliculares y perfiles hormonales.....	16
Eventos durante el desarrollo folicular en oleadas.....	19
Reclutamiento.....	20
Selección.....	22
Dominancia.....	24
Atresia.....	31
Factores extra e intraovarios involucrados en el desarrollo folicular y su regulación.....	32
El factor de crecimiento parecido a la insulina y sus proteínas ligadoras.....	32
Hormona del crecimiento.....	34
Factores de crecimiento involucrados en la regulación intraovárica del crecimiento folicular.....	36
Egf, tgf- $\alpha$ y $\beta$ .....	37
Sistema activina-inhibina.....	38
Regulación endócrina de la esteroidogénesis folicular.....	41
Nutrición y reproducción.....	42
Efecto de la nutrición sobre la función hipotálamo-hipófisis.....	43
Efecto de la nutrición sobre la función ovárica.....	45
Papel de la hormona del crecimiento, insulina e IGF como mediadores de los efectos nutricionales sobre la reproducción.....	47
Nutrición y tasa de ovulación.....	51
Metodos para incrementar la tasa de ovulación.....	53
Administración de gonadotropinas.....	53
Inmunización contra hormonas esteroideas.....	54
Inmunización contra inhibina.....	56
Efecto macho.....	57
Sobrealimentación previa al apareamiento o flushing.....	60
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la tasa de ovulación en ovejas pelibuey.....	68
Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la tasa de ovulación en ovejas pelibuey sincronizadas con progestágeno.....	68
Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la dinámica folicular en ovejas pelibuey.....	70
Efecto de la solución glucogénica oral sobre la concentración plasmática de glucosa y glicerol.....	71
Determinación de la dosis efectiva de glicerol.....	73

8. RESULTADOS.....	74
Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la tasa de ovulación en ovejas pelibuey.....	74
Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la tasa de ovulación en ovejas pelibuey sincronizadas con progestágeno.....	75
Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la dinámica folicular en ovejas pelibuey.....	78
Efecto de la solución glucogénica oral sobre la concentración plasmática de glucosa y glicerol.....	81
Determinación de la dosis efectiva de glicerol.....	83
9. DISCUSIÓN.....	85
10. CONCLUSIONES.....	94
11. LITERATURA CITADA.....	95
12. ANEXO I.....	104

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los parámetros más importantes en los centros de producción ovina es el número de corderos nacidos por hembra en cada época reproductiva. Este parámetro es conocido como prolificidad. La prolificidad es directamente afectada por la tasa de ovulación. A lo largo del tiempo, se ha buscado aumentar la tasa de ovulación por medio de tratamientos hormonales (principalmente eCG), selección genética y por medio de incrementos en los aportes nutricionales del alimento previo al empadre en una práctica conocida como flushing y que está ampliamente difundida entre los productores <sup>1, 2, 3, 4</sup>.

Se sabe que existen influencias del estado nutricional, el peso corporal y los cambios en la condición corporal en la tasa de ovulación. Dichos estados fisiológicos, por sí mismos, no tienen influencia sobre la tasa de ovulación o los eventos reproductivos, pero sus efectos en la reproducción son consecuencia de las influencias nutricionales históricas durante la vida del animal. El efecto de la nutrición en los procesos reproductivos debe considerarse en términos del estatus nutricional neto de la oveja, un término que conjunta tanto las fuentes endógenas como las exógenas de los nutrientes disponibles para la hembra. De este modo, los cambios en la reproducción asociados con influencias nutricionales pueden relacionarse con cambios metabólicos mayores. Dichos cambios son consecuencia del decremento o incremento del consumo alimenticio y el uso o almacenamiento de los nutrientes en reservas corporales <sup>5, 6</sup>.

El flushing consiste en incrementar el consumo alimenticio unas semanas previo al empadre. Actualmente se sabe que este manejo aumenta el reclutamiento folicular en novillas y está asociado con un incremento en la insulina circulante. En estudios en los que se ha administrado glucosa endovenosa, se observó un incremento en la tasa de ovulación, sin encontrar aumento en la secreción de hormona luteinizante (LH), pero si de hormona foliculo estimulante (FSH) durante la mitad de la fase folicular, acompañado de un aumento en la concentración de insulina <sup>7</sup>. O'Callaghan et al. (2000) <sup>8</sup>, encontraron

que al administrar a ovejas raciones alimenticias con el doble de aporte de las necesidades de mantenimiento, se aumentó el número de folículos mayores de 3 mm y la tasa ovulatoria. Por el contrario, la baja nutrición disminuye el número y diámetro de folículos disponibles al momento de la ovulación <sup>9</sup>. Aparentemente, la influencia de la insulina en la tasa de ovulación se realiza por medio de los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF's) y sus proteínas ligadoras (IGFBP's), aunque los efectos de dichos factores parecen ser intrafoliculares, lo cual hace difícil su medición en la circulación general de animales bajo programas de estimulación nutricional.

Recientemente se ha encontrado que nutrimentos de glúcidos solubles son capaces de aumentar la secreción de insulina e IGF-I y aumentar el reclutamiento folicular. El objetivo de este estudio fue el usar una fuente glucogénica altamente soluble para aumentar el reclutamiento folicular y la tasa de ovulación en ovejas.

## 2. ANTECEDENTES

El flushing consiste en dar a las hembras una alimentación incrementada por algunas semanas antes de la monta, de manera que se encuentren ganando peso en el momento del estro y de esta forma incrementar la prolificidad. Existe una amplia variación en los resultados del flushing. Esto puede deberse a diferencias en la condición corporal de las hembras; ya que, ovejas en buena condición corporal tienen tasas de ovulación altas cercanas a su límite genético. Se ha postulado que por cada kg de incremento en el peso corporal habrá un aumento de 2 a 2.5 % en la tasa ovulatoria y que el cambio de condición corporal de 1.5 a 2 incrementa la tasa ovulatoria, pero no existen diferencias entre animales que pasan de condición corporal 2 a 2.5<sup>5, 6</sup>. La duración del flushing es un factor de estudio importante pues se han obtenido buenos resultados al realizarlo por periodos cortos (6 días) y largos (30 días). Al acortar los tratamientos, se han obtenido buenos resultados con tratamientos de 17 días, pero algunos autores informan que la sobrealimentación por 17 y 18 días es insuficiente<sup>5, 10</sup>. Gutiérrez et al. (2000)<sup>14</sup> encontraron que la administración oral de glicerol por seis días aumenta la tasa ovulatoria, acompañado de un aumento en la glucosa sanguínea.

Se sabe que el incremento en la tasa ovulatoria no se debe a un aumento de gonadotropinas durante el flushing. La concentración de glucosa e insulina aumenta durante el estímulo nutricional y pueden incrementar el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria, al administrarlas por infusión endovenosa periférica, aunque la infusión de glucosa e insulina al ovario no aumenta la tasa de ovulación. Estos últimos trabajos hacen pensar que la efectividad del flushing no depende únicamente de la ganancia de peso, o de los cambios en la condición corporal en los días cercanos a la ovulación. Es más aceptado que los efectos nutricionales son mediados de forma importante por la

glucosa a través de la insulina así como por la acción de los IGF's a nivel intrafolicular, mismos que pueden actuar en las estimulaciones a corto plazo.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Como se describió anteriormente, la práctica tradicional de sobrealimentación previa al apareamiento, conocida como flushing, ha sido realizada por periodos variados. Sin embargo, recientemente se ha observado que periodos cortos de sobrealimentación y la administración de soluciones glucogénicas orales, logran aumentar la tasa de ovulación en ovejas. A pesar de estos resultados, Los tratamientos cortos siguen implicando la administración por varios días haciendo impráctica su realización rutinaria en los centros de producción ovina.

El presente trabajo pretende hacer una aportación sobre el efecto flushing, de modo que este sea una opción barata y viable de incremento de la tasa de ovulación en ovinos.

### **4. OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la administración oral de una solución glucogénica en dosis única en la tasa de ovulación y las concentraciones séricas de glucosa y glicerol en ovejas Pelibuey.

### **5. HIPÓTESIS**

La administración de una solución glucogénica oral aumenta el reclutamiento folicular y la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey.

## **6. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPRODUCCIÓN EN LA OVEJA**

Las ovejas presentan actividad reproductiva cuando los días son más cortos, esta actividad se encuentra regulada principalmente por la variación en la secreción de melatonina como respuesta a los cambios en el fotoperiodo a lo largo del año. Una vez iniciada la actividad reproductiva, los ciclos estrales se presentan sucesivamente cada 17-19 días y solo se interrumpen cuando la hembra queda gestante o por la llegada de la época de anestro <sup>2, 3, 4, 9</sup>.

El ciclo estral ha sido dividido en cuatro etapas. La primera es el estro y se caracteriza por la aceptación de la monta por parte de la hembra, esta conducta, junto con otras características del comportamiento sexual de la oveja, está dada por la elevación de la concentración circulante de estradiol como consecuencia del desarrollo de uno o varios folículos ováricos <sup>13</sup>. En esta etapa la concentración de progesterona sanguínea es basal pues no existe un cuerpo lúteo en el ovario <sup>13</sup>. El inicio del estro se encuentra íntimamente relacionado con la presentación del pico preovulatorio de LH, que es consecuencia de un pico máximo de estrógenos producido por el desarrollo final de los folículos ováricos <sup>1, 13, 14, 15, 16</sup>. El estro dura aproximadamente 36 horas. Entre el inicio del estro y el inicio del pico de LH transcurren de 2 a 6 horas, el pico de LH tiene una duración de 9 a 12 horas. La ovulación se presenta 6 horas antes de finalizar el estro y depende directamente de la duración del estro. El estro puede darse por terminado cuando la hembra rechaza al macho después de un periodo de aceptación <sup>1, 4, 13</sup>.

La etapa que sucede al estro es el metaestro y es la etapa en que se desarrolla el cuerpo lúteo. En esta etapa comienza a elevarse la concentración de progesterona hasta alcanzar más de 1 ng/ml, momento que determina el final del metaestro y el inicio del diestro. El

metaestro tiene una duración de 3 días y durante esta etapa se presenta un pico en la secreción de FSH que se relaciona directamente con el inicio de una oleada de desarrollo folicular <sup>1, 13, 15, 16</sup>.

El diestro sucede al metaestro y es la etapa más larga del ciclo estral, dura de 10 a 11 días. Esta es la etapa de funcionalidad plena del cuerpo lúteo manteniendo los niveles de progesterona por arriba de 1 ng/ml. Junto con la actividad lútea, se presenta una intensa actividad ovárica en la que se pueden detectar oleadas de desarrollo folicular, cuyo surgimiento sucede después de un aumento de FSH, por lo que en esta etapa pueden encontrarse folículos ováricos en diferentes estados de desarrollo. Durante esta etapa, la secreción de LH se da en baja frecuencia. Después de 10 días de exposición a progesterona, el útero comienza a producir prostaglandina F-2 alfa (PGF<sub>2</sub>α) la cual termina con la vida del cuerpo lúteo, produciendo que la concentración de progesterona comience a disminuir, cuando esta concentración baja de 1 ng/ml se considera el final del diestro y el inicio del proestro <sup>1, 13, 15</sup>.

El proestro se caracteriza por la ausencia de un cuerpo lúteo funcional y por el final de la maduración de los folículos preovulatorios. Esta etapa dura de dos a tres días y en ella tiene lugar el incremento en la frecuencia de pulsos de secreción de LH que producen el ambiente adecuado para la maduración final del folículo ovulatorio, esta maduración produce un incremento de la concentración de estradiol. Cuando los niveles de estradiol se acercan a su pico máximo, provocan la aceptación del macho por parte de la hembra, con lo que termina el proestro y comienza el estro de un nuevo ciclo <sup>1, 13, 15, 16, 17</sup>.

## **DESARROLLO FOLICULAR**

Independientemente de su estado fisiológico, los ovarios de todas las especies domésticas contienen una gran cantidad de folículos primordiales, y una población más limitada de

foliculos preantrales (100 a 1000) y antrales (50 a 300), los cuales pueden encontrarse en cualquier región de la corteza ovárica <sup>18</sup>. El número de foliculos contenidos en los ovarios de cualquier hembra se determina desde su vida fetal <sup>19, 20 21</sup>.

Los foliculos ováricos han sido clasificados en 4 tipos. Los foliculos primordiales, que son microscópicos, son los más inmaduros y los más pequeños. El ovocito presente dentro del foliculo primordial se encuentra rodeado por una sola capa de células planas. El foliculo primordial se desarrollará hacia un foliculo un poco más avanzado llamado foliculo primario. El foliculo primario se caracteriza por tener un ovocito rodeado por una capa de células epiteliales cuboidales o células foliculares. Los foliculos primarios pueden desarrollarse hacia un foliculo secundario o degenerar. El foliculo secundario se caracteriza por tener dos o tres capas de células. El ovocito del foliculo secundario se caracteriza por estar rodeado por una capa, relativamente gruesa y traslúcida, llamada zona pelúcida. El estado siguiente de desarrollo es el de foliculo antral, que se caracteriza por tener una cavidad llena de líquido llamada antro, el líquido dentro del antro se llama líquido folicular. Algunas veces se llama al foliculo antral foliculo terciario. Cuando el foliculo terciario se convierte en el foliculo dominante preovulatorio puede ser llamado foliculo de Graaf. Algunos foliculos antrales pueden observarse a simple vista en la superficie de los ovarios. Tienen la apariencia de vesículas con tamaños que pueden variar desde menos de 1mm hasta varios centímetros, dependiendo de su estado de desarrollo o regresión y de la especie a la que pertenezcan <sup>15</sup>.

Los foliculos antrales consisten de tres capas distintas. Esas capas son la teca externa, la teca interna y la capa de células de la granulosa. La teca externa se compone principalmente de tejido conectivo que rodea completamente y da soporte al foliculo, la capa que se encuentra justo debajo de la teca externa es la teca interna. Las células de la teca interna son las responsables de la producción de andrógenos bajo la influencia de la LH. Bajo la teca interna se encuentra la capa de células de la granulosa, a veces llamada

membrana granulosa, está separada de la teca interna por una delgada membrana basal. Las células de la granulosa producen diversos materiales y presentan los receptores para FSH. Los productos más importantes de estas células son estrógenos, inhibina y el líquido folicular. También se cree que las células de la granulosa controlan la maduración del ovocito <sup>15</sup>.

Los folículos antrales presentes en los ovarios están listos para crecer y desarrollarse, en el momento adecuado, bajo el estímulo de FSH y LH. Estos folículos antrales han sido clasificados como pequeños, medianos y grandes y las medidas de cada una de estas clasificaciones varían de acuerdo a la especie de que se trate. De la clasificación antes mencionada, los más numerosos en los ovarios son los folículos pequeños. Los folículos grandes casi siempre pueden observarse en la superficie de los ovarios y estos folículos han alcanzado el mayor tamaño posible bajo las condiciones endocrinas existentes a lo largo de la vida de la hembra <sup>15, 19</sup>.

Los folículos primordiales comienzan a crecer en gran número antes de la pubertad, pero el crecimiento folicular puede iniciarse incluso durante la gestación y lactación cuando las gonadotropinas séricas se encuentran bajas y la ovulación suspendida. En contraste con los estados tardíos de crecimiento, el inicio del crecimiento del folículo primordial no parece ser dependiente de gonadotropinas. Esto ha sido demostrado al administrar gonadotropinas en dosis superestimulantes que no han logrado incrementar la tasa de reclutamiento folicular primordial. De la misma forma, la administración crónica de gonadotropinas no agota prematuramente los folículos del ovario, lo que indica que es hasta el desarrollo a estados de folículos preantrales, antrales y más avanzados cuando se involucra la participación de gonadotropinas. De esta forma, la FSH no parece jugar un papel fundamental para el inicio del crecimiento de los folículos primordiales. Existe evidencia de que el gen que codifica al receptor para FSH (FSHr) no se expresa hasta que el folículo alcanza el estado antral de desarrollo a partir del cual, el RNA mensajero

(RNAm) para el FSHr se localiza exclusivamente en las células de la granulosa. Aparentemente el FSHr no es funcionalmente activo durante el desarrollo preantral <sup>22</sup>. Pueden encontrarse receptores para LH (LHr) en las células de la teca interna de folículos preantrales de la borrega, de la misma forma se ha observado que los folículos preantrales de la borrega presentan RNAm para las enzimas citocromo P450 cortadora de la cadena lateral (P450scc) y citocromo P450 17- $\beta$  hidroxilasa en las células de la teca, mismas que también sintetizan andrógenos. Aunque existe controversia al respecto, en rumiantes hay evidencia de que los folículos preantrales tienen receptores funcionales para FSH y LH en las células de la granulosa y de la teca respectivamente, y que en la oveja esos folículos son capaces de sintetizar progestágenos, andrógenos y estrógenos <sup>19, 20, 21, 23, 24</sup>.

Aun no está claro si la activación del crecimiento de los folículos primordiales depende de una señal del ovocito o de cambios en las células de la granulosa y del estroma que lo rodean, los ovocitos de folículos primordiales parecen estar bañados en factores de crecimiento que pueden estar involucrados con esta activación, aunque la interacción de los factores endocrinos-paracrinos no produce la activación de todos los folículos primordiales presentes en el ovario <sup>28</sup>. Algunos de estos factores parecen tener efectos estimulatorios en las células de la granulosa, mientras que otros parecen ser inhibitorios. Estos factores incluyen a la foliculostatina, la activación del sistema de tirosin quinasa c-kit por el factor de las células indiferenciadas (SCF), al factor de crecimiento fibroblástico, junto con dos proteínas c-kit en la membrana del ovocito y su ligando (KL), el factor de crecimiento epidermal y su receptor, el factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) y los miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Los factores de crecimiento mencionados han demostrado participar en la proliferación y/o diferenciación de las células de la granulosa, vía la estimulación de la transcripción de RNAm de diversas proteínas así como de sus

receptores en las mismas células de la granulosa y/o en los ovocitos de los folículos primordiales. Aparentemente la familia de los IGFs, junto con sus receptores y proteínas ligadoras, es la que se ve principalmente involucrada en el crecimiento folicular temprano de diferentes especies, lo que sugiere que también podría estar involucrada en el inicio de crecimiento del folículo primordial <sup>23</sup>.

En los rumiantes domésticos casi todas las fases del desarrollo folicular pueden suceder en ausencia de gonadotropinas. Sin embargo, estudios sobre desarrollo folicular utilizando ultrasonografía en vacas, han encontrado que incluso los folículos pequeños (2 mm) muestran oleadas de crecimiento, lo que sugiere que pueden responder a gonadotropinas <sup>23, 24, 29</sup>.

En general, el desarrollo folicular involucra dos fases. En la primera fase los folículos, de más de 2mm en la oveja y 3-4 mm en la vaca, crecen lentamente y la tasa de crecimiento folicular está estrechamente relacionada con la tasa de proliferación de las células de la granulosa. Como ya se mencionó, esta fase no es estrictamente dependiente de gonadotropinas. La segunda fase corresponde al desarrollo terminal de los folículos antrales hasta el estado preovulatorio. Durante esta fase, el crecimiento folicular es rápido debido esencialmente al agrandamiento del antro. Además, el desarrollo folicular terminal se caracteriza por el incremento importante en la capacidad esteroideogénica y la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a FSH y LH, esta fase es estrictamente dependiente del aporte de gonadotropinas <sup>29, 30</sup>.

Antiguamente no existía consenso en relación con la forma en que se realizaba el desarrollo folicular, mientras algunos pensaban que el crecimiento del folículo ovulatorio obedecía a una serie de eventos aleatorios, otros aseguraban la existencia de una sucesión organizada de eventos durante el desarrollo folicular en la oveja y en la vaca <sup>31</sup>.

Actualmente se sabe que el crecimiento folicular ovárico es un proceso de desarrollo durante el cual un grupo de folículos adquiere secuencialmente una serie de

características, cada una de las cuales es un prerrequisito esencial para su desarrollo posterior, y que el número de folículos que alcanza el estado ovulatorio es regulado de forma específica de especie <sup>18, 29</sup>. De hecho dicha secuencia y regulación específica es, posiblemente, la causa del patrón de crecimiento folicular en cada especie y la responsable de la variación en la tasa de ovulación entre especies y razas.

### **Oleadas foliculares**

Gracias a una amplia variedad de estudios en los que se han utilizado diversas técnicas para la observación de los ovarios a lo largo de la vida de la hembra y durante el ciclo estral, que van desde el sacrificio de los animales hasta el empleo de la ultrasonografía en animales vivos, actualmente se sabe que el desarrollo folicular en la mayoría de las especies domésticas sigue un patrón de crecimiento en oleadas. Recientemente se han desarrollado técnicas de monitoreo ovárico mediante ultrasonografía para la mayoría de las especies domésticas como las yeguas <sup>32</sup>, las vacas <sup>33</sup>, las cabras <sup>34</sup> y las ovejas <sup>35</sup>, facilitando el monitoreo diario del desarrollo ovárico de una hembra en particular.

El patrón de crecimiento folicular en oleadas se refiere a un crecimiento periódico y sincronizado de un grupo de folículos antrales y ha sido observado en las diferentes especies domésticas en diversas condiciones fisiológicas <sup>36</sup>. De este modo, se han observado oleadas foliculares de la etapa prepúber de vacas, cerdas y ovejas; durante la fase lútea de vacas, ovejas, cabras, cerdas y yeguas; durante la gestación de vacas y ovejas; durante el anestro postparto de vacas de carne; y durante el anestro estacional de yeguas, ovejas y cabras <sup>18</sup>.

En la vaca, el surgimiento de una oleada folicular se caracteriza por el crecimiento repentino (dentro de dos a tres días), de entre 8 y 41 folículos pequeños (24 en promedio), que se detectan inicialmente por ultrasonografía a un diámetro de 2 a 4 milímetros. Por alrededor de dos días la tasa de crecimiento entre los folículos de la misma oleada es

similar, entonces un folículo es seleccionado para continuar creciendo (folículo dominante), mientras que los restantes se vuelven atrésicos y comienzan su regresión (folículos subordinados). En la vaca, la emergencia de la primera oleada folicular sucede en el día de la ovulación (día 0). La emergencia de la segunda oleada ocurre en el día 9 o 10. La emergencia de la tercera oleada sucede en el día 15 o 16. Cuando se encuentran bajo la influencia de la progesterona (como sucede durante el diestro) los folículos dominantes de las sucesivas oleadas sufren atresia. Cabe mencionar, que no es posible el surgimiento de una nueva oleada antes de que el folículo dominante presente pierda su efecto inhibitorio sobre los demás folículos. Aparentemente, la jerarquía del folículo dominante sobre los subordinados no es sólo en cuanto a su tamaño, sino también en cuanto a su función. El folículo dominante presente en el momento de la luteólisis se convierte en el folículo ovulatorio y la emergencia de la siguiente oleada se retrasa hasta el día de la ovulación. Cuando se trata de animales con ovulación múltiple, se cree que puede existir un estado de co-dominancia folicular o que uno de los folículos ovulatorios provenga de una oleada folicular que se originó antes que la oleada más cercana a la luteólisis <sup>40, 31, 36, 37</sup>.

Se han realizado diversos estudios para establecer la cantidad de oleadas foliculares en las diferentes especies y se ha observado que existe variabilidad entre especies y entre individuos.

En ovejas se han encontrado dos oleadas de desarrollo folicular durante la fase lútea del ciclo y una durante la fase folicular <sup>38</sup>. En los estudios iniciales acerca del desarrollo folicular que utilizaron ultrasonografía transrectal diaria en ovejas, la emergencia de folículos a partir de un grupo de folículos  $\leq 2$  mm se detectó en la mayoría de los días del ciclo estral, pero hubo un aumento significativo de dicha emergencia en los días 2 y 11. En otro estudio utilizando ultrasonografía seriada en ovejas, no se detectó un patrón de desarrollo organizado de folículos de entre 3 y 4 mm, pero los folículos que crecieron más

allá de 5 mm emergieron a intervalos regulares durante el ciclo estral, conduciendo a los autores a concluir que en la mayoría de los ciclos estrales de la oveja existen cuatro o más oleadas foliculares <sup>40</sup>.

En ovejas Suffolk y Texel, se han identificado ciclos estrales con 2, 3 y 4 periodos de emergencia folicular, estos ciclos varían en duración de 15.6, 16.1 y 17 días para ciclos de 2, 3 y 4 oleadas respectivamente. El número de folículos chicos, medianos y grandes por oveja, por día se alinean en el inicio y al final de cada periodo de crecimiento folicular en los ciclos de 2 y 3 oleadas. En los ciclos con 2 oleadas, el número de folículos pequeños se incrementa del día 0 al 4 del ciclo, disminuyendo el día 8, aumentando nuevamente al día 10 para volver a disminuir en el día 16 del ciclo. El número de folículos medianos es mayor en los días 5 y 12 comparado con los días 0, 8 y 16 del ciclo, mientras que el número de folículos grandes es mayor el día 0, 8 y 16 del ciclo que en los días 3 y 12 del ciclo. El número de folículos emergentes por oveja es mayor en los días 1 y 9 y menor en los días 0, 5 y 13 a 16. En los ciclos con 3 oleadas de crecimiento, el número de folículos pequeños aumenta del día 0 al 3, disminuyendo para el día 7 incrementándose no significativamente los dos siguientes días y disminuyendo para el día 16 del ciclo. El número de folículos medianos aumenta del día 1 al día 5 y del día 7 al 8 del ciclo y luego disminuye del día 13 al 16. El número de folículos grandes disminuye del día 0 al 2 del ciclo y luego aumenta del día 2 al 6 y de los días 13 a 15 del ciclo. El número de folículos emergentes por oveja es mayor en los días 3, 7 y 12 y menor en los días 0, 4, 9, y 14 a 16 del ciclo. Se ha demostrado que hay un crecimiento progresivo de folículos de una misma talla a otra en cierto número de días en un patrón de desarrollo de oleada. En los ciclos con 3 oleadas, estos eventos son menos claros posiblemente debido a la velocidad a la que los eventos deben sucederse en los folículos, sin embargo el patrón de crecimiento en oleadas es evidente con predominancia de 2 a 3 oleadas por ciclo <sup>40, 31</sup>.

En las ovejas, la cantidad de oleadas foliculares por ciclo no parece influir la tasa de ovulación, las ovulaciones múltiples parecen ser consecuencia de dos oleadas foliculares diferentes cuyos folículos dominantes alcanzaron a llegar al momento de la ovulación o de la presencia de folículos co-dominantes. Sin embargo, se sabe que en las razas estrictamente monovulatorias el folículo ovulatorio proviene de la oleada folicular presente en el momento de la luteólisis <sup>38, 42</sup>. En el caso de las ovejas con ovulaciones múltiples, se encuentran cuerpos lúteos de menor tamaño que en las ovejas con ovulación sencilla, pues las primeras ovulan folículos de menor tamaño <sup>38</sup>.

De la misma forma, los estudios en cabras muestran que estos animales presentan de 2 a 4 oleadas foliculares que surgen en los días 0.5, 7, 10 y 13 para las oleadas 1, 2, 3 y para la oleada ovulatoria respectivamente. El diámetro del folículo ovulatorio es significativamente mayor que el diámetro del folículo subordinado inmediato desde 2 días antes de la ovulación. Aparentemente la presencia de la dominancia folicular y la producción de estradiol son diferentes entre cada oleada, de forma que no ha sido posible determinar valores claros de la dominancia folicular en cabras. Se ha encontrado que a lo largo del ciclo estral de la cabra, puede haber sobreposiciones entre folículos de diferentes oleadas, la tasa de crecimiento de los folículos mayores de las oleadas ovulatorias es de 0.5 a 0.7 mm/día. En las cabras con ovulación simple, el folículo ovulatorio es de mayor diámetro que en las cabras con ovulación múltiple, de la misma forma como sucede en las ovejas multiovulatorias <sup>41</sup>.

Las yeguas presentan el desarrollo de oleadas foliculares mayores, caracterizadas por la presencia de un folículo dominante y un subordinado, y oleadas menores en las que el folículo mayor no alcanza el diámetro de un folículo dominante. Sin embargo, cuando no se contaba con la ayuda del ultrasonido, los primeros estudios, hechos por palpación rectal, propusieron ciclos con una sola oleada folicular <sup>36</sup>. A lo largo de los estudios ultrasonográficos en yeguas se han encontrado grandes diferencias entre razas, con ciclos

de una sola oleada folicular en las yeguas cuarto de milla y ponies, y ciclos con una oleada secundaria, no ovulatoria, y una oleada mayor que contiene al folículo ovulatorio <sup>41, 43</sup>.

La primera descripción del desarrollo folicular en oleadas en vacas fue hecha por Rajakoski (1960) <sup>44</sup> trabajando con ovarios recolectados en rastro y evaluándolos histológicamente. Dicho autor observó que el número de folículos  $\geq 5\text{mm}$  no se distribuían uniformemente a lo largo del ciclo estral y que esos folículos aparecían en dos oleadas de crecimiento <sup>31, 36, 37</sup>.

Se sabe que más del 95% de los ciclos estrales de la vaca están compuestos por dos o tres oleadas foliculares. Se han reportado ciclos con una sola oleada al llegar a la pubertad y en vacas adultas durante el primer intervalo interovulatorio después del destete <sup>36</sup>. En vacas *Bos indicus*, pueden observarse ciclos de 4 oleadas, pero la mayoría de los ciclos estrales con más de 4 oleadas se acompañan de intervalos interovulatorios prolongados debidos a un retardo en la luteólisis o a una falla en la ovulación <sup>45</sup>. En general, no existe consenso en la cantidad de oleadas foliculares que se presentan en la vaca, pero la mayoría de los estudios indican que esta cantidad oscila entre dos y tres oleadas foliculares por ciclo, sin que el número de oleadas influya sobre los porcentajes de gestación de las vacas estudiadas. En un estudio realizado por Murphy et al. (1991) <sup>9</sup>, encontraron que una dieta baja en energía podía inducir que las vacas presentaran tres oleadas foliculares por ciclo. Las oleadas sucesivas, durante el ciclo estral de la vaca, emergen en el día 0 (día de la ovulación) y 10 en ciclos con 2 oleadas y en los días 0, 9 y 16 de los ciclos con 3 oleadas; entonces, ocurre una nueva oleada cada 7 a 10 días <sup>46</sup>. Ginther et al. (1989) <sup>47</sup> concluyeron que el tiempo en el que se da la regresión lútea es lo que determina el número de oleadas foliculares en cada ciclo. Entonces, los estros son más largos en los animales con tres oleadas foliculares que en los animales con dos oleadas por ciclo. Las vacas con tres oleadas foliculares ovulan folículos de menor

diámetro que las vacas con dos oleadas foliculares. De hecho el folículo mayor de la segunda oleada es más grande que el folículo ovulatorio de las vacas con tres oleadas <sup>40</sup>.

<sup>36</sup>.

### **Relación entre oleadas foliculares y perfiles hormonales**

A lo largo del ciclo estral de la vaca se dan 2 o 3 aumentos temporales en la FSH, cada aumento se encuentra relacionado, temporal y funcionalmente, con el surgimiento de una oleada folicular. Los aumentos temporales de FSH estimula la ocurrencia de oleadas foliculares durante diversos estados reproductivos además del ciclo estral y del periodo postparto <sup>36, 37</sup>. Cada oleada folicular es precedida por un pico de FSH, de tal forma que las hembras con dos oleadas foliculares presentan dos picos de FSH y las de tres oleadas presentan tres picos. De esta forma, los folículos se detectan inicialmente, a 3 mm de diámetro, emergiendo dentro de una oleada durante el inicio del pico de FSH y la oleada continúa creciendo hasta que la FSH disminuye a su nivel previo al pico después de 48 a 72 horas. Esta disminución en los niveles de FSH se debe a una retroalimentación negativa dada por los productos de los folículos emergentes y el nadir de FSH resultante previene el surgimiento de una nueva oleada <sup>36, 37</sup>. El estradiol y la inhibina suprimen la secreción de FSH *in vitro* e *in vivo* y son, probablemente, los productos foliculares más importantes involucrados con los efectos supresivos del crecimiento folicular en oleadas. Aunque se ha asumido que la fuente principal de dichos factores es el folículo dominante, algunos estudios sugieren que todos los folículos  $\geq 5$  mm de una oleada contribuyen con la supresión de la secreción de FSH <sup>40, 36</sup>.

Del mismo modo, en la oveja y en la cabra se ha encontrado que existen aumentos de FSH asociados temporalmente con el surgimiento de cada oleada folicular, que ocurren aproximadamente cada 4 días. Los picos de FSH son rítmicos y periódicos, los picos de FSH se dan por una tendencia de esta hormona a incrementar su concentración cada 3 ó

4 días y suceden a lo largo del ciclo estral 2 o 3 días antes de la emergencia de la oleada independientemente de la duración del mismo y de la tasa de ovulación <sup>40, 48</sup>. Al igual que en bovinos, la hipótesis de la asociación temporal entre los picos de FSH y las oleadas foliculares, ovulatorias o no ovulatorias, ha sido demostrada por el surgimiento de las oleadas foliculares cercano al pico de cada aumento de FSH <sup>48</sup>. En promedio, los folículos miden 3 mm al momento del pico de FSH. La mayoría de los picos de FSH se asocian con una oleada folicular definida (crecimiento de un folículo  $\geq 5$  mm). Otra prueba para la hipótesis de la relación temporal entre la FSH y las oleadas foliculares es el incremento significativo en las concentraciones de FSH previas y la disminución posterior a la emergencia de cada oleada folicular <sup>38</sup>. Actualmente, se sabe que existe una correlación cercana entre el número de oleadas foliculares y el de picos de FSH durante el ciclo estral y entre la duración del intervalo interoleadas y del intervalo entre cada pico de FSH <sup>40, 48</sup>.

Durante la primera oleada folicular, la secreción de estradiol e inhibina A están positivamente relacionados con el crecimiento folicular e inversamente relacionados con la secreción de FSH. Sin embargo, durante la sucesión de las oleadas estas relaciones hormonales se hacen menos evidentes. La secreción del estradiol ovárico depende tanto de la presencia de un folículo estrogénico grande en el ovario como de una apropiada estimulación por parte de la LH <sup>49</sup>.

La frecuencia de pulsos de LH durante la primera oleada folicular es alta y esto se refleja en la secreción ovárica de estradiol. Sin embargo, durante las oleadas foliculares subsecuentes, la frecuencia de pulsos de LH disminuye como resultado de la retroalimentación negativa ejercida por parte de la progesterona producida en el cuerpo lúteo. De esta forma la secreción de estradiol no puede ser predictiva de la capacidad secretora del folículo dominante de cada oleada. De hecho, los folículos dominantes de la segunda y tercera oleada secretan la misma cantidad de androstenediona, pero menos estradiol, cuando se desafían con LH. De hecho, parece que se requiere de un periodo

exposición a una frecuencia alta de pulsos de LH antes de que los folículos adquieran la capacidad de secretar cantidades normales de estradiol. En contraste con lo que sucede con el estradiol, la inhibina A no se deriva solamente del folículo dominante y se secreta en concentraciones relativamente altas y constantes a lo largo de la fase lútea. De esta forma, la contribución de múltiples folículos a la secreción ovárica de inhibina A, explica la falta de asociación entre inhibina A y el desarrollo del folículo dominante durante la mitad de la fase lútea. Sin embargo, dado que la secreción de inhibina se mantiene elevada durante esta fase del ciclo ovárico, cuando la secreción de estradiol es baja, pareciera que la inhibina A es el principal regulador de FSH durante la fase lútea mediatardía. De esta forma, está claro que el estradiol y la inhibina A controlan la secreción de FSH durante la primera oleada folicular. Sin embargo, la regulación precisa de las fluctuaciones de FSH asociadas con la segunda y tercera oleadas requieren de investigación sobre las fluctuaciones de la inhibina <sup>47, 48</sup>.

Cuando se realiza una infusión constante de un agonista de GnRH en vacas, se encuentra que el crecimiento folicular se detiene en 7-9 mm de diámetro cuando se suprime la secreción pulsátil de LH. Si también se suprime la secreción basal de FSH, no se observan folículos antrales >4mm de diámetro. Cuando se usa el mismo modelo junto con infusiones de FSH, LH o LH y FSH, se puede encontrar que la FSH se requiere inicialmente para el desarrollo de folículos capaces de responder a gonadotropinas. Sin embargo, los folículos antrales grandes pueden modificar su dependencia de gonadotropinas de FSH a LH. Además, parece requerirse de un soporte pulsátil de LH para mantener la competencia ovulatoria de los folículos preovulatorios bajo un ambiente de FSH decreciente. De hecho, el incremento en la secreción pulsátil de LH también ha sido asociado con el alargamiento de la vida del folículo dominante <sup>21, 29, 48</sup>.

### **Eventos durante el desarrollo folicular en oleadas**

Durante el desarrollo de las oleadas foliculares, los folículos van adquiriendo una serie de características funcionales que les proveen la capacidad de seguir creciendo bajo un ambiente endocrino cambiante. Dichas características han permitido dividir las oleadas foliculares en 4 etapas: reclutamiento, selección, dominancia y atresia folicular.

El reclutamiento es la etapa en la que un grupo o cohorte de folículos antrales pequeños son estimulados por gonadotropinas para comenzar a crecer rápidamente y a su vez producen estradiol. Algunos de los folículos reclutados sufren atresia en poco tiempo. Después del reclutamiento, algunos de los folículos que no sufrieron atresia son seleccionados. La selección implica el surgimiento de uno o más folículos, potencialmente ovulatorios, de la cohorte de folículos previamente reclutados. Los folículos seleccionados continúan con su desarrollo y tienen dos destinos posibles, convertirse en folículos dominantes o sufrir atresia. Conforme los folículos seleccionados avanzan hacia la dominancia, continúan produciendo cada vez mayores cantidades de estradiol e inhibina, la cual inhibe la secreción de FSH por parte de la hipófisis anterior. La dominancia folicular se caracteriza por la presencia de uno o más folículos preovulatorios grandes de crecimiento rápido y que ejercen un gran efecto inhibitorio sobre los otros folículos antrales de la cohorte de folículos reclutados y seleccionados. Esta inhibición parece ser ejercida a través de la secreción de inhibina por parte del folículo dominante y por una reducción en el aporte sanguíneo a algunos folículos. La baja concentración de FSH sanguínea, aunada a un aporte sanguíneo disminuido resulta en la atresia de los folículos. Solo los folículos que reciben un alto aporte sanguíneo y altos niveles de gonadotropinas continúan su crecimiento <sup>15, 29, 48</sup>.

A continuación se describen los eventos que suceden en cada una de las etapas mencionadas.

## **Reclutamiento**

En general, el reclutamiento se define como el inicio de la foliculogénesis dependiente de gonadotropinas de una cohorte de folículos. El reclutamiento también se conoce como emergencia y sucede durante lo que se conoce como “ventana de reclutamiento” que puede durar 1, 2 ó 3 días en ovejas, vacas o caballos, respectivamente. Solo pueden ser reclutados los folículos dependientes de gonadotropinas <sup>18</sup>.

Morfológicamente, el reclutamiento se caracteriza por el inicio del crecimiento de una cohorte de más de 7 folículos que continúan creciendo hasta 8 ó 9 mm de diámetro. De esos folículos, uno acelerará su tasa de crecimiento y crecerá hasta madurar. Se cree que este proceso es dependiente de gonadotropinas y se considera iniciado cuando los folículos son estimulados para crecer a un tamaño mayor de 4 mm. Este inicio en el crecimiento de la cohorte folicular es producido por un incremento transitorio de FSH que debe ser, al menos 3 veces mayor que su nivel basal <sup>18</sup>.

Aparentemente, la expresión de RNAm para FSHr y LHR en las células de la granulosa y de la teca, respectivamente, no presenta variación durante el reclutamiento y crecimiento de la cohorte en relación con la etapa de folículos preantrales y antrales tempranos, así mismo no existe variación en cuanto a la intensidad de expresión de los mismos <sup>49</sup>.

En las vacas, al analizar los folículos reclutados y creciendo hacia un diámetro de 4 a 6 mm, puede detectarse el inicio simultáneo de la expresión de RNAm para P450scc y P450arom en las células de la granulosa. Cuando los folículos de la cohorte alcanzan los 6-9 mm, todos se encuentran expresando RNAm para las enzimas esteroideogénicas mencionadas. Sin embargo, existen folículos que aparentemente pertenecían a la misma cohorte que no expresan dichos RNAm's y que aparentemente no habían sido reclutados. Ha sido encontrada una asociación entre el número de folículos que expresan RNAm para P450scc y P450arom durante el inicio del reclutamiento y el número de folículos que continúan creciendo hasta la etapa de reclutamiento tardío, lo que hace pensar que la

adquisición de la capacidad de sintetizar esas enzimas es un factor decisivo para que los folículos reclutados continúen su crecimiento, puesto que todos los folículos que continúan creciendo más allá de 4-6 mm de diámetro, después de la etapa temprana de reclutamiento, expresan RNAm para P450scc y P450arom, lo que les da la capacidad de producir cantidades significativas de estradiol. Aunado a esto, se sabe que los folículos menores de 5 mm no son capaces de producir estradiol <sup>21, 29</sup>. Está claro que durante la fase lutea temprana existe menor capacidad esteroidogénica, esto puede deberse a que haya menores cantidades de gonadotropinas en las células foliculares, debido a una menor cantidad de receptores para FSH y LH en las células de la teca y de la granulosa <sup>50, 51</sup>.

Es probable que la expresión de RNAm para P450scc y P450arom sea promovida por el incremento transitorio de FSH al inicio de cada oleada folicular. La LH no parece estar involucrada en el reclutamiento folicular, al menos en cuanto a la inducción de la expresión de RNAm para P450scc y P450arom, pues no se ha detectado RNAm para LHR en las células de la granulosa durante el reclutamiento. Un posible efecto de la LH podría ser a través de la estimulación de la síntesis de andrógenos tecales. Por otro lado, el crecimiento de los folículos hasta 7-9 mm se da cuando se encuentra inhibida la LH, más no la FSH <sup>29</sup>.

Es posible que la hormona de crecimiento (GH) tenga alguna participación durante el reclutamiento folicular, pues la administración de GH exógena incrementa la concentración de IGF-I y el número de folículos reclutados <sup>52</sup>. Sin embargo, este mayor número de folículos reclutados no conduce a un aumento en el número de folículos seleccionados. Por lo tanto, los folículos adicionales en el reclutamiento no pueden conducir a mayor tasa de ovulación cuando se estimula el aumento con GH en rumiantes. Sin embargo, la GH exógena incrementa la tasa de ovulación y el tamaño de camada en los ratones. Se ha informado de una mayor proporción de nacimientos gemelares en vacas

tratadas con GH, pero la respuesta gemelar varió entre razas y puede revelar una interacción entre GH y factores genéticos o medioambientales <sup>53</sup>.

El papel del IGF-I durante el reclutamiento folicular en la oveja puede ser la estimulación de la proliferación de las células de la granulosa de los folículos pequeños (1-3 mm) y su función parece estar íntimamente ligada con la de la GH, como ya se mencionó, en rumiantes, la administración de somatotropina conduce a un incremento de las concentraciones de IGF-I y de insulina plasmáticas y a un incremento en el número de folículos antrales pequeños saludables. Se sugiere que la GH actúa in vivo aumentando las concentraciones periféricas de IGF-I e insulina <sup>30, 54</sup>. Se sabe que el IGF-I actúa en sinergia con la FSH para estimular la esteroidogénesis por parte de las células de la granulosa de folículos de todas las tallas. Se sugiere que la biosíntesis de estrógenos y progesterona es regulada diferencialmente por IGF-I dependiendo del tamaño de los folículos <sup>54, 55</sup>.

Parece ser que el papel principal de la FSH durante el reclutamiento folicular es inducir la actividad aromataasa, lo cual explica por qué los folículos aumentan su capacidad para producir estradiol, estimular el inicio la producción de inhibina y folistatina, así como iniciar la represión del gen que codifica para IGFBP-2 <sup>18, 54</sup>. La segunda de las acciones mencionadas, aunque se inicie durante esta etapa, comenzará a repercutir hasta el final de la etapa de selección y durante el establecimiento de la dominancia, puesto que la folistatina limita el tamaño folicular, mientras que la represión del gen para IGFBP-2 es responsable del aumento en la disponibilidad de IGF-I con lo que se ve aumentada su acción <sup>54</sup>.

### **Selección**

Durante la selección, se escoge al futuro folículo dominante y los otros folículos de la cohorte se convierten en subordinados y entran en atresia, lo cual usualmente es

comprobado por un bloqueo en su tasa de crecimiento seguido de una disminución paulatina en su tamaño <sup>18</sup>. Básicamente, la selección se puede definir como la divergencia entre el perfil de crecimiento del futuro folículo dominante y el de los subordinados. Se basa en el cambio de la sensibilidad de algunos folículos de una misma oleada a FSH y LH y coincide con la primera disminución significativa de la concentración de FSH <sup>36, 56</sup>.

El aumento transitorio de la FSH que provocó el inicio de la oleada folicular, también provoca, entre otras cosas, que los folículos produzcan LHr. En esta etapa, lo importante es que no todos los folículos producen la misma cantidad de LHr y por esta razón se da una sensibilidad diferenciada para LH, esta sensibilidad confiere al folículo la capacidad de sobrevivir sin FSH. El perfil de crecimiento del folículo dominante y el de los subordinados, comienza a diferir rápidamente aproximadamente 38 – 48 horas después del surgimiento de la oleada (8-9 mm de diámetro en la vaca), momento en el cual el folículo que será dominante tiene más LHr y, por lo tanto, la ventaja competitiva sobre los nuevos folículos subordinados. De esta forma, el primer folículo que desarrolle LHr en las células de la granulosa será capaz de responder a LH, tanto como a FSH, y de sobrevivir en un ambiente incapaz de mantener a los otros folículos. Sin embargo, en este momento los folículos subordinados aún pueden alcanzar la dominancia si el folículo dominante es removido o si se administra FSH exógena. Cuando existen múltiples folículos dominantes, como sucede durante la superestimulación con FSH o en animales que presentan ovulaciones múltiples, la competencia por LH se hace evidente debido al menor diámetro máximo alcanzado por estos folículos, comparado con el de un solo folículo dominante. Se cree que en ovejas con ovulaciones múltiples existen diferencias en relación con la sensibilidad a LH, comparado con los animales con ovulaciones sencillas, de forma que en los animales con ovulaciones múltiples más folículos obtienen la habilidad para usar LH

40, 18, 29,+56.

Puede detectarse el inicio de la expresión de RNAm para LHr y 3 $\beta$ HSD en las células de la granulosa del folículo seleccionado <sup>57</sup>. Pero no está claro si la selección del folículo dominante se da antes de la expresión de dichos RNAm o si son eventos simultáneos, pues se ha detectado un aumento del tamaño folicular y de la secreción de estradiol por parte de un folículo de la cohorte antes de la expresión de RNAm para LHr y 3 $\beta$ HSD en las células de la granulosa. De la misma forma, se sabe que existe un incremento en la concentración de estradiol en el folículo dominante seleccionado, antes del incremento en el número de receptores para gonadotropinas. La inducción de LHr en roedores, depende de la acción de la FSH y el estradiol. De esta forma, el folículo con mayor concentración de estradiol será el primero en desarrollar LHr y así será capaz de responder al LH y sobrevivir durante la caída de la FSH sérica.

El crecimiento continuo de los folículos seleccionados generalmente se acompaña por un incremento en la expresión de receptores para gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y StAR, y los folículos seleccionados tienen mayor expresión de RNAm que los folículos subordinados y atrésicos. A pesar de los incrementos en la expresión de RNAm de los folículos durante su desarrollo, la selección probablemente no sea determinada por la expresión diferenciada de RNAm tanto para LHr, P450scc, P450c17, 3 $\beta$ HSD o StAR en las células de la teca, FSHr y P450arom en las células de la granulosa, o P450scc en células de la teca y granulosa. Esto es por que más de un folículo, de aproximadamente el mismo tamaño, expresan cantidades similares de esos RNAm indicando que las técnicas actuales son demasiado insensitivas o que la selección depende otros factores superiores que aún deben ser determinados <sup>18, 21, 29, 49,+57</sup>.

### **Dominancia**

Después de los procesos de reclutamiento y selección, y como consecuencia de los eventos que en ellos suceden, puede establecerse la dominancia de uno o varios folículos

dependiendo de cada especie. Durante la dominancia folicular ocurren el crecimiento y maduración de los folículos preovulatorios. El inicio de la dominancia puede ser percibido por la diferenciación de los perfiles de crecimiento entre el folículo mayor y el segundo más grande de una oleada y por el inicio de la regresión, o la supresión del crecimiento, de los folículos medianos en contraste con el crecimiento continuo del folículo mayor en una misma oleada. Del mismo modo, no puede ocurrir el reclutamiento de una nueva oleada <sup>18, 21, 29, 36, 40</sup>.

Dadas las características que los folículos adquieren durante los procesos previos al establecimiento de la dominancia folicular, puede decirse que la dominancia de los folículos es una dominancia funcional. El folículo dominante funcional tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de otros folículos en ambos ovarios mientras continúa con su crecimiento. De hecho, si el folículo dominante es removido se producirá un nuevo reclutamiento de forma inmediata <sup>36, 58</sup>. Además de la diferencia entre la tasa de crecimiento de los folículos de la misma oleada, Evans et al. (2000) <sup>31</sup>, observaron que los folículos que se suponen dominantes de las oleadas 1 y 3 de la oveja y la 1 de la cabra <sup>41</sup>, contienen más estradiol y una relación estradiol-progesterona mayor que otros folículos de la misma oleada. Lo anterior comprueba que mientras se da la diferencia en el diámetro de los folículos de una oleada, se generan diferencias entre ellos en cuanto a su capacidad esteroidogénica y que el folículo dominante de cada oleada es la principal fuente del estradiol circulante, aunque los folículos subordinados contribuyen casi con el 10% de la producción ovárica de estradiol <sup>36</sup>. Sin embargo, De Castro et al. (1999) <sup>41</sup>, encontraron que en la cabra la producción de estradiol se detiene durante la fase de crecimiento tardío antes de que el folículo alcance su diámetro máximo. Esta dominancia funcional de los folículos, caracterizada por la elevada secreción de estradiol e inhibina A, es más corta que la dominancia morfológica que puede detectarse por ultrasonografía <sup>48</sup>. Sin embargo, en ovejas el tamaño del folículo no es suficiente para poder determinar si

es dominante o no, de hecho la oveja puede tener más de un folículo dominante por oleada, lo que indica que la dominancia folicular en esa especie no es tan intensa <sup>18, 29, 31, 43</sup>.

A lo largo del tiempo se ha cuestionado la existencia de la dominancia folicular en la oveja. Sin embargo, existen observaciones que sustentan la existencia de la dominancia en la oveja, principalmente durante la primera y la última oleada del ciclo. En primer lugar, se sabe que en ovejas y cabras hay emergencia de oleadas foliculares asociadas a un folículo mayor que los demás durante el metaestro y el proestro de la cabra. También se sabe que si se provoca la luteólisis con prostaglandinas en diversos días del ciclo, la mayoría de las ovejas ovulan el folículo mayor presente en el momento de la inducción de la luteólisis. Así mismo, se ha encontrado que la respuesta folicular y ovulatoria a los tratamientos de superovulación en ovejas se ve influida por el estado de la oleada folicular en el momento del tratamiento, la cual se ve influida por la presencia o no de un folículo grande en crecimiento al inicio del tratamiento, la presencia de un folículo con estas características se ha asociado con menor reclutamiento folicular, menor tasa de ovulación y menor recuperación embrionaria <sup>40</sup>. Parece ser que la diferencia principal en el caso de la oveja es la magnitud de la dominancia, la cual usualmente se define como la diferencia de tamaño entre el folículo dominante y el folículo subordinado mayor. La diferencia de tamaño entre los folículos mencionados es de solo 2 a 3 mm en ovejas, 3 a 4 mm en cerdas y hasta 8 y 15 a 20 mm en vacas y yeguas respectivamente. Como consecuencia de lo anterior, es mucho más fácil identificar, por medio de ultrasonografía, el folículo dominante de la yegua y la vaca que el de la oveja <sup>18</sup>.

Durante el periodo posterior a la selección y durante el establecimiento de la dominancia, existe un crecimiento continuo de los folículos, durante el cual se incrementa la expresión de RNAm para los receptores de gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y StAR en las células de la teca y de la granulosa, y los folículos producen grandes cantidades de

estradiol, lo que indica que los folículos dominantes adquieren una elevada capacidad para producir esteroides a lo largo de su desarrollo.

Los patrones de expresión de RNAm para LHr durante y en las etapas posteriores a la selección, sustentan que en vacas y yeguas la LH puede sostener el desarrollo del folículo dominante, sin embargo si la frecuencia de pulsos de LH es demasiado baja, como sucede durante la mitad de la fase lútea, el crecimiento del folículo dominante no continuará.

Después de la luteólisis se aumenta la expresión de RNAm para P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, y 3 $\beta$ HSD, pero no para P450<sub>arom</sub>. Esto coincide con el incremento en la concentración de androstenediona y estradiol en el líquido folicular, bajo la influencia de una liberación pulsátil de LH. En este sentido, Taru Sharma y Majumdar (1999) <sup>57</sup>, encontraron que las enzimas glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), 3- $\beta$ HSD y 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17- $\beta$ HSD), tienen niveles más elevados durante el periodo posterior a la luteólisis y que la actividad de la G6PD es mayor en las células de la teca que en las de la granulosa. El incremento significativo en la expresión de RNAm`s codificando enzimas esteroidogénicas y en la concentración de esteroides en el líquido folicular, pueden deberse al incremento en la frecuencia de pulsos de secreción de LH durante el periodo preovulatorio, y este aumento de la frecuencia de pulsos de LH se asocia a un incremento en la producción de LHr en las células de la granulosa de los folículos dominantes <sup>30, 60, 61</sup>. El incremento en la frecuencia de pulsos de LH puede incrementar la expresión de RNAm para las enzimas esteroidogénicas necesarias para la síntesis de andrógenos precursores de la producción de estradiol. En la vaca, la producción de andrógenos por parte de las células de la teca puede ser un paso limitante para la producción de esteroides foliculares de forma dependiente de concentración, pero el hecho de que la proporción estradiol-andrógenos permanezca aproximadamente en uno a lo largo de la fase folicular de la oveja podría descartar lo anterior a menos que existan diferencias claves entre especies <sup>18, 21, 29, 50, 56, 60</sup>.

Aparentemente, con la generación de receptores para gonadotropinas, bajo la influencia de hormonas esteroides, se aumenta la tasa de unión de gonadotropinas durante la fase cercana y posterior a la luteólisis aumentando así la síntesis de esteroides en los folículos y principalmente en el (los) dominante (s) <sup>60</sup>.

De la misma forma que sucede con el estradiol, la concentración de progesterona en las células de la granulosa de los folículos aumenta durante la fase lútea tardía. Esta producción de progesterona parece estar estimulada, al menos en parte, por el IGF-I. Aunque se sabe que el IGF-I estimula el crecimiento y producción de los folículos en la mayoría de las etapas de las oleadas foliculares <sup>30, 50, 54</sup>.

Se sabe que por el aumento en sus productos de secreción, los folículos dominantes ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los folículos subordinados, este efecto parece ser ejercido principalmente por la inhibina al disminuir la secreción de FSH por parte de la hipófisis <sup>49, 62, 63</sup>.

Shidaifat (2001) <sup>64</sup>, encontró que existe un aumento progresivo en el contenido de inhibina-A en el líquido folicular, según aumenta el tamaño de los folículos. Según sus estudios, la concentración media de inhibina-A en los folículos es significativamente mayor en los folículos antrales grandes, comparada con la de los folículos medianos y chicos <sup>49, 59, 62</sup>. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la inhibición ejercida por el folículo dominante es realizada por inhibina, pues son los folículos grandes los que poseen mayor cantidad de inhibina al momento de determinarse la dominancia de un folículo.

Aparentemente, el folículo dominante ejerce supresión sobre los subordinados utilizando vías sistémicas aunque parece haber también efectos supresivos locales <sup>49</sup>. Sin embargo, el folículo dominante también parece ser sujeto de inhibición en su crecimiento por parte del cuerpo lúteo puesto que se ha encontrado una mayor frecuencia de ovulaciones en el ovario contralateral al cuerpo lúteo. El efecto de la progesterona lútea puede ser la causa

de la ausencia de dominancia folicular en las oleadas menores de la oveja, como resultado de una supresión sistémica de LH inducida por la progesterona durante el diestro, mientras que la presencia de dominancia folicular durante las oleadas mayores es el resultado de una pérdida relativa de la supresión por progesterona durante el proestro y metaestro. Aparentemente existe una regulación intraovárica del crecimiento folicular utilizando péptidos locales, aunque parece que los 2 ovarios también ejercen regulación sobre el crecimiento de los folículos en ambos ovarios, utilizando vías sistémicas <sup>40</sup>.

Entre los estudios de los efectos inhibitorios del folículo dominante sobre los subordinados se encuentran los realizados utilizando líquido folicular. Driancourt et al. (2000) <sup>65</sup> encontraron que el líquido folicular de folículos dominantes reduce la actividad aromatasa en un efecto dependiente de dosis y que la magnitud de este efecto inhibitorio no varía bajo la influencia de la FSH. Contrario a esto, la LH potencializa este efecto del líquido folicular. Aparentemente la inhibición por parte del líquido folicular es exclusiva de los folículos dominantes, pues cuando se utiliza líquido folicular proveniente de folículos atrésicos no se observa la inhibición de la actividad aromatasa. Parece que la inhibición ejercida por el líquido folicular, es específica de la aromatasa pues la concentración de testosterona permanece sin cambios cuando se somete a las células de la pared folicular a tratamiento con líquido folicular proveniente de folículos dominantes. La inhibición de la aromatasa no parece ejercerse a través de la alteración de RNAm para P450arom pues el efecto del líquido folicular es agudo, sucediendo dentro de las tres primeras horas de tratamiento. En el estudio citado, concluyeron que el inhibidor se origina en las células de la granulosa pues cuando se usan cultivos con células de la teca o de la granulosa, pues solo el medio proveniente de cultivos con células de la granulosa exhibe efectos inhibitorios. Esto hace pensar que el inhibidor tiene un efecto autocrino. Driancourt et al. (2000) concluyen que el inhibidor podría ser una proteína, pues no parece ser un esteroide y tampoco un factor de crecimiento <sup>18, 22, 36, 59</sup>.

De esta forma, ha sido comprobado que no solo la inhibina producida por el folículo dominante es responsable de la inhibición del crecimiento de los folículos subordinados y que existen otros factores que inducen la atresia folicular. Por otra parte, el folículo dominante no solo ejerce inhibición sobre el patrón de crecimiento de los folículos subordinados, sino también lo ejerce sobre la competencia de los ovocitos de los folículos subordinados al disminuir su eficiencia en la utilización de glucosa como fuente de energía. La dominancia folicular parece afectar de forma irreversible a los folículos medianos, puesto que la competencia de estos cae con la dominancia folicular y entran en atresia, cosa que no sucede con los folículos chicos y grandes <sup>22, 66</sup>.

Después del establecimiento de la dominancia, la sucesión de las oleadas foliculares solo sucede cuando el folículo dominante de la oleada en curso termina su fase estática o comienza su etapa de atresia. En las ovejas ha habido divergencia de opinión en cuanto a la existencia de la dominancia folicular, sin embargo existen diversos estudios en los que se ha comprobado que en estos animales si hay un folículo que se establece como dominante, aunque el desarrollo folicular en oleadas y la dominancia folicular no parezcan tan intensos como en las vacas <sup>67</sup>.

Una vez que sucede la luteólisis, el folículo dominante, libre de la restricción hormonal impuesta por la progesterona lútea sobre el hipotálamo y la hipófisis, continuará desarrollándose y disparará la cascada de eventos que conducen a la ovulación. En la oveja el intervalo interoleadas es de 4-5 días, probablemente como reflejo del menor diámetro del folículo dominante, de forma que la oleada ovulatoria de la oveja parece ser la tercera o la cuarta. Así mismo, en las ovejas con mayor tasa de ovulación y por lo tanto con mayor prolificidad, puede darse una situación de co-dominancia. Cabe mencionar que el tiempo en que se da la regresión lútea es lo que determina el número de oleadas foliculares en cada ciclo <sup>40, 29, +68</sup>.

## **Atresia**

Como ya se mencionó, Durante el crecimiento de los folículos y el establecimiento de la dominancia, existe una secreción continua de productos foliculares que causan la supresión de la FSH hasta su nivel más bajo, junto otra supresión propia de la progesterona lútea sobre la LH. La conjunción de estas influencias inhibitorias causa que el folículo dominante, y los subordinados, detenga sus funciones metabólicas y comience a morir <sup>40</sup>. La atresia es el destino de todo folículo dominante a menos que sea ovulado. Con la atresia, declina rápidamente la expresión de RNAm para receptores de gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y StAR, esto sucede antes de la observación de los signos morfológicos de atresia. En una oleada no ovulatoria, la atresia de los folículos dominantes parece iniciar en los días 4 y 6 de la oleada, días en que puede observarse que la expresión de RNAm para FSHr en las células de la granulosa, LHr en las células de la teca, P450scc en las células de la teca y granulosa y P450c17 en las células de la teca disminuye fuertemente <sup>22</sup>. El proceso de atresia de los folículos no seleccionados parece ser similar a la atresia del folículo dominante <sup>21, 29</sup>. Adicional a la reducción de la expresión de RNAm para gonadotropinas, el pico preovulatorio de LH provoca la síntesis de enzimas proteolíticas como tripsina y quimiotripsina que pueden tener participación en la eliminación de los receptores para gonadotropinas de los folículos no ovulatorios y de esta forma estos folículos se vuelven atrésicos después del pico de LH pues las gonadotropinas no pueden unirse a ellos <sup>49</sup>.

Cuando el (los) folículo(s) dominante(s), y los subordinados, termina con la secreción de los productos propios de su crecimiento y puede generarse un nuevo pico de FSH, el cual no tendrá efecto sobre el folículo dominante que se encuentra en regresión, pero si estimula el surgimiento de la siguiente oleada de desarrollo folicular y así continuará el ciclo ovárico.

Cuando desaparece la inhibición por parte de la progesterona (como sucede después de la luteólisis), se incrementa la frecuencia de pulsos de LH y así se permite la continuación del crecimiento del folículo dominante y se elevan significativamente las concentraciones circulantes de estradiol, las cuales estimulan una mayor aceleración de los pulsos de LH hasta generar el pico preovulatorio de LH y la ovulación <sup>40</sup>.

### **Factores extra e intraováricos involucrados en el desarrollo folicular y su regulación**

A lo largo de esta revisión se ha mencionado que los principales reguladores del crecimiento folicular son las gonadotropinas y que existen otros factores, de origen intra y extraovárico, que se ven involucrados en algunas de las etapas del desarrollo de las oleadas foliculares. En esta sección se describen más detalladamente las funciones de dichos factores, sus interacciones y su papel en la regulación del desarrollo folicular en los ovarios.

### **El factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF) y sus proteínas ligadoras (IGFBP)**

El IGF parece tener un papel fundamental dentro del sistema ovárico de regulación del crecimiento folicular. Dentro del sistema están incluidos los IGF tipo I y tipo II, seis tipos de IGFBP's (IGFBP-1 a -6), receptores tipo 1 y tipo 2 para IGF y proteasas específicas para IGFBP. Se sabe que los folículos ovinos tienen la capacidad de expresar RNAm para IGFBP-2 a -5 <sup>21, 29, 30, 54</sup>.

La función de los IGF es estimular la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca y se dice que son factores de sobrevivencia folicular. Durante la folículoogénesis, existen variaciones entre especies en cuanto al patrón de expresión de RNAm para IGF e IGFBP, así como para el receptor de IGF-I <sup>30, 54</sup>. Armstrong y Webb (1997) <sup>69</sup>, encontraron que las células de la teca de folículos bovinos y ovinos expresan

RNA<sub>m</sub> para IGF-II <sup>69, 70</sup>. A pesar de estas coincidencias en la expresión espacial de IGF-II, la expresión de IGF-I no está clara. Se ha detectado RNA<sub>m</sub> para IGF-I en células de la granulosa y de la teca ovina y en células de la granulosa bovina, pero también hay quien ha fallado en el intento de detectar la expresión de RNA<sub>m</sub> para IGF-I en folículos ovinos <sup>21, 29, 54</sup>.

Actualmente se sabe que la actividad biológica de los IGF's es controlada por su asociación con sus IGFBP's específicas. Al igual que con los IGFS, la expresión espacial de los RNA<sub>m</sub> para IGFBP varía según la especie. Se sabe que en las vacas y ovejas, la expresión de RNA<sub>m</sub> para IGFBP-4 y -2 solo sucede en las células de la teca y de la granulosa respectivamente, en cambio en el cerdo la IGFBP-4 se expresa en las células de la granulosa y en la mujer se expresa en ambos tipos celulares <sup>21, 29, 54, 71</sup>. Se sabe que, *in vitro*, las IGFBP's atenúan la acción de los IGF's, por lo que podría suponerse que para incrementar la actividad biológica de los IGF's locales se debe de una disminución en la producción folicular de IGFBP's, lo que resultaría en una mayor respuesta a gonadotropinas. Armstrong et al. (1996) <sup>72</sup>, observaron que la concentración de IGFBP-2, -4 y -5 en el líquido folicular disminuye durante el desarrollo de la dominancia en ovinos, lo cual puede respaldar la hipótesis mencionada anteriormente. En este sentido, Armstrong et al. (1998) <sup>71</sup>, demostraron que el decremento de la concentración de IGFBP-2 en el líquido folicular bovino se debe a una pérdida de la expresión de RNA<sub>m</sub> para IGFBP-2 en las células de la granulosa de los folículos dominantes <sup>30, 54</sup>. Se ha demostrado, en cultivos de células de la granulosa, que la FSH en concentraciones fisiológicas, inhibe la expresión de RNA<sub>m</sub> para IGFBP-2. Es importante mencionar que el crecimiento folicular terminal se caracteriza por un fuerte incremento en la sensibilidad de las células de la granulosa a FSH. Este incremento puede ser resultado de sistemas de amplificación intrafoliculares que involucran al estradiol y a los IGF. La concentración de IGF biodisponible se incrementa fuertemente en los folículos antrales grandes durante el

desarrollo folicular terminal. Se piensa que, en una oleada, solo los folículos con la mayor concentración intrafolicular de estradiol e IGF biodisponible serán capaces de desarrollarse en un ambiente de concentraciones de FSH decrecientes. Además, se sugiere que la FSH y la LH, en la etapa folicular temprana y tardía respectivamente, podrían incrementar las concentraciones de IGF biodisponible en los folículos dominantes, por medio de la regulación de la síntesis y proteólisis de las IGFBP, reforzando así los sistemas de amplificación <sup>30, 54</sup>. Esto puede relacionarse con lo encontrado por Behl y Pandey (1999) <sup>55</sup>, que el estímulo de la esteroidogénesis y de la proliferación de las células de la granulosa y teca es mayor en las células de los folículos grandes de cabras. Lo anterior indica que la inhibición de la expresión de RNAm para IGFBP-2 en las células de la granulosa, es un factor clave en el desarrollo de la dominancia folicular en el bovino. El incremento en la actividad biológica de IGF resultante en esos folículos, podría incrementar la sensibilidad de sus células de la granulosa a FSH <sup>18, 21, 29, 54, 71</sup>.

### **Hormona del Crecimiento (GH)**

Las acciones de la GH no están confinadas únicamente al crecimiento animal, ahora está claro que diversos procesos metabólicos y fisiológicos (incluyendo la reproducción) del animal adulto se controlan parcialmente por la GH. Los tejidos reproductivos que poseen RNAm para el receptor de GH (GHR) incluyen al hipotálamo <sup>73</sup>, la hipófisis <sup>73</sup>, el cuerpo lúteo <sup>74</sup>, el folículo ovárico <sup>74</sup>, el oviducto <sup>74</sup>, el endometrio <sup>74</sup>, el miometrio <sup>74</sup> y la placenta <sup>74</sup>. La más alta concentración de GHR se encuentra en el hígado, donde la unión de la GH con su receptor causa un incremento en la síntesis y secreción del factor de crecimiento parecido a la insulina I (IGF-I). El IGF-I forma un complejo junto con diversas IGFBP y así viaja como hormona endocrina para estimular diversos procesos fisiológicos y metabólicos incluyendo los necesarios para la reproducción <sup>53</sup>.

Gong et al. (1991) <sup>75</sup> encontraron que la administración farmacológica de GH recombinante bovina incrementa el número de folículos antrales sin mostrar alteraciones en las concentraciones de gonadotropinas. Esto indica que la GH tiene participación en el crecimiento folicular. Estudios en ovejas han mostrado este mismo efecto de la GH sobre el crecimiento folicular <sup>76</sup>. Además, la reducción de la concentración de GH e IGF-I después de la inmunización de vacas prepúberes contra GHRH inhibió el desarrollo de folículos >7mm de diámetro. Si la GH tuviera un efecto directo en el ovario, entonces su receptor debería estar presente en las células ováricas. En las vacas se ha encontrado al GHr en las células lúteas grandes. Puede haber diferencias entre especies para la expresión de GHr en los folículos ováricos. En el humano y la rata, se ha detectado al GHr en las células de la granulosa y en el cuerpo lúteo. Sin embargo, la expresión del RNAm para GHr es 20 veces menor en los folículos que en el cuerpo lúteo <sup>53, 77</sup>. Gutiérrez, et al. (1997) <sup>78</sup>, encontraron que cuando se administra flushing a vacas, utilizando una dieta baja en fibra que aporte el 200 % de sus necesidades de mantenimiento, se estimula un incremento en el número de folículos pequeños independientemente de la concentración de GH. Sin embargo, se observa un aumento en la concentración de insulina en comparación con los animales usados como control, indicando que la participación de la GH en la alteración del desarrollo folicular no es directa. La GH podría actuar a través de respuestas de insulina e IGF-I diferenciadas. Como ya se mencionó, el IGF-I es un potente estimulador de la esteroidogénesis y de la proliferación tanto de las células de la granulosa como de la teca *in vitro*. De la misma forma, la insulina también estimula la proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa y de la teca *in vitro* <sup>29, 79, 80</sup>. En estudios realizados en ovejas se ha encontrado que el uso de GH de origen porcino puede aumentar el número de embriones transferibles cuando se usa junto con protocolos de superovulación con FSH. Sin embargo, no está claro si este efecto se debe un aumento del reclutamiento folicular y tasa de ovulación debido a la GH o a un efecto

directo de esta hormona sobre la maduración del ovocito o por un efecto indirecto sobre el ambiente oviductal <sup>81</sup>.

La GH controla la síntesis de IGF-I hepático, sin embargo, no parece controlar la síntesis de IGF-I ovárico. En ratas, cerdos y ratones se ha observado que la síntesis ovárica de IGF-I es dependiente de GH. En ovejas hipofisectomizadas, la LH incrementó el RNAm para GHr lúteo y la GH incrementó el RNAm para IGF-I lúteo. Sin embargo, hay estudios en los que GH no aumentó la síntesis de IGF-I ovárico *in vitro* o en bovinos intactos. No se ha reportado la síntesis de IGF-I folicular dependiente de GH en ovejas o vacas. Por lo tanto, la IGF-I folicular probablemente no es controlada localmente por GH. En cambio, el IGF-I endocrino, bajo el control de GH, influye la función ovárica a través de su contribución al IGF-I en el líquido folicular <sup>30, 53, 77, 80</sup>.

Aparentemente, la participación de la GH en la reproducción no se realiza de forma directa, esto es por que no se ha encontrado evidencia de que esta hormona tenga suficiente cantidad de receptores en los folículos ováricos como para que esta hormona influya incrementando la prolificidad. Sin embargo, no se puede descartar la participación de la GH en la reproducción pues cuando no existe GH la reproducción se ve disminuida, de hecho, estudios en ratones deficientes de GH han mostrado que la deficiencia de esta hormona puede producir esterilidad <sup>80</sup>. Parece ser que los efectos de la GH sobre el desarrollo folicular de los rumiantes son indirectos a través de la insulina y del IGF-I hepático que puede estimular al IGF-I ovárico.

### **Factores de crecimiento involucrados en la regulación intraovárica del crecimiento folicular**

Se conoce una amplia variedad de factores de crecimiento que se ven involucrados en la regulación del crecimiento folicular, de hecho, cada vez existe más evidencia de que estos factores modulan la foliculogénesis. Los factores de crecimiento son péptidos que pueden

actuar de manera paracrina y/o endocrina y se ven involucrados en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular <sup>30</sup>. Los factores de crecimiento se han clasificado en familias separadas basándose en su estructura y actividad biológica, estas familias incluyen a la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF), la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la familia del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), la familia del factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ) que incluye a la inhibina y activina, y los factores de crecimiento hematopoyéticos o citoquinas. Muchos de los sistemas de señalamiento de los factores de crecimiento intraováricos actúan a través de los receptores de tirosin quinasa que regulan la diferenciación de las células de la granulosa y de la teca de forma coordinada a través de interacciones con los mecanismos estimuladores por gonadotropinas-AMPC. La integración de los mecanismos endocrinos e intraováricos proveen las señales necesarias que pueden estimular el crecimiento folicular o conducir al folículo hacia vías de apoptosis que resulten en atresia folicular <sup>21, 30, 29, 82, 83</sup>.

### **EGF, TGF- $\alpha$ y $\beta$**

En estudios *in vitro* con células de la granulosa bovinas, EGF y TGF- $\alpha$  estimularon fuertemente la proliferación de dichas células pero inhibieron la producción de inhibina y la esteroidogénesis, lo que sugiere que *in vivo*, esos factores deben actuar favoreciendo el crecimiento y retrasando la maduración final de los folículos. Además, experimentos *in vivo* sugieren una posible participación para el EGF en la inducción de atresia. Sin embargo, el hecho de que el EGF sea realmente atretogénico bajo condiciones fisiológicas continua siendo algo cuestionable, puesto que se ha demostrado un efecto apoptótico del EGF en las células de la granulosa de ratas *in vitro*. La acción de los factores de la superfamilia TGF- $\beta$  sobre las células foliculares no está bien entendido. En los rumiantes, TGF- $\beta$  inhibe la proliferación celular y aumenta la esteroidogénesis promovida por

gonadotropinas, lo que sugiere que podría sostener la maduración folicular terminal. Sin embargo, las discrepancias en los resultados obtenidos en diversas especies y entre diversos sistemas de cultivo celular sugieren que el papel del TGF- $\beta$  en la foliculogénesis es más complejo. De manera similar, las acciones paracrinas de los péptidos relacionados con el TGF- $\beta$ , inhibina y activina, aún son especulativas <sup>30, 62, 83</sup>.

### **Sistema activina-inhibina**

La superfamilia del TGF- $\beta$  comprende a diversas proteínas, incluyendo al sistema activina-inhibina, que pueden actuar como reguladores intraováricos. Los RNAm`s que codifican para TGF- $\beta$  se expresan en las células de la teca.

Mientras que la acción de la inhibina es la de inhibir la secreción de FSH, la activina la promueve. Además, la activina participa en la proliferación, diferenciación, esteroidogénesis y luteinización de las células de la granulosa y ha demostrado mantener el desarrollo folicular y prevenir la atresia folicular <sup>49, 62, 63, 83, 84</sup>. La expresión de RNAm para los miembros de la familia inhibina-activina parece ser iniciada de forma secuencial y coordinada durante el desarrollo folicular temprano. En la oveja, la expresión de RNAm para la subunidad  $\beta$ -inhibina-activina, parece ser concomitante con la expresión del FSHr en una o dos capas de células de la granulosa, seguida por la subunidad  $\alpha$ -inhibina y folistatina en dos o cuatro capas de células de la granulosa y finalmente la subunidad  $\beta$ A-inhibina-activina durante el desarrollo antral temprano. Conforme el folículo ovino progresa desde pequeño (<2 mm), a mediano (2-4 mm) y hasta grande (>4 mm) se va dando un incremento progresivo en la expresión de P450c17 en las células de la teca y de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ A-inhibina, LHr y P450arom en las células de la granulosa. En contraste, la expresión para la subunidad  $\beta$ B-inhibina-activina en las células de la granulosa y LHr en las células de la teca permanece relativamente constante. Sin embargo, la expresión de activina-A es predominante en los folículos en crecimiento y

esteroidogénicamente activos, en comparación con los folículos atrésicos <sup>62, 63, 64, 82, 83, 84</sup>. Aparentemente, la diferenciación de las células de la granulosa, de folículos pequeños, estimulada por FSH, resulta en una inducción de inhibina A y estradiol dependiente de dosis. Además, se ha demostrado que la inhibina A modula tanto la producción de estradiol de las células de la granulosa como la producción de andrógenos de las células de la teca *in vitro* <sup>84</sup>. De esta forma, la expresión de la subunidad  $\beta$ A parecería ser un componente esencial de la cascada de diferenciación. De hecho, Fujiwara et al. (2000) <sup>85</sup>, encontraron que el contenido de RNAm para la subunidad  $\alpha$  de inhibina es mayor en los folículos que contienen ovocitos maduros y de mejor calidad para su uso en fertilización *in vitro*, aunque se obtiene mejor calidad embrionaria de los folículos que contienen niveles significativamente menores de RNAm para la subunidad  $\alpha$  de inhibina. En relación con la cantidad de embriones colectados, Gonzalez-Bulnes et al. (2002) <sup>86</sup>, encontraron que los niveles de inhibina pueden afectar la calidad embrionaria en los programas de superovulación, solo si existía un folículo dominante productor de inhibina al momento de iniciar el tratamiento de superestimulación, lo que produce que los demás folículos que llegan a ovular debido al tratamiento, sean folículos en los que ya había comenzado el proceso de atresia <sup>21, 29, 61, 62, 65, 82, 83</sup>.

Shidaifat (2001) <sup>84</sup>, encontró que la activina-A afecta la producción de estradiol y progesterona en las células de la granulosa caprina, en forma dosis-dependiente, bastando 100ng /ml para inhibir la producción de progesterona. La inhibición en la producción de progesterona se correlaciona con una estimulación significativa en la producción de estradiol, que aumenta mientras las células se encuentren expuestas a activina-A. Al parecer, el mecanismo por el cual la activina-A realiza este efecto, incluye una regulación negativa de las principales enzimas esteroidogénicas involucradas en la biosíntesis de progesterona tales como la P450<sub>scc</sub> y la 3 $\beta$ -HSD. La capacidad de la activina-A de inhibir la producción de progesterona por parte de las células de la

granulosa diferenciadas indica un posible bloqueo, por parte de la activina-A, sobre la luteinización de las células de la granulosa diferenciadas <sup>63, 83</sup>.

La inhibina-A parece tener un efecto paracrino en la producción de andrógenos por parte de las células de la teca. Como ya se mencionó, los andrógenos tecales sirven como precursores importantes para la producción de estradiol por parte de las células de la granulosa <sup>62, 63, 64</sup>. En contraste, la activina A inhibe la secreción de progesterona por parte de las células de la teca y de la granulosa y se ha propuesto la participación de la activina en la prevención de la luteinización prematura de las células foliculares de los estados tardíos del desarrollo de los folículos antrales. Sin embargo, lo anterior surge de estudios *in vitro*. In vivo, se cree que los efectos paracrinos de la inhibina y los péptidos relacionados sobre las células foliculares son determinados por la proporción activina:inhibina intrafolicular, la cantidad de proteínas ligadoras de activina (particularmente follistatina) así como las proporciones relativas de las diferentes formas foliculares de inhibina. Además, numerosos estudios *in vivo* muestran que la inmunización de rumiantes contra la subunidad  $\alpha$  de la inhibina estimula el crecimiento de folículos antrales e incrementa la tasa de ovulación, por medio de un mecanismo que involucra un aumento de las concentraciones plasmáticas de FSH <sup>30, 62, 64, 83</sup>.

Puede concluirse que la inhibina es un producto normal del desarrollo y maduración del folículo dominante el cual ejerce un efecto negativo sobre el desarrollo de los folículos subordinados y sobre la competencia de sus ovocitos, además de maximizar la capacidad de su ovocito para su posterior fertilización y desarrollo embrionario, aunque una producción excesiva de inhibina, como podría suceder en los programas de superovulación, puede deteriorar la competencia del ovocito.

### **Regulación endocrina de la esteroidogénesis folicular**

Como ya ha sido mencionado en esta revisión, la maduración que lleva a la dominancia folicular se controla, entre otros factores, por la diferenciación en la expresión de receptores para gonadotropinas en las células de la granulosa hacia una mayor cantidad de LHr. Además de lo anterior, una forma importante de conocer el estado de desarrollo de los folículos es por medio de su capacidad esteroidogénica, misma que ya ha sido descrita en su progresión a lo largo de los eventos sucesivos de las oleadas foliculares. En este apartado solo se pretende hacer un resumen del avance en la capacidad esteroidogénica del folículo, durante la progresión hacia su establecimiento como dominante.

En los folículos de 3 a 8 mm de diámetro, la FSH es la gonadotropina que principalmente estimula el crecimiento de los mismos. Una vez unida a sus receptores en las células de la granulosa, la FSH causa la inducción de actividad aromatasa <sup>87</sup>. De esta forma, las células de la granulosa adquieren la capacidad de producir estradiol, siempre y cuando sean provistas de andrógenos. La FSH también estimula la liberación de folistatina <sup>88</sup>, la cual se une a la activina folicular para contribuir a aumentar la relación inhibina:activina. Finalmente, la FSH reduce la expresión de RNAm para IGFBP-2 <sup>69, 71</sup>, lo cual resulta en un incremento en la cantidad de IGF-I biodisponible que junto con la FSH incrementa la actividad aromatasa.

Cuando los folículos crecen más allá de 8 mm de diámetro, la principal gonadotropina que estimula la continuación de su desarrollo es la LH. El efecto más importante de la LH es estimular la producción de andrógenos por parte de las células de la teca. La inhibina, producida en grandes cantidades por las células de la granulosa, ejerce un efecto paracrino estimulador sobre la producción de andrógenos. Además, las bajas cantidades de activina, junto con las grandes cantidades de IGF-I biodisponible resulta en una proteólisis aumentada de IGFBP-4. Esto resulta en un incremento en la biodisponibilidad

de IGF-I y -II en las células de la granulosa y teca, respectivamente. Dentro de las células de la teca, los IGF's actúan junto con la LH en el aumento de la producción de andrógenos. Dentro de las células de la granulosa, los IGF's incrementan la sensibilidad de la célula a LH. Como consecuencia, la expresión de P450scc aumentará y la 3 $\beta$ HSD aparecerá en las células de la granulosa <sup>89</sup>. La inducción de actividad aromatasa en folículos de 3 a 8 mm seguida de la constante elevación del sustrato progesterona/andrógeno, cuando los folículos alcanzan tamaños mayores de 8 mm, resulta en folículos con un mecanismo esteroideogénico completo <sup>18</sup>.

## **NUTRICIÓN Y REPRODUCCIÓN**

El efecto de la nutrición sobre la programación y expresión de las vías metabólicas que permiten a los animales alcanzar su potencial genético para la reproducción es ampliamente conocido <sup>9</sup>. Se sabe que la disponibilidad de alimentos en el medio ambiente es, al menos parcialmente, responsable de la eficiencia reproductiva de los animales. Las observaciones hechas en fauna silvestre demuestran que la reproducción se realiza durante la época del año en la que hay mayor disponibilidad de alimento. En los trópicos, donde los cambios estacionales en la calidad y disponibilidad de alimento son marcados, la eficiencia reproductiva se ve fuertemente afectada <sup>90, 91</sup>.

Cuando existe un déficit en energía las funciones reproductivas tienen baja prioridad fisiológica al compararlas con las funciones básicas como son la termorregulación, la locomoción, el crecimiento, el mantenimiento celular y la lactación. Por tal motivo, los procesos reproductivos se interrumpen mucho antes de que las funciones vitales se vean comprometidas <sup>7, 90</sup>.

Como ya ha sido descrito en esta revisión, se ha demostrado que el desarrollo del folículo ovárico presenta un patrón de crecimiento en oleadas que se controla principalmente por

un sistema integral de retroalimentación que incluye a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo, a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) secretadas por la hipófisis, y a las hormonas esteroideas (estrógenos, andrógenos y progesterona), así como a algunas proteínas secretadas por el ovario (inhibina, activina y foliculostatina). Dados los diferentes niveles en que se controla la reproducción en los mamíferos, los efectos de una nutrición inadecuada pueden darse en diversos sitios tales como: hipotálamo-hipófisis, ovario, desarrollo folicular, alterando el ambiente uterino <sup>90, 91</sup>.

A pesar de que la manifestación final de los efectos detrimentales de una nutrición inadecuada sobre la reproducción pueda deberse a la pérdida embrionaria, no está claro si la nutrición afecta la calidad del embrión a través de cambios en el ambiente folicular y en el mecanismo de ovulación, a través de alteraciones en la capacidad de desarrollo del ovocito o por cambios ocurridos durante el desarrollo embrionario temprano <sup>91</sup>.

#### **Efecto de la nutrición en la función hipotálamo-hipófisis**

Las concentraciones circulantes de FSH en animales enteros no parecen verse afectadas por los cambios nutricionales. Se ha encontrado que no hay cambios en las concentraciones de FSH en novillas desnutridas, incluso después de que estas hayan perdido el 17% de su peso corporal. Así mismo tampoco se han encontrado diferencias en las concentraciones de FSH entre ovejas con condición corporal alta o baja. Sin embargo, la falta de diferencias en las concentraciones de FSH puede deberse a la regulación ovárica de la secreción de FSH. De hecho, los animales ovariectomizados en buena condición corporal tienen concentraciones circulantes de FSH más altas que aquellos con una condición corporal pobre <sup>90, 91</sup>.

A pesar de que en algunos estudios no pudieron establecerse diferencias en el patrón de secreción de LH en novillas desnutridas, parece haber consenso de que los cambios

significativos en el peso corporal o la disponibilidad de alimento pueden alterar el patrón de secreción de LH. Esto se demostró por primera vez en 1975 y se confirmó en 1996 en trabajos con novillas donde se realizó restricción alimenticia <sup>90</sup>.

En ganado productor de carne se encontró que la condición corporal al parto se relaciona directamente con la frecuencia de pulsos de LH después del destete. Los niveles nutricionales bajos parecen tener poco efecto en vacas con sobrepeso, pero un gran efecto (retardo de 27 días para la ovulación) en vacas con pesos muy bajos, lo que se asocia con una reducción en la frecuencia de pulsos de LH. Canfield y Butler (1990) <sup>92</sup>, observaron en ganado lechero, que las concentraciones medias basales y las frecuencias de pulsos de LH eran mayores al rebasar el equilibrio del balance energético, comparadas con las concentraciones encontradas antes de dicho equilibrio. Consecuentemente, la nutrición parece afectar la secreción hipofisiaria de gonadotropinas y particularmente la frecuencia de pulsos de LH previniendo la maduración final del folículo ovulatorio en potencia <sup>90, 91</sup>.

Sin embargo, en la mayoría de los casos, la hipófisis es capaz de liberar cantidades sustanciales de LH y FSH en respuesta a la estimulación de GnRH. Más aún, la cantidad de LH liberada no cambió cuando novillas en condición corporal inicial alta estaban perdiendo peso. No obstante, en novillas con una condición corporal inicial baja y que estaban perdiendo peso, la respuesta de la LH a la GnRH se redujo. En conjunto, estos resultados indican que la respuesta a la GnRH disminuye una vez que el animal ha alcanzado una condición corporal límite. Lo anterior queda claramente ilustrado con el hecho de que el inicio de la primera oleada folicular en vacas lactando no difiere entre aquellas que se mantienen en un nivel de alimentación bajo (80 MJ) y las que se encuentran en un nivel alto (120 MJ), aunque la primera ovulación se retrasó 25 días en los animales con nivel nutricional bajo. Además, cuando la condición corporal es baja, la síntesis y almacenamiento de gonadotropinas, o la sensibilidad-respuesta de la hipófisis a la GnRH se encuentran reducidas <sup>90, 91</sup>.

Mani et al. (1996) <sup>93</sup>, compararon el efecto de una deficiencia nutricional del 25% en cabras vacías ciclando normalmente, encontraron que la baja nutrición no tiene efecto significativo sobre las concentraciones basales de LH y FSH, pero si se encontró una reducción en el incremento preovulatorio de gonadotropinas y baja incidencia de ovulación. Así mismo la respuesta del aumento preovulatorio de gonadotropinas a la aplicación intravenosa de GnRH, 12 días después del retiro del tratamiento de sincronización con progestágenos, fue menor en las cabras en baja nutrición que en aquellas en nutrición adecuada. Los autores concluyen que la baja nutrición a corto plazo disminuye el desempeño reproductivo al interferir con la liberación de gonadotropinas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Walkden-Brown et al. (1994) , quienes encontraron efectos de la dieta sobre la magnitud de la secreción de LH, sin encontrar efectos sobre la secreción de FSH, relacionándolos con la actividad estacional de las cabras.

Concluyendo, las concentraciones de FSH en los animales enteros parecen no estar influidas por el estado nutricional, y si lo están es en una magnitud muy pequeña, incluso cuando existe una restricción alimenticia prolongada. No obstante, la concentración y la frecuencia de los pulsos de LH parecen disminuir cuando los animales son sometidos a dietas con aporte nutricional menor al óptimo para su especie. En ganado lechero, el grado del déficit energético durante las primeras 2 a 3 semanas post-parto está altamente correlacionado con el intervalo al primer estro <sup>90, 91</sup>.

### **Efecto de la nutrición sobre la función ovárica**

En los ovarios, independientemente del estado reproductivo del animal, siempre se encuentran folículos en todas las fases de desarrollo. El desarrollo folicular se da en un patrón típico de oleadas que se inician con el crecimiento de un grupo de folículos pequeños, de los cuales sólo unos cuantos escapan de la atresia para rebasar los 4-5 mm

de diámetro. Finalmente uno de los folículos de mayor tamaño emerge como dominante. El folículo dominante que esté presente al momento de la regresión del cuerpo lúteo, induce el pico preovulatorio de gonadotropinas, ovula y se luteiniza. Se ha señalado que este patrón normal de desarrollo folicular puede ser alterado por deficiencias nutricionales <sup>90,91</sup>.

En el ganado productor de carne, el diámetro del folículo preovulatorio disminuye cuando los animales pierden peso <sup>95</sup>. Más aún, la reducción en el diámetro folicular se correlacionó positivamente con la pérdida de peso hasta que los animales dejaron de ovular. Existen trabajos en los cuales el folículo dominante disminuye su diámetro, el número de folículos >5 mm no se altera por la pérdida de peso. Sin embargo, la reducción en el número de folículos pequeños pudo observarse en condiciones de desnutrición extrema. En contraste, en novillas que ganaban peso se observó un incremento en el diámetro del folículo mayor. Este folículo también era dominante ya que el número de folículos subordinados se redujo al aproximarse la ovulación <sup>90,91</sup>.

Al comparar dos niveles de alimentación en ovejas, Rhind et al. (1998) <sup>96</sup>, encontraron que un nivel bajo de alimentación se refleja en una mayor cantidad de folículos pequeños que en ovejas con niveles altos de alimentación. Esto se acompañó de una mayor capacidad esteroidogénica de los folículos mayores de las ovejas con niveles altos de alimentación, además encontraron una relación estrógenos:testosterona en los animales con niveles de alimentación bajos, lo que indica que dichos animales tienen menor capacidad aromatasa.

En un trabajo realizado en ovejas, O'Callaghan et al. (2000) <sup>8</sup>, encontraron que las concentraciones de progesterona sérica e IGF-II en el líquido folicular, fue menor en aquellas hembras que recibieron el doble de la energía necesaria en la dieta, 10 días después de la sincronización con progestágenos, comparadas con las que recibieron el aporte de mantenimiento, o menor. Sin embargo, la frecuencia de pulsos de LH fue mayor

en las ovejas con mayor aporte energético. De la misma forma, se observó mayor desarrollo folicular en las ovejas que recibieron el doble del aporte energético de mantenimiento. Las concentraciones de IGF-I en el líquido folicular fueron mayores en las ovejas que recibieron el aporte energético de mantenimiento que en aquellas que recibieron un aporte menor o mayor.

### **Papel de la hormona de crecimiento, insulina e IGF, como mediadores de los efectos nutricionales sobre la reproducción**

Paradójicamente, el tratamiento con hormona de crecimiento bovina (STB) en vacas lactantes incrementa la producción láctea y causa una reducción en el balance energético, mientras estimula un incremento en el número de folículos que alcanzan tamaños mayores, con la subsiguiente reducción en el número de folículos pequeños <sup>97, 90</sup>. La explicación para dicho incremento en el número de folículos que progresan a categorías foliculares de mayor tamaño no se ha aclarado, pero puede deberse a cambios en las concentraciones de hormonas metabólicas y de metabolitos (glucosa, insulina, IGF-1, proteínas ligadoras de IGF), inducidos por la aplicación de STB en los animales lactando. De hecho, trabajos recientes han mostrado que factores que tradicionalmente se creían involucrados en la regulación de procesos metabólicos, tales como la STB, la insulina y el IGF tienen profundos efectos en el desarrollo folicular ovárico en bovinos. Esto puede constituir parte del mecanismo del conocido y poco entendido efecto de la nutrición en la función reproductiva del ganado <sup>90</sup>.

En novillas, la administración de STB incrementa el número de folículos pequeños (<5 mm), sin alterar el número de folículos mayores o la dinámica de recambio folicular. Así mismo, la STB incrementa el número de folículos en la ausencia de cambios en los niveles circulantes de FSH y LH y de la unión de las mismas a las células de la granulosa o de la teca. Igualmente, el tratamiento con STB en vacas lecheras incrementa el número de

foliculos, sin alterar las concentraciones de gonadotropinas <sup>97</sup>. Sin embargo, este aumento se observó en los foliculos de mayor tamaño (>5 mm) <sup>97</sup> y en otros estudios, el recambio folicular se incrementó debido a la atresia temprana del foliculo dominante. Otros estudios demostraron que los foliculos pequeños inducidos por la estimulación de STB pueden responder a la gonadotropina exógena, aumentando la respuesta al tratamiento superovulatorio. Más aún, niveles bajos de STB pueden también afectar el desarrollo folicular. La inmunización activa contra el factor liberador de hormona de crecimiento (GHRH) en animales prepúberes produjo una reducción en las concentraciones de hormona de crecimiento, provocando que solo el 22% de las novillas desarrollaran foliculos mayores a los 7 mm de diámetro, al compararlas con el 77% de las novillas testigo <sup>90, 98, 99</sup>.

Resulta improbable que la STB tenga un efecto directo sobre los ovarios que ocasione el incremento observado en el número de foliculos pequeños, ya que existe evidencia que indica que los foliculos ováricos no poseen receptores para hormona de crecimiento. Además, cuando los animales son alimentados excediendo sus requerimientos nutricionales, las concentraciones de hormona de crecimiento bajan, mientras que las de IGF-1 e insulina aumentan+100. La insulina y/o la IGF-1 parecen entonces ser los mediadores de la acción de la hormona del crecimiento en el ovario. Así mismo, cuando las concentraciones de insulina son bajas en animales desnutridos, se observa una disminución en la capacidad de los receptores para la hormona de crecimiento y un aumento en la resistencia a la misma. La administración de insulina puede revertir este efecto. En contraste, cuando las concentraciones de insulina son altas, en condiciones de sobrealimentación, la producción de IGF se intensifica a pesar de la disminución en la secreción de hormona de crecimiento. Esto se debe probablemente a que la insulina incrementa la capacidad de unión entre la hormona de crecimiento y su receptor. Por otro lado, los niveles altos de proteína en la dieta aumentan la producción de IGF-1 por el

hígado. Sin embargo, durante los periodos de desnutrición, la hormona de crecimiento aumenta mientras que la concentración de IGF-1 decae <sup>90, 100, 101</sup>.

En resumen, los efectos de la administración de hormona de crecimiento sobre el desarrollo folicular están probablemente mediados por cambios en las concentraciones de insulina, IGF-1 o ambos. Es posible que la insulina y/o el IGF-1 actúen alterando la respuesta de las células foliculares a las gonadotropinas, como se ha demostrado en estudios *in vitro* <sup>90</sup>.

Landau et al. (1996) <sup>102</sup>, encontraron, en ovejas alimentadas con diferentes niveles y tipos de proteína, que los cambios en la dinámica folicular generalmente son acompañados por cambios en las concentraciones plasmáticas de insulina y de glucosa. De esta forma encontraron que la insulina se encuentra elevada durante las fases lúteas normales sin importar el estado nutricional ni el tipo de suplementación de las ovejas. Así mismo la insulina sérica se aumentó en las ovejas durante la presentación del estro relacionando esta observación con la alimentación con proteína de baja degradabilidad en el rumen. Las observaciones de el estudio mencionado también confirman las realizadas por otros autores en relación con la relación de las concentraciones de insulina con el rápido desarrollo folicular (a >2mm de diámetro y mayor tamaño en folículo ovulatorio) y la presentación de una luteólisis normal.

Rahul Behl y Pandey (1999) <sup>103</sup>, encontraron que la administración de IGF-1 a cultivos de células de la granulosa de caprino, estimula la secreción de estradiol y progesterona sin importar el tamaño de los folículos de los cuales fueron obtenidas, aunque el efecto mencionado fue mayor en las células de los folículos más grandes. Así mismo, la acción conjunta del IGF-1 y la FSH estimularon la esteroidogénesis por parte de las células de la granulosa. Una de las conclusiones del estudio mencionado fue que la biosíntesis de estrógenos y progesterona, por parte de las células de la granulosa, es regulada diferenciadamente por el IGF-1 dependiendo del tamaño de los folículos de los cuales se

obtienen dichas células. Lo anterior indica que para que haya cambios en el patrón de desarrollo folicular, no son esenciales los cambios en las concentraciones circulantes de gonadotropinas. También se ha demostrado que la expresión de RNAm para IGFBP no existió en los folículos grandes (>8mm) dependientes de gonadotropinas, que la FSH inhibe la expresión del RNAm para IGFBP-2 en células de la granulosa y que la LH estimula la expresión del RNAm para IGFBP-4 en las células de la teca <sup>71</sup>.

Driancourt y Disenhaus (1997) <sup>104</sup>, encontraron que la administración de hormona de crecimiento a cabras lactando aumentó la producción de leche y las concentraciones circulantes de IGF-1. En contraste, no hubo efecto de la administración de la hormona de crecimiento sobre la población total de folículos antrales, su atresia, el número de folículos en las diferentes etapas de desarrollo, ni sobre el tamaño de los folículos ovulatorios saludables o atrésicos. Además, la producción de estradiol y testosterona de los folículos mayores en respuesta a eCG tampoco se afectó por el tratamiento con hormona del crecimiento. Los autores concluyeron que la administración de hormona de crecimiento a cabras lactantes, mientras incrementa la producción láctea, no tiene efectos sobre la función ovárica.

Recientemente se ha establecido una asociación entre el aumento en el consumo alimenticio y el incremento en el reclutamiento de folículos pequeños durante la primera oleada de desarrollo folicular en el ciclo estral de novillas <sup>78</sup>. Este incremento se perdió tan pronto como los tratamientos alimenticios terminaron. El número de folículos medianos incrementó en todos los grupos al momento que el número de folículos pequeños disminuyó. En conjunto, los resultados anteriores indican que la nutrición parece afectar principalmente al reclutamiento de folículos pequeños y no al proceso de selección y dominancia <sup>90</sup>.

### **Nutrición y tasa de ovulación**

La capacidad de la nutrición para alterar la tasa de ovulación y de nacimientos en ovejas es ampliamente conocida, siendo usualmente acompañado de un incremento rápido de la condición corporal <sup>105</sup>. Las modificaciones en la tasa de ovulación en animales mantenidos bajo un alto nivel de nutrición, pueden deberse a un aumento de la entrada de glucosa en las células. A lo largo del tiempo se ha comprobado que tanto los suplementos altos en energía, como los altos en proteína, son capaces de incrementar la tasa de ovulación en ovejas <sup>7</sup>.

Scaramuzzi et al. (1993) <sup>106</sup>, sugirieron que las alteraciones en la tasa de ovulación generalmente ocurren cuando la duración de la “ventana” de tiempo en la cual los folículos dependientes de gonadotropinas son viables se incrementa o cuando hay un incremento en la tasa de oferta folicular sin ningún cambio en la duración de dicha “ventana”. En el caso de las respuestas ovulatorias a la nutrición, pueden operar elementos de ambos mecanismos <sup>6</sup>. Por la vía de sus efectos sobre el control de la retroalimentación hormonal del control de secreción de gonadotropinas, la nutrición puede, por una parte, alterar el nivel y duración de la exposición a FSH de los folículos dependientes de gonadotropinas. Por otra parte y puesto que los efectos de la nutrición sobre las concentraciones circulantes de FSH permanecen inciertas, también se ha sugerido que los nutrientes (glucosa, aminoácidos) y sus metabolitos (insulina, hormona del crecimiento, las IGFs y sus proteínas ligadoras) que han sido involucrados con la respuesta ovulatoria a la nutrición, pueden operar al nivel del ovario disminuyendo la cantidad de FSH necesaria para mantener a los folículos dependientes de gonadotropinas <sup>5</sup>. En relación con el mecanismo ovárico de retroalimentación hormonal, el  $17\beta$ -estradiol puede desempeñar un papel importante en la mediación de los llamados efectos nutricionales, puesto que su aumentada excreción fecal en ovejas bien alimentadas

conduce a reducir las concentraciones plasmáticas circulantes y una asociada reducción en la retroalimentación de estradiol que podría aumentar la tasa de ovulación <sup>6</sup>.

Downing et al. (1995) <sup>7</sup> sugirieron una acción directa en el ovario al incrementar la disponibilidad de glucosa. El aumento simultáneo de la insulina plasmática también se observó cuando la tasa de ovulación fue incrementada tanto por una infusión intravenosa de glucosa <sup>107</sup> ó de leucina, isoleucina y valina <sup>108</sup> por 5 días durante la fase lútea tardía del ciclo estral. Utilizando el modelo de autotransplante de ovario, se ha demostrado que mientras las infusiones de glucosa o insulina solas no tienen efecto en la secreción de esteroides por parte del ovario, su infusión combinada disminuye la secreción de androstenediona y estradiol en respuesta a un pulso de LH, nuevamente involucrando la retroalimentación alterada de esteroides en la respuesta ovulatoria <sup>6</sup>. Landau et al. (1995) <sup>109</sup>, en un intento práctico de suplementación de glucosa, encontró que la administración diaria de 100 g de almidón no degradable en el rúmen, incrementa la tasa de ovulación en hembras portadoras del gen FecB pero no en las no portadoras de dicho gen, sugiriendo que un rasgo importante de las respuestas ovulatorias a la suplementación nutricional podría ser el potencial de ovulación individual.

Mani et al. (1992) <sup>110</sup>, encontraron que la baja nutrición aumenta el tiempo de presentación del estro después de la sincronización, además de disminuir la tasa de ovulación, aumentar la pérdida embrionaria y, por lo tanto, disminuye la fertilidad. A pesar de lo anterior Goonewardene et al. (1997) <sup>111</sup>, encontraron que el aumento en el aporte dietético de nutrientes (10 a 20 % mayor que las necesidades de mantenimiento) no influyeron en el desempeño reproductivo de cabras aún cuando éstas presentaron pérdida de peso antes de la inseminación artificial, ellos concluyen que las variaciones en el desempeño reproductivo tiene una mayor influencia individual y de raza, aunque en el estudio mencionado no se evaluó el efecto de la baja nutrición ni de el aumento en la densidad energética y proteica de la dieta antes de la monta.

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

La tasa de ovulación depende del número de folículos activados capaces de responder a la LH cuando disminuyan las concentraciones de FSH. Se ha propuesto que los mecanismos por los cuales el flushing influye sobre la tasa ovulatoria es el aumento de la oferta de folículos capaces de responder a gonadotropinas resultando en un incremento en el número de folículos activados al momento del pico preovulatorio de LH.

El incremento de la tasa ovulatoria repercute directamente en un incremento en la prolificidad, la cual se define como el número de crías que pare una hembra durante la época reproductiva. Como ya se mencionó la tasa de ovulación en ovinos y caprinos varía de 1 a 4, pero la prolificidad promedio es de 1 a 1.5 pues no es posible que lleven a término gestaciones de 4 corderos. Sin embargo los pequeños rumiantes tienen la capacidad de criar de manera eficiente 2 productos, por lo que la tendencia es de aumentar la prolificidad a 2 por medio de métodos que incrementen la tasa de ovulación a 3 <sup>112</sup>. Existen diversos métodos que permiten incrementar la tasa ovulatoria, los cuales se han dividido en métodos farmacológicos y métodos naturales.

### **Administración de gonadotropinas**

La base de la administración de gonadotropinas para aumentar la tasa ovulatoria es que durante el desarrollo final del folículo existe una etapa de dominancia, durante la cual el folículo dominante produce y libera inhibina con la finalidad de bloquear la producción de FSH hipofisiaria que los folículos subordinados requieren para seguir creciendo. En este momento, sucede el pico preovulatorio de LH para que el folículo dominante ovule mientras los folículos subordinados sufren atresia. La administración exógena de alguna

hormona con efecto de FSH durante estos momentos del desarrollo folicular va a permitir que los folículos subordinados sigan creciendo y lleguen a ovular <sup>112</sup>.

Las gonadotropinas exógenas que pueden ser utilizadas son la FSH y la eCG, ambas hormonas producen un efecto estimulador sobre los folículos, aumentando la tasa ovulatoria. Entre las ventajas de la eCG sobre la FSH se encuentran que la primera es de vida media larga, mientras que la FSH (extracto hipofisiario, porcino u ovino) tiene una vida media muy corta, por lo que se tendrá que administrar en varias dosis, y la eCG requiere sólo una aplicación, por lo que el uso de la eCG se encuentra más difundida.

La administración de eCG requiere de una sincronización previa del estro, la eCG puede ser aplicada durante los dos últimos días de la sincronización. Esta hormona se puede utilizar durante en la época reproductiva o durante el anestro. Cuando se utiliza durante la época reproductiva la sincronización previa podrá realizarse mediante la administración de progestágenos o prostaglandinas, mientras que durante el anestro se deberá realizar la inducción del estro utilizando progestágenos (esponjas vaginales, administración oral o en implantes subcutáneos). La dosis de eCG utilizada es de 200 UI por vía intramuscular o subcutánea, esta dosis debe manejarse cuidadosamente pues la aplicación de una dosis excesiva (de 400 a 750 UI) puede causar superovulación, lo cual no es deseable si no se tiene previsto un programa de transferencia de embriones, y puede producir la parición de tres o más crías demasiado pequeñas las cuales tendrán pocas posibilidades de sobrevivir <sup>1, 112, 113</sup>. La eCG presenta la desventaja de que, al ser un producto natural, su composición química y actividad varía entre los lotes comerciales, por lo que pueden obtenerse resultados variables entre tratamientos <sup>113</sup>.

### **Inmunización contra hormonas esteroideas**

Cómo ya se mencionó, la oveja es una especie poliovulatorias, con la tasa de ovulación determinada por el equilibrio entre los efectos estimuladores de gonadotropinas y el efecto

de la retroalimentación negativa de las hormonas ováricas (esteroides e inhibina) sobre la liberación de dichas gonadotropinas <sup>114</sup>. Una modificación en este mecanismo de retroalimentación puede ser un método efectivo para incrementar la prolificidad de las ovejas. La inmunización pasiva contra estradiol o estrona ha mostrado cambios en el balance endocrino, resultando en un incremento de la tasa de ovulación y en partos gemelares en ovejas. La inmunización contra esteroides parece tener ventajas sobre los tratamientos basados en la administración de gonadotropinas, pues la inmunización contra esteroides aumenta la incidencia de ovulaciones dobles o triples y no resulta en efectos de superovulación <sup>115</sup>.

La inmunización contra esteroides se realiza por vía subcutánea 5 semanas antes de la monta o inseminación artificial, seguida de una segunda aplicación 2 semanas antes del servicio. Los efectos de la inmunización persisten por varias semanas y la inmunización para la siguiente época reproductiva requiere una sola administración. Una gran ventaja de la inmunización contra esteroides es que su efecto estimulador sobre la tasa de ovulación no requiere de sincronización previa del estro. El uso de esta técnica de inmunización no se recomienda en razas prolíficas ni en animales con baja condición corporal, pues en los segundos la respuesta será muy pobre o nula <sup>112, 116</sup>.

La inmunización activa contra esteroides (principalmente androstenediona) ha demostrado su efecto benéfico sobre la tasa ovulatoria en una proporción de 0.37 a 1.17 sobre el promedio normal, y sobre el tamaño de camada en 1.25 a 1.63 sobre el promedio normal, además de no afectar el peso de las crías al nacimiento, la tasa de crecimiento de las mismas, ni la presentación de la pubertad <sup>116</sup>.

En general, durante la práctica de la administración de antisueros contra esteroides se han obtenido resultados variables, mientras que Scaramuzzi, et al. (1980) <sup>117</sup> informaron que la administración de antisueros contra esteroides resultó en la presentación de ciclos irregulares y de anestro en el 80% de las ovejas tratadas; Roberts y Reeves (1980) <sup>118</sup>,

informaron que la inmunización pasiva contra estrógenos era un método efectivo para incrementar la incidencia de partos gemelares, pero la diferencia de este parámetro entre las cabras tratadas y las no tratadas no fue significativa. Por otra parte, los resultados de Land et al. (1982) <sup>115</sup> si tuvieron diferencia significativa en el parámetro antes mencionado, siendo este mayor en las ovejas inmunizadas. Las diferencias entre los resultados de los trabajos mencionados parecen deberse a la concentración de los títulos de anticuerpos administrados a los animales, la cual fue excesiva en el trabajo de Scaramuzzi et al. (1980) <sup>117</sup>, con las consecuencias mencionadas, mientras que la utilizada en el trabajo de Land et al. (1982) <sup>115</sup>, fue la más alta de estos tres y la utilizada por Roberts y Reeves (1988) <sup>118</sup>, fue la menor de los tres trabajos pero, aunque efectiva, el efecto no fue significativo.

### **Inmunización contra inhibina**

En la hembra, la inhibina es secretada predominantemente por las células de la granulosa bajo el control de FSH <sup>49, 119, 120, 121</sup>, y ejerce un control por medio de retroalimentación negativa selectiva sobre la secreción de FSH. Existen diversos estudios que han demostrado que la inmunización contra inhibina o contra péptidos sintéticos de la región carboxilo de la subunidad alfa de la inhibina puede alterar o interrumpir dicho mecanismo de retroalimentación, incrementando así las concentraciones sanguíneas de FSH y, por lo tanto la tasa de ovulación en ovejas <sup>122, 123</sup>, cerdas y vacas <sup>124</sup>. La inhibina puede afectar el patrón de crecimiento folicular y la tasa de ovulación por medio de efectos, tanto sistémicos como locales dentro del folículo. La inmunización de vaquillas contra la fracción  $\alpha$  1-26 de la inhibina ha demostrado incrementar las concentraciones de FSH y el número promedio de folículos mayores de 5 mm durante el ciclo estral. En este sentido, el título de anticuerpos utilizado no tiene un efecto significativo sobre las concentraciones circulantes de FSH, como sucede en el caso de la inmunización contra

hormonas esteroides. Esta divergencia entre el incremento selectivo de las concentraciones de FSH durante la fase folicular y el incremento diario total de folículos durante el ciclo estral sugieren que los mecanismo de acción de la inmunización contra inhibina son tanto endocrinos como locales <sup>49, 124, 125, 126</sup>. Existen también algunos informes que indican que no hay ningún efecto estimulador sobre la tasa de ovulación de animales, inmunizados particularmente cuando se han usado péptidos sintéticos contra la región amino de la subunidad alfa en ovejas inmunizadas. Pero trabajos como el de Anderson et al. (1998) <sup>127</sup>, comprueban que la inmunización contra los péptidos sintéticos de la inhibina resulta en un aumento considerable de la tasa ovulatoria. En este trabajo se logró aumentar al doble la tasa de ovulación al administrar una sola dosis de inmunización y de tres a cinco veces cuando se administró un refuerzo de inmunización un mes después y estos valores perduraron hasta un año después de la segunda inmunización. Aunque la variación de los resultados que produce la inmunización contra inhibina sobre la respuesta ovárica entre animales y entre los ciclos individuales es amplia, este procedimiento ha sido identificado como una herramienta potencial para regular la fertilidad de las especies domésticas, particularmente aquellas de baja prolificidad como las vacas y los pequeños rumiantes <sup>126</sup>, sin embargo su uso para dicho fin aún no está tan difundido como el uso de la inmunización contra esteroides <sup>112</sup>.

### **Efecto macho**

Tanto en la oveja, como en la mayoría de las especies, la receptividad sexual hacia el macho se encuentra limitada a un periodo corto, conocido como estro, cercano al momento de ovulación; este periodo de aceptación no se presenta durante la fase lútea, el anestro o durante la gestación. Esto demuestra que, a diferencia de los machos, la conducta sexual de las hembras es específicamente dependiente de hormonas y que la secreción y acción de las hormonas son el detonante para la manifestación de la conducta

sexual de la hembra. Algunas variaciones ambientales, como la presencia del macho, pueden ser también percibidos como un estímulo, pero no son capaces de mantener la conducta sexual por sí solos, aún realizando un entrenamiento regular. Como consecuencia, en especies de reproducción estacional, la estación reproductiva es más marcada en las hembras que en los machos <sup>1, 132</sup>.

El comportamiento estral no es un fenómeno simple. Se ha establecido que además de la aceptación de la monta (receptividad), la oveja y la cabra muestran una atracción hacia el macho. La cuantificación de estos dos criterios determina el inicio y terminación de la conducta estral en las hembras cíclicas y el inicio y fin de la época reproductiva en hembras estacionales <sup>1</sup>.

Durante los pasos que caracterizan el comportamiento sexual en animales libres, existe una fuerte interdependencia entre el comportamiento sexual del macho y de la hembra. Durante el primer contacto entre ambos sexos, el papel activo de la hembra es importante. Además, en el intercambio de información sensorial, la hembra expele sustancias químicas que resultan atractivas para el macho. Sin embargo, el macho parece ser menos atraído por la hembra que la hembra por el macho (proceptividad). Esta atracción, la cual puede ser percibida aún sobre distancias relativamente grandes, es debida principalmente a un agudo sentido del olfato. La hembra en estro se muestra sensible al olor del macho y responde al cortejo del macho mostrando inmovilidad, la cual es esencial para la realización de la monta <sup>1</sup>.

Actualmente se sabe que el macho es capaz, por su propia presencia entre las hembras, de reiniciar la actividad ovulatoria y estral de las hembras anéstricas o de sincronizar el estro de las hembras en época reproductiva. Dicho fenómeno es conocido como el efecto macho <sup>1</sup>. Este efecto se observó por primera vez en ovejas por Underwood et al. (1944) <sup>129</sup>, quienes encontraron que las ovejas presentaban una época de anestro durante la primavera y el inicio del verano cuando los machos eran mantenidos todo el tiempo en

contacto con las hembras. En cambio, cuando los machos fueron separados de las hembras por algunas semanas y después fueron integrados nuevamente al rebaño, la actividad reproductiva de las hembras era inducida lo cual se tradujo en un adelanto de la época reproductiva.

La distribución no uniforme de partos en el inicio de la época reproductiva en las hembras de los pequeños rumiantes domésticos es un fenómeno que ha atraído mucha investigación recientemente. En la oveja, existe una relación clara entre la fecha del año en que se introdujeron los machos y los nacimientos colectivos de los corderos, sugiriendo que las montas ocurren alrededor de 20 y 25 días después de que se juntaron a las hembras con los machos. En las cabras, se observan dos picos de concepción después de la introducción de los machos en el inicio de la época reproductiva; el primero es alrededor de 7 y 11 días y el segundo alrededor de 27 y 35 días después de la introducción de los machos <sup>1, 132, 130</sup>.

La introducción de machos entre hembras anovulatorias después de un periodo de al menos 3 semanas de segregación total (olfato, vista y tacto), induce una ovulación sincronizada en los días siguientes. El contacto con los machos produce en las hembras, un incremento inmediato del número de pulsos de LH, los cuales conducen a un pico preovulatorio de LH y finalmente a la ovulación. La mayoría de las hembras ovulan dentro de las 50 primeras horas después del primer contacto con el macho <sup>1, 131</sup>.

Las Ovejas y las cabras durante la época reproductiva, o durante la estación de anestro, pueden ser sincronizadas y estimuladas a ovular por medio de la introducción de sementales, si han sido previamente aisladas de ellos por al menos tres semanas. Para lograr este efecto pueden utilizarse machos vasectomizados o hembras tratadas con testosterona y deben usarse al menos a una tasa del 4%. Cuando se utiliza este método para la inducción del estro, la sincronización puede ser baja, por lo que debe tenerse especial cuidado en la detección de estros <sup>1, 112</sup>.

La mayoría de las hembras ovulan dentro de los primeros tres días después de la introducción de los machos, sin embargo, la ovulación no siempre es acompañada por signos de estro en las cabras. Sin embargo, tanto en las ovejas como en las cabras, la primera ovulación generalmente es seguida por un ciclo corto que dura de 5 a 6 días; las ovejas muestran un estro fértil solo después de que completan un ciclo ovulatorio de duración normal, mientras que las cabras son fértiles desde su segunda ovulación. Por lo anterior, el periodo de estro ocurre a los 15 días después de la introducción de los machos en las ovejas y 6 días después en la cabra <sup>1, 132</sup>.

El tratamiento de las hembras con progesterona o con un progestágeno justo antes de la introducción del macho incrementa la eficiencia de éste método pues provoca la desaparición completa de los ciclos cortos e incrementa el índice de fertilidad. Realizando éste manejo, la mayoría de las hembras podrán ser inseminadas de 2 a 3 días después de la introducción de los machos cuando la esponja con el progestágeno es empleada, por 19 días en ovejas y 23 días en cabras, después de la aplicación de una dosis intramuscular de 20 mg de progesterona en el momento de la introducción del macho (o pocos días después). La inyección de progesterona puede producir un incremento significativo en el número de crías nacidas por hembra si se compara con el uso del efecto macho solo. La combinación del efecto macho y el uso de esponjas con progestágenos resultan en un incremento significativo de la tasa de ovulación al primer estro y en la prolificidad comparándolo con el efecto macho solo <sup>1, 132, 112</sup>.

### **Sobrealimentación previa al apareamiento o flushing**

El efecto de la nutrición sobre los parámetros reproductivos se conoce desde tiempos inmemoriales, pero fue en 1899 cuando se publicó el primer informe científico al respecto, en el que se reporta que las ovejas más pesadas y las mantenidas bajo regímenes

alimenticios altos muestran una mayor proporción de partos gemelares <sup>132</sup>, desde entonces han sido publicados infinidad de reportes similares. La mayoría de las investigaciones condujeron a la conclusión de que periodos cortos de sobrenutrición antes del apareamiento era suficiente para incrementar la proporción de nacimientos gemelares <sup>5</sup>. En un principio, los estudios fueron realizados basándose en los cambios en la condición corporal y el número de partos gemelares, en este sentido, Coop (1962) <sup>133</sup>, encontró que por cada 4.5 kg de peso adicionales, el porcentaje de partos gemelares aumentaría en 5.3 %. Posteriormente, los estudios incluyeron la determinación de la tasa de ovulación, y Morley et al. (1978) <sup>134</sup>, encontraron que por cada kilogramo de incremento en el peso corporal, la tasa de ovulación se incrementaría entre 1.5 y 2 %, lo que incrementaría el número de corderos nacidos por oveja. Sin embargo, esto no debe considerarse una regla general, más bien es una fuente de variación para la respuesta al flushing, pues cuando se tienen ovejas en buena condición corporal estas tienen tasas de ovulación altas y se encuentran cercanas a su potencial genético máximo para dicho parámetro. El mantener a las hembras en buenas condiciones corporales, mantendrá altas tasas de ovulación constantes y, por regla general, se acepta que el máximo beneficio del flushing se obtiene en hembras en condición corporal moderada. De esta forma, se ha demostrado que el cambio de condición corporal de 1.5 a 2 incrementa la tasa ovulatoria, mientras que no existen diferencias entre animales en los que se incrementa la condición corporal de 2 a 2.5 <sup>5,6</sup>.

Desde aquellos primeros estudios, el efecto flushing ha sido ampliamente estudiado. Existen publicaciones en diversas especies animales, donde se ha tratado de encontrar la duración óptima de este manejo nutricional para obtener buenos resultados. En este sentido, puede encontrarse una gran variedad de trabajos donde han sido necesarios desde 56 días de flushing <sup>111</sup>, hasta trabajos en los que bastaron 6 días de tratamiento para obtener un aumento significativo en la tasa de ovulación <sup>135</sup>. Cabe mencionar que

dentro de la gran variedad de experimentos, se ha buscado hacer más efectivo el efecto del flushing por medio de su combinación con otros manejos encaminados a aumentar la tasa de ovulación tales como el efecto macho <sup>135</sup>, la administración de gonadotropinas <sup>109</sup> y la inmunización contra hormonas esteroides <sup>136</sup>. Además de que también se ha buscado influir en el desarrollo de los folículos ováricos por medio del inicio del flushing en los momentos cercanos al reclutamiento de la oleada folicular que contendrá al folículo ovulatorio. De esta forma, los tratamientos han iniciado en los días 10 <sup>135</sup> y 6 antes del estro <sup>137</sup>, o de los días 2 a 13 del ciclo estral en ovejas <sup>7</sup>. Entre los trabajos publicados puede observarse la tendencia a hacer más corta la duración del flushing, como consecuencia se encuentra el uso de una amplia variedad de técnicas de alimentación, que van desde el aumento en la cantidad de alimento consumido hasta el uso de diferentes tipos de ingredientes y tratamientos de los mismos encaminados a mejorar su asimilación dentro del tracto digestivo, o la simple suplementación con concentrados sobre la dieta habitual de los animales. De esta forma se pueden mencionar los trabajos de Gutiérrez et al. (1997) <sup>78</sup> en vacas y de Goonewardene et al. (1997) <sup>111</sup> en cabras, en los que se alimentó a los animales experimentales en diferentes niveles por arriba de sus necesidades de mantenimiento, observando consecuencias positivas de este manejo en el desarrollo folicular y en la tasa de ovulación. En cuanto a los ingredientes utilizados se encuentran el maíz, entero o extruido, la harina de soya, la harina de gluten de maíz y el grano lupin. El uso de estos ingredientes se ha realizado solo o en combinación, y en la mayor parte de los trabajos se comparan unos contra otros. Los resultados de las experimentaciones con diferentes ingredientes y tratamientos de los mismos son variados, esta forma existen trabajos en los se obtienen efectos positivos sobre la tasa de ovulación con harina de gluten de maíz <sup>138</sup>, con harina de soya <sup>139, 140</sup>, maíz extruido <sup>109</sup> y grano lupin, siendo este último ingrediente el que ha dado los mejores resultados en tratamientos que van desde 6 semanas a 6 días de duración <sup>7, 135, 136, 137</sup>.

El grano lupin es un suplemento alto en energía y proteína disponibles, el cual puede ser administrado a ovejas para incrementar la tasa de ovulación. Los primeros estudios acerca de este grano mostraron que la suplementación utilizándolo incrementó la tasa de ovulación y la prolificidad. Los suplementos basados en el grano lupin dados a las ovejas pastando en praderas de baja calidad o de rastrojo de trigo, aumentan la tasa de ovulación y esta respuesta está correlacionada positivamente con el nivel de suplementación <sup>5, 100</sup>. Existen numerosos estudios donde se ha evaluado el efecto de la suplementación con grano lupin, tal es el caso de el realizado por Nottle et al. (1997) <sup>135</sup>, en el que encontraron que la suplementación con grano lupin durante 10 días produce aumento en la tasa de ovulación, siendo éste mayor en las hembras que se encontraban en menor condición corporal al momento de realizar la suplementación. Esto, además de confirmar el efecto de la suplementación con grano lupin sobre la tasa de ovulación, confirma lo mencionado anteriormente en relación con que la respuesta al flushing es mayor en animales en baja condición corporal. Así mismo, Downing et al. (1995) <sup>7</sup>, demostraron que la suplementación con grano lupin incrementa la tasa de ovulación, sin estar asociada con cambios significativos en las concentraciones de LH ni FSH, además dicha suplementación no afectó las concentraciones plasmáticas de la hormona de crecimiento, pero si incrementó sustancialmente las concentraciones de insulina, lo que sugiere que, como se menciona anteriormente, un incremento en el aporte de glucosa al folículo media los incrementos en la tasa ovulatoria debidos a la nutrición.

Se han realizado estudios sobre el efecto de la administración de proteínas y aminoácidos sobre la tasa de ovulación. De esta forma se ha encontrado que las fuentes de proteína afectan la dinámica folicular, siendo la proteína de buena calidad la que produce mejor respuesta en cuanto al número de folículos (reclutamiento) y su diámetro cuando se incrementa el aporte proteico de la dieta, y también se observa un incremento en la insulina plasmática a los cuatro días después del inicio del la suplementación <sup>102</sup>. De la

misma forma, se ha observado un efecto positivo sobre la tasa de ovulación y la prolificidad cuando se usan proteínas de baja degradación ruminal, sin embargo, se observa que cuando se utiliza este tipo de suplementación no existe relación entre las concentraciones plasmáticas de insulina y la tasa de ovulación <sup>109</sup>. Downing et al. (1995) <sup>108</sup>, encontraron que la infusión de leucina, isoleucina y valina incrementó la tasa ovulatoria sin tener efecto sobre la concentración de LH y FSH, pero si incrementó la insulina plasmática, además se observó un aumento en la urea sanguínea, lo que sugiere que esos aminoácidos incrementan el aporte de energía al folículo. Se observa también un incremento en la captación de glucosa mediada por insulina por parte del folículo, lo cual podría ser la causa del incremento en la tasa de ovulación. Estos efectos de la nutrición sobre la ovulación podrían ser mediados, según los autores, por el componente que representa la capacidad de los animales para utilizar éste tipo de aminoácidos para el metabolismo de la energía <sup>141</sup>.

El flushing incluye dos procesos, en primer lugar un incremento en el consumo de nutrientes, así como un incremento en el nivel de consumo y/o consumo de mejor calidad y, en segundo lugar, un incremento en la condición corporal como consecuencia de dicho aumento del consumo. El efecto de la nutrición en los procesos reproductivos debe considerarse en términos del estatus nutricional neto de la oveja, un término que conjunta tanto las fuentes endógenas como las exógenas de los nutrientes disponibles para las hembras. Si se consideran en esos términos, los cambios en la reproducción asociados con las influencias nutricionales pueden relacionarse con los cambios metabólicos mayores. Dichos cambios son consecuencia del decremento o incremento del consumo alimenticio y el asociado uso o almacenamiento de los nutrientes en reservas corporales <sup>5,6</sup>.

Como ya se mencionó, se sabe que el incremento en el consumo produce un aumento en el reclutamiento folicular en vacas, lo cual se ha asociado con un incremento en la

insulina circulante, sin observar cambios en la concentración de hormona de crecimiento ni de IGF-I <sup>78</sup>. En estudios en los que se ha administrado glucosa por vía endovenosa, se observó un incremento en la tasa de ovulación, sin encontrar aumento en la secreción de LH, pero con aumento en la secreción de FSH durante la mitad de la fase folicular, en éste trabajo, tampoco se encontró aumento de la hormona de crecimiento, pero si se encontró aumento en la concentración de insulina <sup>107</sup>. O'Callaghan et al (2000) <sup>8</sup>, encontraron que, al administrar a las ovejas raciones alimenticias de hasta dos veces las necesidades de mantenimiento, se aumenta el número de folículos mayores de 3 mm y, por lo tanto, la tasa ovulatoria, este manejo tampoco aumentó las concentraciones circulantes de IGF-I. Así mismo, la baja nutrición disminuye el número y diámetro de folículos disponibles al momento de la ovulación <sup>9</sup>. Como se mencionó anteriormente, parece ser que la influencia de la insulina se realiza por medio de los IGF's y sus proteínas ligadoras, pero los efectos de dichos factores parecen ser intrafoliculares y esa puede ser la causa de no se encuentren aumentados en la circulación general de animales inducidos a aumentar su tasa ovulatoria por medio de la nutrición.

Gutiérrez et al. (2000) <sup>11</sup>, encontraron que la administración oral de glicerina durante seis días aumenta la tasa ovulatoria, acompañado de un aumento en la concentración de glucosa sanguínea. En vacas se ha usado el propilenglicol para el manejo de las enfermedades metabólicas postparto y en un estudio realizado por Miyoshi et al. (2001) <sup>142</sup>, encontraron que, cuando se administra propilenglicol diariamente a vacas desde el día 7 hasta el 42 de lactación, aumenta la tasa de concepción, adelanta la primera ovulación y alarga la duración de la primera fase lútea postparto, esto acompañado de un aumento en las concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas. Sin embargo el aumento en la tasa de concepción no fue significativo y los días a primer servicio, los días abiertos y el número de servicios por concepción no se vieron disminuidos por el tratamiento.

Como se mencionó anteriormente, esta ampliamente demostrado que el incremento en la tasa ovulatoria no es debido a un incremento en las gonadotropinas hipofisarias durante el flushing. La concentración de glucosa y de insulina se aumenta durante el estímulo nutricional y son capaces de incrementar el desarrollo folicular y de aumentar la tasa ovulatoria al administrarlas directamente, aunque la infusión directa de glucosa e insulina al ovario no resulta en un incremento de la tasa ovulatoria, y esto es más notorio en animales en buena condición nutricional pues se encuentran casi en su estado nutricional/reproductivo máximo <sup>143</sup>. Boden et al. (1996) <sup>144</sup>, demostraron que cambios drásticos en la concentración de glucosa e insulina regulan la variación en los niveles de leptina, por lo que es posible que la leptina esté involucrada en el incremento de la tasa ovulatoria observada durante el flushing. Aunque se sabe que la leptina es un indicador del estado nutricional y que su influencia en la reproducción la ejerce principalmente a mediano plazo por medio de la regulación del apetito <sup>145</sup>. Actualmente es más ampliamente aceptado que los efectos nutricionales son mediados de forma importante por la glucosa a través de la insulina así como por la acción de los IGF's a nivel intrafolicular.

Aparentemente, la suplementación nutricional a corto plazo tiene que ver directamente con el reclutamiento folicular y, probablemente con el crecimiento de los folículos <sup>78</sup>. De hecho, es probable que la estimulación nutricional en momentos cercanos al reclutamiento y la selección folicular permita un mayor desarrollo de folículos ováricos hasta el estado preovulatorio, permitiendo así la existencia de una mayor cantidad de folículos listos para ovular al llegar el momento de la luteólisis. Una estimulación de este tipo puede lograrse con la administración de soluciones glucogénicas en tratamientos que pueden ser tan cortos como una sola dosificación oral.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo está compuesto por 5 experimentos realizados entre los años 2001 y 2002. Los experimentos fueron realizados durante la época reproductiva en el módulo de producción ovina “El ceniztle” perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Ubicado en el kilómetro 5.5 de la carretera Martínez de la Torre - Tlapacoyan, en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. Se encuentra a 151 msnm en 19° 50' de latitud norte y 97° 1' de longitud oeste, con clima de trópico húmedo con precipitación pluvial anual de 1980.7 mm y temperatura promedio anual de 23.8° C (Af (w)).

Las ovejas fueron mantenidas bajo un esquema de producción extensivo basado en un sistema de pastoreo rotacional en praderas con zacate insurgente (*Brachiaria brizantha*), estrella Santo Domingo (*Cynodon nlemfuensis*) y/o pastos nativos (*Paspalum* y *Axonopus* spp). La condición corporal promedio de las ovejas utilizadas fue de  $2.02 \pm 0.3$  (utilizando una escala de 1 a 5).

La etapa del ciclo estral, tasa ovulatoria y el desarrollo folicular, se determinó por medio de un equipo de ultrasonografía de imagen real ALOKA 500 utilizando un transductor lineal de 7.5 Mhz, adaptado a un soporte rígido que permitiera su manipulación por vía rectal.

La concentración plasmática de glucosa y glicerol en respuesta a la administración del glicerol, se determinó por medio de espectrofotometría utilizando kits comerciales (SERA PAK GLUCOSA y SERA PAK TRIGLICÉRIOS; Bayer de México, S.A. de C.V. División diagnósticos. México D.F.), en el laboratorio de endocrinología del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa de computación SAS (SAS/STAT, 1991).

### **Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis en la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey.**

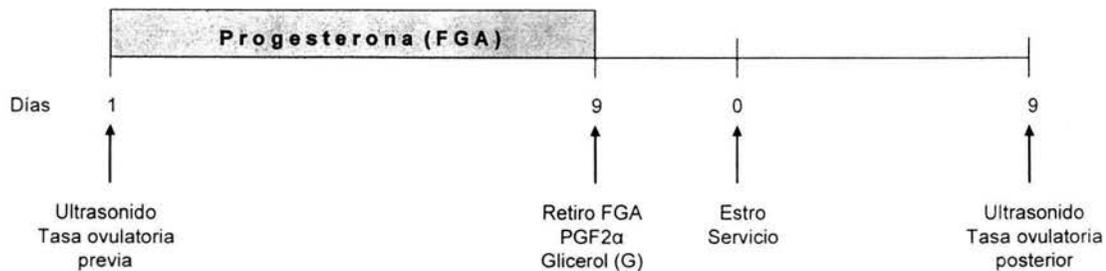
Este estudio es el primero de dos réplicas realizadas con el objetivo de evaluar el efecto de la administración de una solución glucogénica oral sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey. De un rebaño de 220 ovejas adultas, se seleccionaron 125 con cuerpo lúteo y se estimó la tasa de ovulación para cada oveja. Posteriormente, las ovejas fueron inyectadas con una dosis luteolítica de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y asignadas aleatoriamente a uno de dos grupos; un grupo tratado con glicerol (G; n= 74) al cual se le administro 300 ml de solución glucogénica oral compuesta de glicerol y agua en una proporción de 90:10 v/v y el grupo testigo (T; n= 58) que recibió 300 ml de agua. A las 48 horas de la aplicación de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  se detectaron celos, utilizando un macho vasectomizado. La tasa de ovulación posterior al tratamiento se determinó 7 días después de la presentación del estro.

La tasa de ovulación previa y posterior al tratamiento fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba de T de Student. La distribución de las ovejas según el tipo de ovulación posterior al tratamiento se analizó por medio de Chi cuadrada.

### **Efecto de la administración única de glicerol en la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey sincronizadas con progestágeno.**

Este experimento tuvo como objetivo determinar si los resultados observados en el estudio anterior eran repetibles en animales sincronizados con acetato de fluorogestona. Se utilizaron 108 ovejas Pelibuey adultas que se sincronizaron con esponjas intravaginales impregnadas con 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA) (Chronogest, Intervet). Después de nueve días se retiraron las esponjas y se administró una dosis oral de 300 ml de glicerol al 90% (grupo G; n= 53) o agua (Grupo T; n= 55). El día 11 del experimento se detectaron celos y se dio servicio por monta natural (diseño experimental en figura 1).

La determinación de la tasa de ovulación previa al tratamiento se realizó mediante el conteo del número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios el día de inicio del tratamiento de sincronización. La tasa de ovulación posterior al tratamiento se midió nueve días después de la presentación del estro sincronizado.



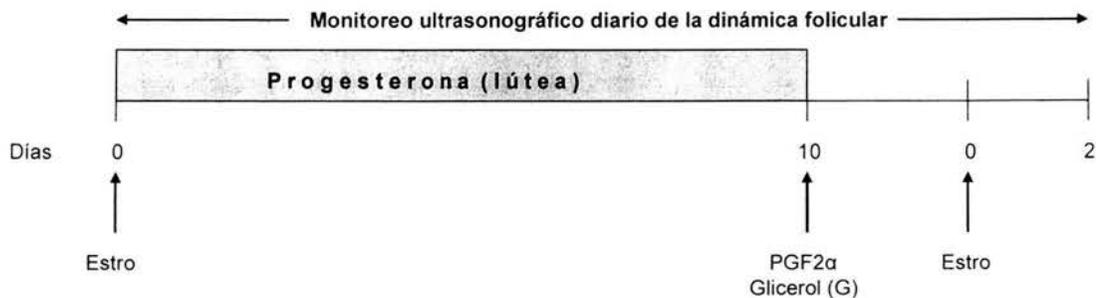
**Figura 1.** Diseño del experimento para determinar el efecto de la administración única de glicerol sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey sincronizadas con progestágeno. Se muestran las actividades correspondientes a cada grupo realizadas a lo largo del experimento.

Se realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias entre grupos en la tasa de ovulación previa y posterior a los tratamientos. Las diferencias entre la tasa de ovulación previa y posterior general y dentro de cada grupo fueron analizadas por medio de una T de Student. Para las diferencias en la distribución del tipo de ovulación, la presentación de estro y fertilidad entre grupos y la distribución del tipo de parto se realizó una prueba de Chi cuadrada.

### **Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis en la dinámica folicular en ovejas Pelibuey.**

Para la evaluación del efecto del tratamiento con glicerol sobre el número de folículos chicos y grandes, y sobre el diámetro del primero, segundo y tercer folículos más grandes presentes en los ovarios cada día del ciclo, se utilizaron 12 ovejas Pelibuey adultas.

El ciclo estral fue sincronizado mediante la inserción de una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de FGA durante 9 días seguido por una inyección de PGF2 $\alpha$  (0.75 mg de clorprostenol). Al momento de la presentación del estro (día 0), las ovejas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos con 6 ovejas cada uno, utilizando los mismos grupos que para el experimento previo. En el día 10 del ciclo, todas las ovejas recibieron una aplicación de 0.75 mg de un análogo de la PGF2 $\alpha$  y ese mismo día recibieron la administración oral de 300 ml de glicerol al 90% (grupo G) o agua (grupo T). El monitoreo diario de los eventos ováricos se realizó por medio de ultrasonografía a partir del día 0 y se continuó hasta la nueva ovulación (día 12-14).



**Figura 2.** Diseño del experimento para determinar el efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la dinámica folicular en ovejas Pelibuey. Se muestran las actividades correspondientes a cada grupo realizadas a lo largo del experimento.

Los folículos se clasificaron como chicos ( $< 4$  mm) y grandes ( $\geq 4$  mm) obedeciendo a observaciones previas en las que los folículos ovulatorios midieron entre 4 y 6 mm el día de la ovulación. Los tres folículos más grandes en los ovarios fueron analizados retrospectivamente y se denominaron primero, segundo y tercer folículo de acuerdo a su diámetro. El seguimiento de los eventos ováricos se realizó en registros individuales en los que se dibujó un mapa de cada ovario con la localización de las estructuras presentes.

El análisis estadístico para las diferencias del número de folículos chicos y grandes se realizó por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas. Para las diferencias en el diámetro de los folículos primero, segundo y tercero entre grupos se realizó un análisis de varianza. Las relaciones entre la presencia de los diferentes tipos de folículos y el diámetro de los folículos primero, segundo y tercero, se analizaron por medio de los coeficientes de correlación de Pearson.

#### **Efecto de la solución glucogénica oral en la concentración plasmática de glucosa y glicerol.**

Este estudio tuvo como objetivo determinar los cambios a corto plazo en las concentraciones plasmáticas de glucosa y glicerol en respuesta al glicerol ( $n= 4$ ) o agua ( $n= 4$ ) (300 ml por vía oral). El muestreo sanguíneo se realizó utilizando tubos de 10 ml conteniendo 100  $\mu$ l de citrato de sodio al 35 %, desde 30 minutos antes de la administración del glicerol para obtener un valor basal de los metabolitos en todas las ovejas, y al momento de la administración del tratamiento (minuto cero), y en los minutos 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 y 600 después del tratamiento. Los tubos fueron mantenidos en refrigeración desde su preparación con el citrato y después de obtener la muestra hasta el momento de su centrifugación para separar el plasma. Las muestras de plasma se mantuvieron en congelación hasta el momento de su procesamiento para la determinación de los niveles de glucosa y glicerol.

La medición de los niveles sanguíneos de glucosa se realizó por un método enzimático colorimétrico basado en la transformación de la glucosa, por la enzima glucosa oxidasa, en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno (4-aminofenazona/fenol) convirtiéndolo en un compuesto de color rojo. De este compuesto, se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 505 nanómetros. La absorbancia de las muestras se compara frente a blanco (0 mg de glucosa / dl) y frente a un patrón (100 mg glucosa / dl) para obtener la concentración de glucosa en miligramos por decilitro.

La medición de los niveles sanguíneos de glicerol fue realizado por un método enzimático colorimétrico basado en la transformación del glicerol, por la enzima glicerolquinasa, en glicerol -3-fosfato, que se oxida a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno en presencia de la glicerol-fosfato oxidasa. Ante la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida al cromógeno N-etil-N-(3-sulfopropil)-m-anasidina/4-aminofenazona a un compuesto de color violeta del cual, al leer su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nanómetros, se obtuvo la concentración de glicerol en miligramos por decilitro. La absorbancia de las muestras se midió frente a blanco (0 mg de glicerol / dl) y un patrón (200 mg de trioleina / dl).

Los valores obtenidos de las determinaciones de glucosa y glicerol fueron transformados a logaritmo para corregir por heterogenicidad de la varianza. El análisis de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas, bajo el siguiente modelo: tratamiento + animal anidado dentro del tratamiento + tiempo de sangrado + la interacción del tratamiento \* tiempo.

### **Determinación de la dosis efectiva de glicerol.**

Una vez conocidos los efectos de la administración de 300 ml de glicerol al 90 % en la tasa de ovulación de las ovejas, se utilizaron 120 ovejas Pelibuey adultas con el objetivo de determinar la dosis mínima efectiva de glicerol para incrementar la tasa de ovulación.

Se determinó la tasa de ovulación de las ovejas previa a los tratamientos, misma que se utilizó como tasa de ovulación testigo. Posteriormente, las ovejas fueron divididas en cuatro grupos con el mismo número de animales cada uno, a los que se les administró 50, 100, 200 ó 300 ml de solución glucogénica. Todas las ovejas fueron sincronizadas con una dosis de PGF2 $\alpha$  administrada después de comprobar la presencia de al menos un cuerpo lúteo en los ovarios que indicara que la oveja se encontrara ciclando. En el momento de la aplicación de la PGF2 $\alpha$  se administró la solución de glicerol al 90 % correspondiente a cada grupo. Las ovejas fueron detectadas en estro 48 horas después de la administración de la PGF2 $\alpha$ . La tasa de ovulación posterior al tratamiento se determinó 9 días después de la presentación del estro.

La tasa de ovulación de cada grupo se analizó por análisis de varianza. Las comparaciones de las medias de la tasa de ovulación de cada grupo contra la tasa de ovulación previa se realizaron mediante una prueba de Dunnet. Las diferencias entre la distribución del tipo de ovulación entre grupos y la distribución previa se analizó mediante una prueba de Chi cuadrada.

## 8. RESULTADOS

### **Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey.**

La tasa de ovulación previa al estudio fue de  $1.68 \pm 0.07$ , siendo idéntica en ambos grupos ( $P > 0.05$ ). Después del tratamiento, la media de la tasa de ovulación para el grupo T fue de  $1.6 \pm 0.06$  no difiriendo de la tasa de ovulación previa. Sin embargo, el tratamiento con glicerol aumentó la tasa de ovulación a  $2.08 \pm 0.06$ , difiriendo de la tasa de ovulación del grupo testigo y de la encontrada previa al estudio ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 1 y Figura 1 anexo I).

**Cuadro 1.** Tasa de ovulación previa y en respuesta al tratamiento (T o G), con 300 ml de solución glucogénica oral compuesta de glicerol:agua (90:10 v/v), al momento de la sincronización del estro con PGF2 $\alpha$ . Se encontró diferencia estadística en la tasa de ovulación del grupo G con el T y la tasa de ovulación previa ( $P < 0.0001$ ). Gráfica en figura 1 de anexo I.

Grupo	Tasa de ovulación		
	n	Previa	Posterior
T	58	$1.68 \pm 0.07^a$	$1.6 \pm 0.06^a$
G	74	$1.68 \pm 0.07^a$	$2.08 \pm 0.06^b$

a, b literales distintas en la misma columna indica diferencia estadística ( $P < 0.0001$ )

Al estudiar la distribución de ovulaciones simples, dobles, triples o cuádruples en respuesta al tratamiento con glicerol, se encontró que el grupo T presentó 39.66 % de ovulaciones simples y 60.34 % ovulaciones dobles. En contraste, el grupo G presentó una

disminución en el porcentaje de ovulaciones simples siendo de solo 10.81 % y un aumento en el porcentaje de ovulaciones dobles (71.62 %), y la presencia de ovulaciones triples (16.22 %) y ovulaciones cuádruples (1.35 %). Las diferencias en distribución de la tasa de ovulación posterior al tratamiento entre grupos fueron significativas ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Distribución del tipo de ovulación (sencilla, doble, triple o cuádruple) para el grupo testigo o después del tratamiento con 300 ml de una solución glucogénica oral compuesta de glicerol:agua (90:10 v/v), al momento de la sincronización con PGF2 $\alpha$ .

Grupo	Tipo de ovulación				
	n	Simple	Doble	Triple	Cuádruple
T <sup>a</sup>	58	39.66	60.34	0	0
G <sup>b</sup>	74	10.81	71.62	16.22	1.35

a, b literales distintas indican diferencia estadística ( $P < 0.0001$ )

Todas las ovejas del grupo testigo y 96 % del grupo tratado con glicerol manifestaron conducta estral. No se encontró diferencia estadística entre grupos ( $P \geq 0.05$ ).

**Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey sincronizadas con progestágeno.**

La tasa de ovulación previa al tratamiento fue de  $1.53 \pm 0.04$ . No existió diferencia estadística entre las medias de la tasa de ovulación previa al tratamiento entre grupos ( $P < 0.5$ ).

Después del tratamiento, la tasa de ovulación del grupo T fue de  $1.64 \pm 0.7$  y no difirió de la tasa de ovulación previa al tratamiento ( $P > 0.1$ ). En contraste, el grupo tratado (grupo

G) aumentó la tasa de ovulación significativamente ( $2.41 \pm 0.09$ ;  $P < 0.05$ ) (Cuadro 3 y figura 2 anexo I).

**Cuadro 3.** Promedio de la tasa de ovulación por grupo previa y posterior al tratamiento con glicerol al momento de la luteólisis. Gráfica en figura 2 de anexo I.

Grupo	Tasa de ovulación		
	n	Previa	Posterior
T	55	$1.62 \pm 0.08^a$	$1.64 \pm 0.07^a$
G	53	$1.5 \pm 0.08^a$	$2.41 \pm 0.09^b$

a, b literales distintas indican diferencia estadística ( $P < 0.1$ ).

La distribución de ovulaciones simples, dobles y triples previa al tratamiento no fue diferente entre grupos ( $P = 0.1202$ ; cuadro 4).

**Cuadro 4.** Distribución por grupo del tipo de ovulación previo al tratamiento (en porcentaje).

Grupo	Tipo de ovulación			
	n	Simple	Doble	Triple
T	55	46	46	8
G	53	54.90	39.22	5.88

No se encontró diferencia estadística entre grupos ( $P 0.1202$ ).

El tratamiento con glicerol modificó la distribución de las ovulaciones sencillas y múltiples ( $P < 0.01$ ) (cuadro 5). El grupo T presentó 39.62 % de ovulaciones simples, 56.6 % ovulaciones dobles y 3.77 % ovulaciones triples. En contraste, el tratamiento con glicerol causó una reducción en la proporción de ovulaciones simples (5.66 %) y aumentó la

proporción de ovulaciones dobles (50.94 %) y triples (39.62 %), presentando incluso ovulaciones cuádruples (3.77 %).

**Cuadro 5.** Distribución del tipo de ovulación posterior al tratamiento con glicerol (G) o agua (T) al momento de la luteólisis.

Grupo	Tipo de ovulación				
	N	Simple	Doble	Triple	Cuádruple
T <sup>a</sup>	55	39.62	56.60	3.77	0
G <sup>b</sup>	53	5.66	50.94	39.62	3.77

Diferente literal indica diferencia estadística (P < 0.0001).

Durante el presente estudio el 94.34 % de ovejas del grupo G y el 93.37 % del grupo T manifestó conducta estral. No existió diferencia estadística entre grupos en relación con la manifestación de conducta estral (P = 0.6592). La fertilidad en las ovejas del grupo T fue de 57.14 % y fue similar a la obtenida con el tratamiento con glicerol (68.75 %). La prolificidad de este estudio fue de 1.63, siendo de 1.60 para el grupo G y de 1.67 para el grupo T. No se encontró diferencia estadística en cuanto a la prolificidad, entre grupos (P = 0.6030).

De la misma forma que con la tasa de ovulación, la prolificidad puede estudiarse a través del tipo de nacimientos, siendo parto sencillo, doble, triple, etc. En el presente estudio no se observaron diferencias estadísticas en la distribución del tipo de parición entre grupos (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Distribución en porcentaje del tipo de parición en ovejas tratadas con 300 ml de glicerol (G) o agua (T).

Grupo	Tipo de parto			
	N	Sencillo	Doble	Triple
T	28	39.29	53.57	7.14
G	33	42.42	54.55	3.03

No se encontró diferencia estadística ( $P = 0.7558$ ).

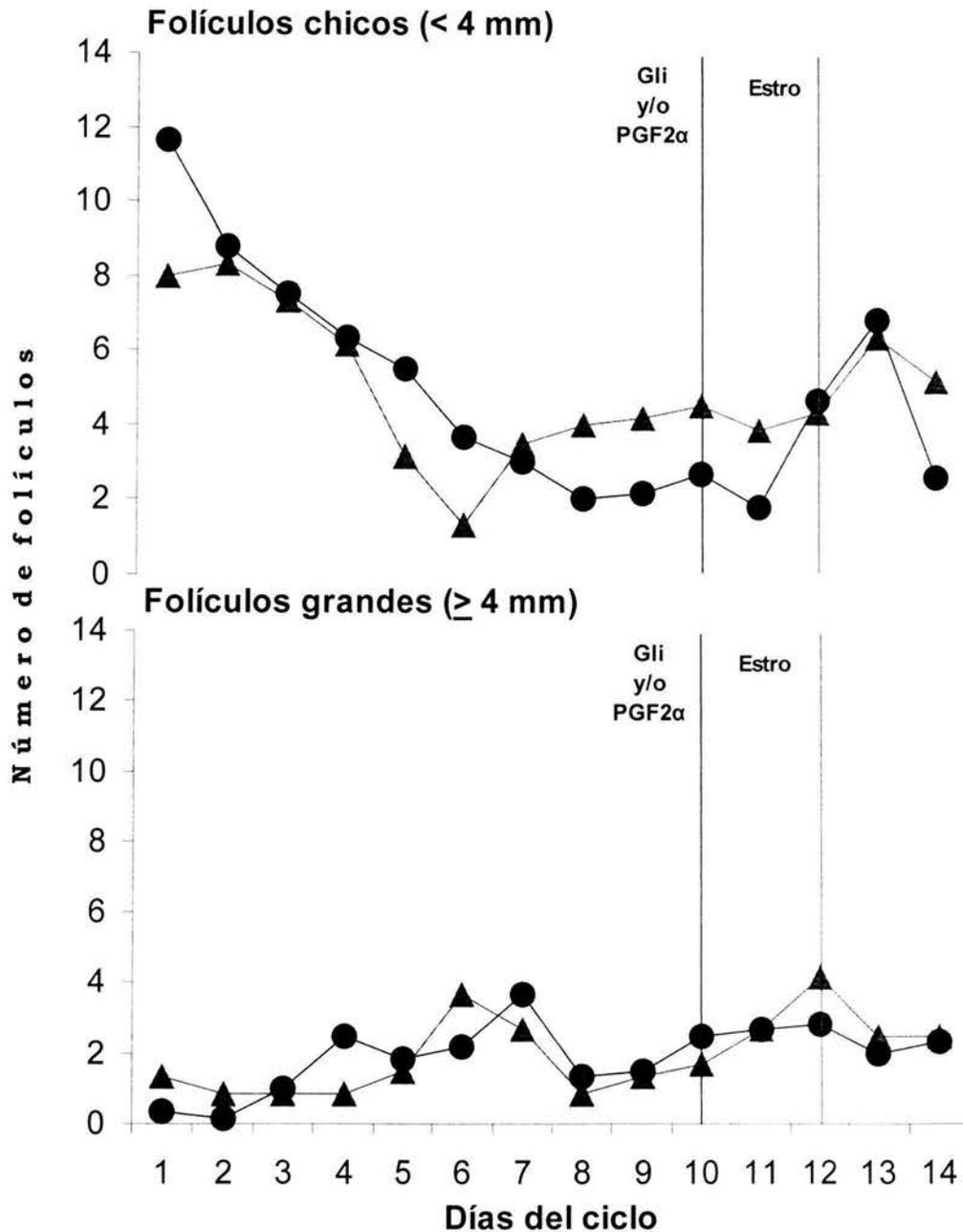
Cuatro de las ovejas que recibieron el tratamiento con glicerol murieron entre 15 y 20 minutos después de recibirlo. Esta observación de un efecto negativo del glicerol, nos condujo a la elaboración de un experimento en el que se determinó la dosis mínima efectiva de la solución de glicerol para aumentar la tasa de ovulación.

**Efecto de la administración única de glicerol al momento de la luteólisis sobre la dinámica folicular en ovejas Pelibuey.**

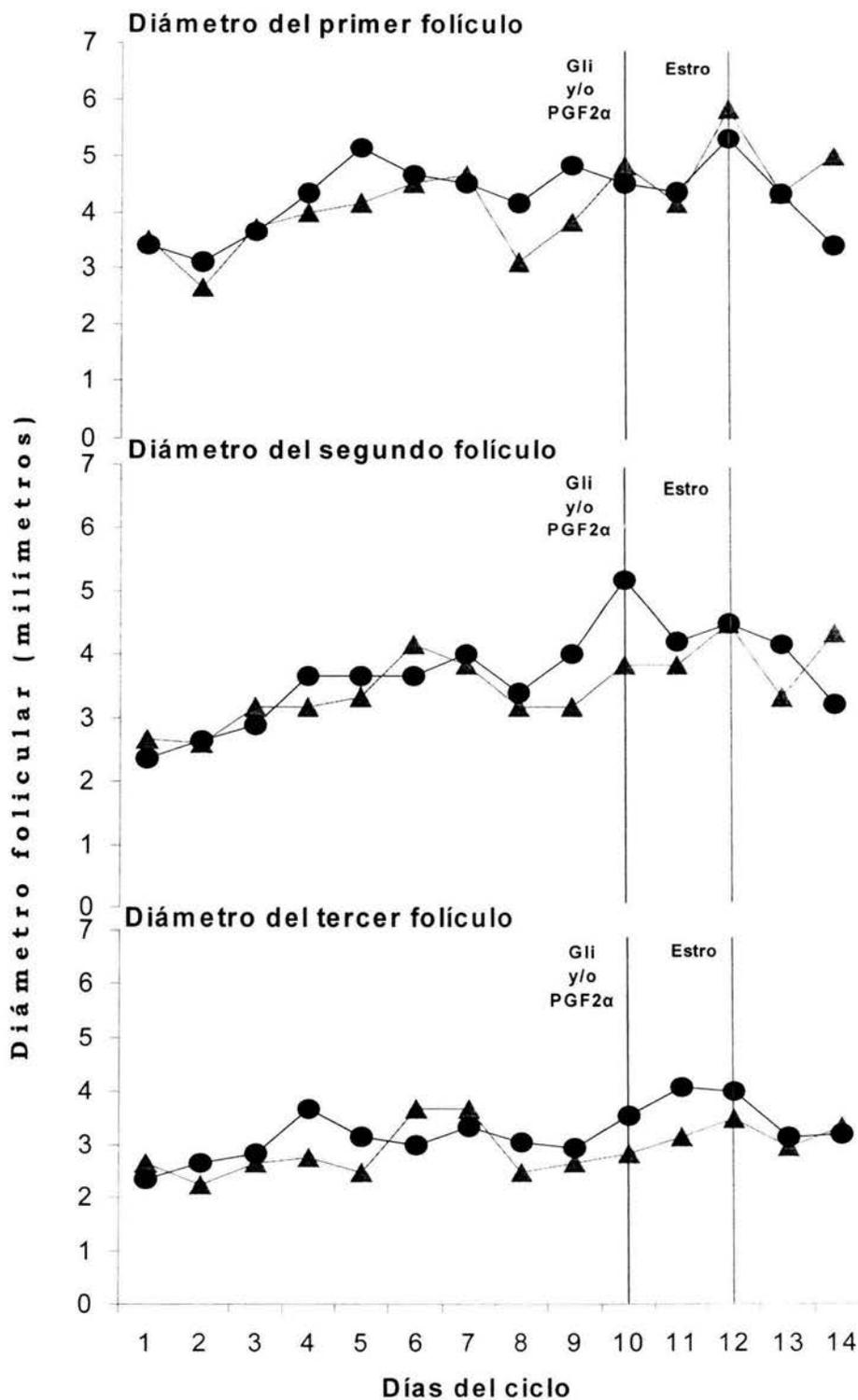
El número de folículos chicos tuvo su valor más alto el día 1 del ciclo estral. No se encontraron diferencias en el número de folículos chicos entre tratamientos (Figura 5).

A pesar de las diferencias morfológicas que pudieron apreciarse durante el monitoreo del desarrollo folicular en los ovarios a lo largo del ciclo estral, no se encontraron diferencias entre grupos para el número de folículos chicos ( $P > 0.8644$ ) ni para el número de folículos grandes ( $P > 0.5189$ ).

Al analizar el desarrollo folicular diario con base en el diámetro del primero, segundo y tercer folículo, pudo observarse con claridad el desarrollo de la primera oleada folicular para cada una de las categorías de folículos observadas. El desarrollo de la segunda y tercera oleadas solo pudo apreciarse con la misma claridad a nivel individual. Sin embargo, no pudo distinguirse un efecto del tratamiento sobre el diámetro del folículo primero ( $P > 0.5179$ ), segundo ( $P > 0.6742$ ) o tercero ( $P > 0.2291$ ) (Figura 6).



**Figura 5.** Número promedio de folículos chicos (< 4 mm) y grandes (≥ 4 mm) a lo largo del ciclo en el grupo testigo (▲) y en el grupo tratado con glicerol (●). No se encontró diferencia entre grupos en el número de folículos chicos ( $P > 0.8644$ ) y grandes ( $P > 0.5189$ ).



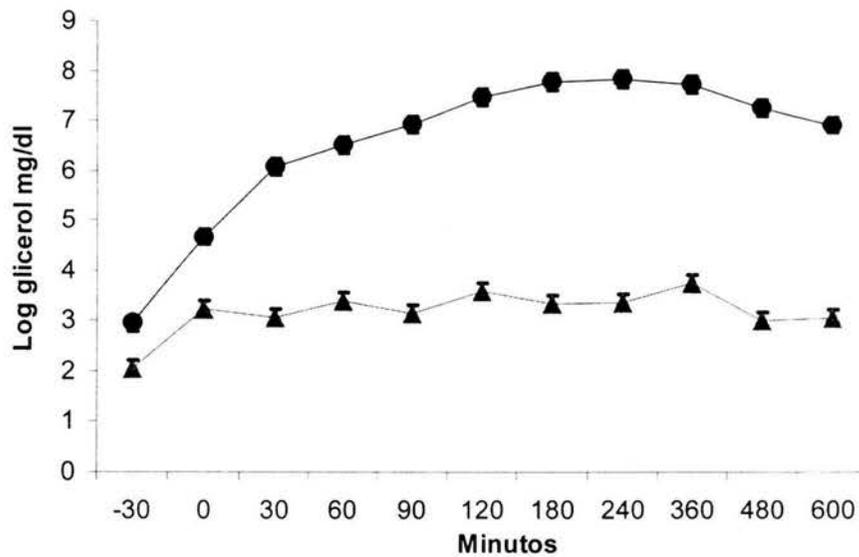
**Figura 6.** Diámetro del primero, segundo y tercer folículo a lo largo del ciclo en el grupo testigo (▲) y en el grupo tratado con glicerol (●). No se encontró diferencia entre grupos (primero  $P > 0.5179$ ; segundo  $P > 0.6742$ ; tercero  $P > 0.2291$ ).

El número de folículos chicos presentó una correlación negativa ( $r = -0.039$ ) con el número de folículos grandes ( $P < 0.0001$ ), y con el diámetro del folículo primero ( $r = 0.283$ ), segundo ( $r = -0.34$ ) y tercero ( $r = -0.324$ ) ( $P < 0.0001$ ). El número de folículos grandes presentó una correlación positiva ( $r = 0.313$ ) con el diámetro del folículo primero ( $P < 0.0001$ ), segundo ( $r = 0.15$ ;  $P < 0.0085$ ) y tercero ( $r = 0.018$ ;  $P < 0.0001$ ).

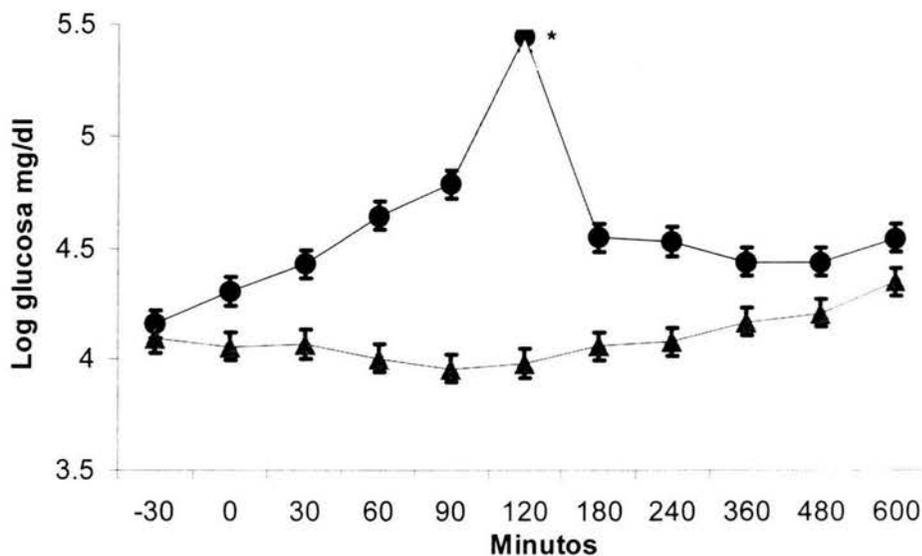
### **Efecto de la solución glucogénica oral sobre la concentración plasmática de glucosa y glicerol.**

Inmediatamente después de la administración de glicerol se observó un aumento agudo de los niveles de glicerol sanguíneo, iniciando en el momento de la aplicación del glicerol para alcanzar un máximo en el minuto 240 y disminuir a partir de ese momento. En contraste, los niveles de glicerol de las ovejas tratadas con agua no mostraron alteraciones al lo largo del muestreo. Se encontró que los niveles sanguíneos de glicerol fueron diferentes entre grupos desde el momento de la administración del tratamiento (minuto 0) hasta el final del muestreo ( $P < 0.0001$ ) (Figura 7).

Los niveles de glucosa sanguínea mostraron un comportamiento similar al encontrado en los niveles de glicerol. Inmediatamente después de la administración del tratamiento, se produjo una elevación marcada de los niveles de glucosa en el grupo G hasta alcanzar su nivel máximo en los minutos 90 y 120 (cuando los niveles de glucosa salieron del rango de medición), y disminuir a partir de este último. En contraste, el grupo T no mostró ningún incremento en los niveles de glucosa. Los niveles de glucosa fueron estadísticamente diferentes entre ambos grupos desde el minuto 30 hasta el minuto 240 después de la administración del glicerol ( $P < 0.0001$ ) (Figura 8).



**Figura 7.** Concentraciones de glicerol sanguíneo en el grupo testigo (▲) y en el grupo glicerol (●) (tratado don 300 ml de solución de glicerol al 90% en forma oral), desde 30 minutos previos hasta 600 minutos posteriores al tratamiento (gráfica con concentración en mg/dl en figura 3 del anexo I).



**Figura 8.** Concentraciones de glucosa sanguínea en el grupo testigo (▲) y en el grupo glicerol (●) (tratado don 300 ml de solución de glicerol al 90% en forma oral), desde 30 minutos previos hasta 600 minutos posteriores al tratamiento. \* Valores fuera del limite de detección del ensayo (gráfica con concentración en mg/dl en figura 4 de anexo I).

### Determinación de la dosis efectiva de glicerol.

La tasa de ovulación previa al estudio fue  $1.68 \pm 0.05$ . El tratamiento con glicerol incrementó la tasa de ovulación en las dosis probadas, siendo significativo a partir de 100 ml de glicerol ( $P < 0.0001$ ). La tasa de ovulación en el grupo de 50 ml fue  $2 \pm 0.08$ ,  $2.3 \pm 0.15$  en el grupo de 100 ml, de  $2.21 \pm 0.15$  en el grupo de 200 ml y  $2.03 \pm 0.12$  en el grupo de 300 ml (cuadro 10).

**Cuadro 7.** Promedio de la tasa de ovulación previa y en respuesta al tratamiento oral con 50, 100, 200 y 300 ml de solución glucogénica a base de glicerol (glicerol:agua, 90:10 v/v).

Grupo	Tasa de ovulación	
	n	
Previo	120	$1.68 \pm 0.05$ a
50 ml	30	$2 \pm 0.08$ a
100 ml	30	$2.3 \pm 0.15$ b
200 ml	30	$2.21 \pm 0.15$ b
300 ml	30	$2.03 \pm 0.12$ b

Diferente literal indica diferencia estadística ( $P < 0.0001$ )

Cuando se analizó la distribución del tipo de ovulación se encontró que la distribución de la tasa de ovulación previa fue: 38.60 % ovulaciones simples, 54.39 % ovulaciones dobles y 7.02 % ovulaciones triples. La dosis de 50 ml cambió ( $P < 0.05$ ) la distribución de la tasa de ovulación a: 10.71 % ovulaciones sencillas, 78.57 % ovulaciones dobles y 10.71 % ovulaciones triples existiendo un aumento de ovulaciones múltiples ( $P < 0.05$ ); la distribución de la tasa de ovulación para el grupo de 100 ml fue: 3.85 % ovulaciones simples, 76.92 % ovulaciones dobles, 3.85 % ovulaciones triples y 15.38 % ovulaciones cuádruples y para el grupo de 200 ml fue 14.29 % simples, 60.71 % dobles, 14.29 %

triples y 10.71 ovulaciones cuádruples. Para el grupo de 300 ml la distribución de la tasa de ovulación fue 17.24 % ovulaciones simples, 65.52 % ovulaciones dobles, 13.79 % ovulaciones triples y 3.45 % ovulaciones cuádruples. Todas las dosis empleadas aumentaron el porcentaje de ovejas con ovulaciones múltiples, Sin embargo, no se encontró diferencia entre las dosis tratadas. Adicionalmente, las dosis de 100 ml y superiores se presentaron además ovulaciones cuádruples, lo que no fue visto en el grupo testigo o en el tratado con 50 ml de glicerol ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 11).

**Cuadro 8.** Distribución en porcentaje de la tasa de ovulación posterior al tratamiento oral con 50, 100, 200 y 300 ml de solución glucogénica a base de glicerol (glicerol:agua, 90:10 v/v).

Grupo	Tipo de ovulación			
	Simple	Doble	Triple	Cuadruple
Previo a	38.60	54.39	7.02	0
50 ml b	10.71	78.57	10.71	0
100 ml b	3.85	76.92	3.85	15.38
200 ml b	14.29	60.71	14.29	10.71
300 ml b	17.24	65.52	13.79	3.45

Diferente literal indica diferencia estadística ( $P < 0.0001$ ).

## 9. DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que la administración oral única de una solución glucogénica al momento de la luteólisis incrementa la tasa de ovulación en ovejas. Este efecto se acompaña de un aumento en los niveles sanguíneos de glicerol y glucosa y es dosis dependiente. Estos resultados ofrecen un método rápido, eficaz y de bajo costo para el aumento de la tasa de ovulación en ovejas.

Aunque en la mayoría de las investigaciones en las que se ha realizado flushing se ha logrado aumentar la tasa de ovulación, ningún método utilizado hasta el momento alcanza los resultados obtenidos en el presente trabajo, utilizando un método tan sencillo como puede ser la administración oral de una dosis única de solución glucogénica al momento de la luteólisis. El aumento en la tasa de ovulación en respuesta a manejos nutricionales es independiente de los niveles y/o patrón de secreción de FSH y LH <sup>146</sup>, aunque aparentemente existe un aumento en el peso de la hipófisis y por lo tanto en el contenido de FSH y LH de la misma <sup>147</sup>. Esto se respalda por diversos trabajos publicados por Rhind et al. <sup>148, 149, 150</sup>, en los que encontraron que no existen diferencias en los perfiles de secreción de gonadotropinas a lo largo de la fase lútea en ovejas mantenidas con consumo alimenticio alto o bajo <sup>7</sup>. Dadas las evidencias de la ausencia de la participación de las gonadotropinas para el aumento en la tasa de ovulación durante el flushing, diversos estudios han sido realizados tratando de encontrar la vía fisiológica por la que el flushing surte efecto. En este sentido, Gutiérrez et al. (1997) <sup>78</sup> encontraron que en vacas, el reclutamiento folicular incrementa cuando se aumenta el consumo alimenticio, y es acompañado por un aumento en la concentración de IGF-I. Al igual que en los estudios citados anteriormente, Gutiérrez et al. (1997), no encontraron cambios en la concentración de FSH. Esta aparente falta de efecto de una nutrición incrementada sobre la concentración de IGF-I circulante ya había sido informado por Spicer et al. (1991)

<sup>151</sup>. Sin embargo, es posible que no se detecten cambios en IGF-I circulante debido a que su efecto sea principalmente a nivel ovárico dado por IGF-I producido en las células de la granulosa, o por la regulación local dada por IGFBPs <sup>71</sup>.

El salto que va desde el aumento en el consumo alimenticio al aumento en la tasa de ovulación debe incluir como ruta principal una vía metabólica más que una vía endocrina. En un principio, se pensaba que la glucosa, por si misma, era el principal mediador del efecto flushing por ser la principal fuente de energía de todas las células del organismo y del sistema nervioso central <sup>152</sup>, o como promotor de la captura de colesterol, para su uso en la esteroidogénesis, por parte de los ovarios <sup>153</sup>. El incremento en la tasa de ovulación asociado con incremento en glucosa e insulina había sido reportado por Downing et al. (1995) <sup>7</sup>, en ovejas sometidas a flushing con grano lupin. Downing et al. (1995) <sup>107</sup>, realizaron una infusión de glucosa por 5 días en ovejas durante la fase lútea tardía hasta el momento de la luteólisis y observaron un incremento de la tasa de ovulación en las ovejas, acompañado por un aumento esperado en la glucosa circulante y por un aumento notable en la concentración de insulina, sin observar cambios en la secreción de LH ni FSH. En un trabajo similar Downing y Scaramuzzi (1997) <sup>154</sup>, realizaron infusiones de insulina en la vena yugular por 72 horas durante la fase lútea en ovejas sincronizadas con PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , encontrando que las ovejas tratadas con insulina no experimentaron cambios en su tasa de ovulación ni en su concentración de FSH, sin embargo, observaron un retraso en la disminución preovulatoria de FSH. En el trabajo mencionado, también encontraron que la infusión de insulina reduce notablemente los niveles de glucosa, así como la concentración y frecuencia de pulsos de LH. Cuando se ha infundido insulina y la glucosa directamente al ovario de ovejas con autotransplante, Downing (1996) <sup>6, 155</sup> demostró que la infusión de de estas sustancias solas no tiene efecto sobre la función ovárica. De esta forma puede suponerse que el efecto del flushing es realizado por la interacción de los cambios en los niveles de glucosa y los que estos

cambios inducen sobre la concentración de insulina y estos a su vez sobre la secreción de GnRH <sup>156</sup>. El IGF-I parece jugar un papel importante en el efecto de la nutrición sobre la reproducción, íntimamente ligado a la insulina. Se sabe que existe una relación positiva entre la concentración sanguínea e intrafolicular de IGF-I y la proporción de vacas con partos gemelares <sup>157</sup>, así como con la capacidad estrogénica de los folículos y el diámetro folicular <sup>158</sup>. La suplementación con grano lupin incrementó las concentraciones de IGF-I en carneros, esto hace pensar que la insulina y el IGF-I pueden jugar un papel importante en el incremento de la tasa de ovulación cuando los animales reciben un estímulo nutricional como sucede durante el flushing <sup>100, 101</sup>. La insulina y el IGF-I estimulan la proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa bovinas in vitro <sup>159</sup>. Estas evidencias, se respaldan con otro trabajo de Gutiérrez et al. (1997) <sup>78</sup>, en el que encontraron que el incremento en el consumo alimenticio incrementa el reclutamiento folicular asociado con un aumento en la insulina circulante.

Entre diversos estudios publicados antes del presente trabajo, en donde se han utilizado estímulos nutricionales encaminados a incrementar la tasa de ovulación, es posible encontrar amplias variaciones en la duración del estímulo y la magnitud de la respuesta al mismo. En el presente trabajo, la administración oral de una sola dosis de solución glucogénica al momento de la luteólisis, logró incrementar la tasa de ovulación. El conjunto de estos resultados ofrece diversas posibilidades que relacionan la efectividad del flushing con el momento de inicio del estímulo. En este sentido, la tendencia inicial de las investigaciones fue el aumentar la condición corporal de las hembras para incrementar así la tasa de ovulación. Sin embargo, existen tratamientos que inician en los días 10 <sup>135</sup> y 6 <sup>137</sup> antes de la presentación del estro o en los días 2 a 13 del ciclo estral en ovejas <sup>7</sup>. Además, este trabajo demuestra que se puede influir en el desarrollo de los folículos ováricos por medio del inicio del flushing en los momentos cercanos al reclutamiento de la oleada folicular que contendrá al (los) folículo(s) ovulatorio(s). Los

tratamientos que tienen una duración menor a la del ciclo estral buscan aumentar la tasa de ovulación por medio de ofrecer un estímulo continuo sobre los folículos que se desarrollan durante un ciclo estral completo o sobre los que se desarrollan al final de la fase lútea de un ciclo dado, probablemente buscando rescatar de la atresia a folículos de oleadas anteriores a la que normalmente sería la oleada ovulatoria, o bien estimular el reclutamiento de una mayor cantidad de folículos en el inicio de la oleada que coincidirá con la luteólisis. En el presente trabajo el estímulo nutricional se realizó en un solo momento del ciclo estral, dicho momento fue en el que se indujo la luteólisis. Cabe recordar que bajo la influencia de la progesterona lútea, la secreción de GnRH por parte del hipotálamo se encuentra inhibida y los folículos no logran su maduración final y cuando sucede la luteólisis, el hipotálamo es liberado de dicha inhibición, desencadenando la serie de eventos endocrinos que termina con la ovulación. Es probable que el aumento en la tasa de ovulación obtenido en el presente trabajo no se deba a que el estímulo nutricional haya aumentando el reclutamiento de los folículos de la oleada ovulatoria, como sucede cuando se somete a vacas a regímenes alimenticios elevados para lograr incrementos en la prolificidad <sup>78</sup>, en cambio es probable que la clave para el éxito del tratamiento sea que se hizo coincidir el momento en que se proporcionó el estímulo con el momento de la selección de los folículos y cuando desarrollaran mayor cantidad de receptores para LH en el tiempo en que comienza a incrementarse la frecuencia de secreción de LH.

En los rumiantes, el principal sustrato glucogénico es el propionato, el cual es producido en el rumen junto con otros ácidos grasos volátiles. El propionato sale del rumen y es transportado hacia el hígado, donde es convertido en glucosa <sup>91</sup>. En el presente trabajo se utilizó un compuesto altamente glucogénico que puede comenzar a transformarse en propionato dentro del rumen pero que en mayor proporción es absorbido sin alteraciones y al llegar al hígado es transformado en glucosa junto con el propionato. Esta hipótesis se

respalda por el incremento inmediato del glicerol sanguíneo en las ovejas tratadas, que se mantuvo hasta 10 horas después de la administración del glicerol y por el posterior aumento en la glucosa sanguínea, desde el minuto 30 después de la aplicación del glicerol. La correspondencia en el incremento de los niveles de glucosa y glicerol en los animales tratados, podría llevarnos a suponer que la glucosa por si sola es la que ejerce el principal estímulo para el aumento de la tasa de ovulación durante el tratamiento con soluciones glucogénicas y así apoyar los trabajos citados anteriormente en esta discusión. Sin embargo, la medición de los niveles de glicerol y glucosa demuestran una marcada disminución de glucosa entre los minutos 120 y 180 posteriores a la administración del glicerol, para colocarse dentro del mismo que mostraron los animales no tratados en el minuto 240 (4 h), mientras que los niveles de glicerol se mantuvieron elevados al menos durante 10 horas después del tratamiento. Aunque no se contó con los análisis de laboratorio para la determinación de insulina que permitiera asegurarlo, se puede suponer que la transformación de glicerol a glucosa por parte del hígado continuó, al menos, durante las 10 horas que duró el muestreo, pero dicha transformación no se vio reflejada en los niveles sanguíneos de glucosa debido al efecto de la insulina que mantuviera la glucosa sanguínea dentro de un rango fisiológico. De esta forma, se sugiere que el incremento en la tasa de ovulación en respuesta a una dosificación oral única con la solución a base de glicerol se debe a los cambios inducidos por la glucosa en los niveles de insulina, probablemente debido a una modificación en la capacidad de respuesta de los ovarios a FSH y LH, sin que exista una modificación en los niveles y/o patrón de secreción de dichas gonadotropinas.

Existen trabajos que atribuyen el aumento en la tasa de ovulación al exceso y fuente de proteína recibida por el animal durante el flushing <sup>102</sup>. Las proteínas en el rumen son degradadas a aminoácidos, algunos de los cuales pueden servir como precursores de neurotransmisores involucrados en la secreción de GnRH <sup>5</sup> o bien ser transformados a

glucosa. Los aminoácidos que han sido postulados como posibles mediadores de este efecto son la fenilalanina y la tirosina como precursores de la dopamina, noradrenalina y adrenalina, y el triptofano como precursor de la serotonina <sup>5</sup>. En un trabajo realizado por Downing et al. (1995) <sup>108</sup>, se realizó una infusión de una mezcla de leucina, isoleucina y valina en ovejas 5 días antes de la luteólisis, encontrando un incremento significativo en la concentración de insulina y la tasa de ovulación, pero sin incrementos en la secreción de LH o FSH. Los mismos autores <sup>160</sup>, encontraron que la infusión de triptofano, tirosina o una mezcla de tirosina y fenilalanina causó un incremento en la concentración de insulina pero no en la tasa de ovulación. Aunque en ninguno de los trabajos citados fueron medidos los neurotransmisores mencionados, los autores concluyen que los aminoácidos infundidos incrementan el aporte de sustratos energéticos a los folículos a través de un incremento en la interiorización de glucosa estimulada por la insulina, puede ser responsable del aumento en la tasa de ovulación causado por los aminoácidos mencionados. Es posible que el aporte de aminoácidos por parte de dietas altas en proteína tenga una participación en el mecanismo de incremento de la tasa de ovulación durante el flushing, al tener también una importante participación de la insulina, pero parece que los sustratos energéticos y glucogénicos, como el que utilizamos en el presente trabajo, son más importantes para el efecto flushing.

En el estudio de la dinámica folicular después de los tratamientos con la solución glucogénica oral, pudo observarse claramente el desarrollo de la primera oleada folicular en las ovejas de todos los tratamientos, la sucesión de la segunda y tercera oleadas no pudo observarse claramente para todos los grupos pero en el patrón individual puede determinarse su existencia. A pesar de que existen estudios en los que ha podido observarse el nuevo reclutamiento folicular debido a diferentes tratamientos en vacas <sup>78, 161, 162, 163</sup> y ovejas <sup>164</sup>, en el presente trabajo no pudo demostrarse un efecto significativo del tratamiento sobre la dinámica folicular. A pesar de lo anterior, a lo largo del ciclo

estral se encontraron diversas correlaciones entre las diferentes categorías de folículos presentes en los ovarios ( $< 4$  mm y  $\geq 4$  mm) y entre el diámetro del primero, segundo y tercer folículos, presentes en el momento del monitoreo ultrasonográfico. Dichas correlaciones se deben al crecimiento folicular normal dentro de los ovarios, puesto que mientras avanza el crecimiento de los folículos chicos aumenta el diámetro de las tres categorías de folículos estudiados y el número de folículos grandes, mientras que el número de folículos chicos tiende a disminuir hasta el inicio de la nueva oleada. Mientras que la correlación positiva existente entre el número de folículos grandes con el diámetro del primero, segundo y tercer folículos, puede deberse a que el aumento en el número de folículos grandes implica, necesariamente, un aumento en el diámetro de los folículos existentes en los ovarios. Aunque no se encontraron efectos significativos del tratamiento durante el desarrollo de las oleadas foliculares, podemos suponer que si existe un efecto debido a que el tratamiento con una solución glucogénica incrementó significativamente la tasa de ovulación de las ovejas y esta depende parcialmente del patrón de desarrollo folicular en los ovarios. Sin embargo, dado que el tratamiento se administró al momento de la caída de progesterona es probable que su efecto no sea en el reclutamiento sino que actúe en la selección folicular.

La dosis de 300 ml de solución de glicerol al 90 % utilizada en los primeros 4 experimentos realizados en el presente trabajo, fue determinada con base en la cantidad de dicha solución utilizada en un experimento anterior, en el cual se logró incrementar la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey con la administración de 1300 ml de solución glucogénica administrados durante 6 días a partir del día 8 del ciclo. Durante los días cercanos a la luteólisis, las ovejas recibieron 300 ml de la solución glucogénica por día. La cantidad de glicerol utilizada en dicho experimento fue extremadamente grande y se decidió utilizar para el presente trabajo solo la cantidad de solución glucogénica dada el día de la inducción de la luteólisis del experimento mencionado. Durante los primeros 3

experimentos, se comprobó la efectividad de la dosis utilizada para el aumento de la tasa de ovulación, sin embargo, también se encontró que la administración de glicerol produjo signos de toxicidad en algunos animales (será abordado posteriormente) y se decidió estudiar la efectividad de diferentes dosis de solución glucogénica. Fueron probadas 4 dosis (50, 100, 200 y 300 ml) de solución glucogénica. Se encontró que todas las dosis utilizadas aumentaron la tasa de ovulación. A pesar de que la media en el incremento en la tasa de ovulación obtenido cuando las ovejas se dosificaron con 50 ml de la solución glucogénica no fue significativo, las ovejas que recibieron 50 ml de la solución glucogénica oral experimentaron una modificación en la distribución del tipo de ovulación, disminuyendo notablemente la proporción de ovulaciones sencillas y aumentando la proporción de ovulaciones dobles y triples, lo cual resultó diferente al comparar dicha distribución con la distribución previa al tratamiento. Los resultados obtenidos en el estudio donde se determinó la dosis mínima efectiva de glicerol indican que, si se aplica en el momento adecuado, el estímulo metabólico no necesariamente requiere de grandes cantidades de solución glucogénica para lograr incrementar la tasa de ovulación en ovejas.

En uno de los estudios, cuatro ovejas murieron aproximadamente 15 minutos después de haber recibido 300 ml de la solución glucogénica oral. Las ovejas manifestaron incoordinación y posteriormente un cuadro convulsivo severo que condujo a la muerte entre 5 y 10 minutos. Desconocemos la causa de estas muertes, sin embargo, previo al tratamiento las ovejas permanecieron en ayuno y sin acceso a agua por aproximadamente 9 horas, lo cual pudo haber favorecido una absorción más rápida del glicerol, causando un coma hiperosmolar. Esta complicación metabólica se presenta de forma aguda en individuos con diabetes tipo II. En esta, el individuo presenta un retraso o una insuficiencia en la secreción de insulina y/o una incapacidad de sus tejidos periféricos para responder a la insulina (resistencia a la insulina), la glucosa no puede ser

internalizada lo suficientemente rápido y los niveles circulantes de glucosa se mantienen elevados y con ello la osmolaridad de la sangre. En los individuos diabéticos, la hiperglucemia debida a una deficiencia en la insulina produce glucosuria y poliuria sostenidas, lo cual conduce a una deshidratación importante que los lleva al coma hiperosmolar y en la mayoría de los casos a la muerte <sup>165, 166</sup>. Aunque no se puede saber si las ovejas que murieron padecían algún trastorno en su función pancreática, es muy probable que su muerte se haya debido a una condición similar al coma hiperosmolar sin que, necesariamente hayan padecido diabetes. El rápido paso del glicerol del rumen a la circulación, aunado al ayuno al que las ovejas fueron sometidas, pudo haber producido un marcado aumento en la osmolaridad de la sangre llevando a las ovejas a un coma hiperosmolar antes de que su organismo pudiera responder con una secreción de insulina que llevara los niveles de glucosa a un rango fisiológico. Es probable que la toxicidad del glicerol dependa de la susceptibilidad individual y del estado de hidratación, fisiológico y de salud de las ovejas, puesto que el número de ovejas muertas no superó el 1% del total de ovejas que recibieron 300 ml de la solución glucogénica oral a lo largo de los 5 experimentos que componen el presente estudio. Sin embargo, nuestros estudios demuestran que 50ml de glicerol son suficientes para obtener un aumento en la tasa ovulatoria. Adicionalmente, se recomienda cuidar el estado de hidratación y la alimentación de los animales previo al tratamiento.

## **10. CONCLUSIONES**

Del presente trabajo podemos concluir que el tratamiento de ovejas con una solución glucogénica oral al momento de la luteólisis incrementa la tasa de ovulación, probablemente a través de un efecto de la insulina estimulada por un aumento en la glucosa circulante. Es necesario realizar estudios en los que se mida el efecto del aumento de la glucosa circulante sobre la insulina y la correlación que este efecto pueda tener con el IGF-I, los eventos endocrinos y determinar con precisión los eventos morfológicos y moleculares a nivel ovárico (como puede ser la expresión de RNAm para receptores para gonadotropinas, IGF-I e IGFBP's), que puedan aportar bases sólidas para determinar la vía por la cual el flushing incrementa la tasa de ovulación. De manera práctica, el presente trabajo aporta un método eficaz y de bajo costo para el incremento de la tasa de ovulación que puede ser usado en ovejas durante la época reproductiva.

## 11. LITERATURA CITADA

1. Chemineau P, Cagnié Y, Guérin Y, Orgeur P, Vallet JC. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO animal production and health paper 83. Italy: Food and agriculture organization of the united nations, 1991
2. Legan JS, Karsch JF. Neuroendocrine regulation of the estrus cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biology of reproduction* 1979;20:74
3. Philips RW, Simmon VL, Schott RG. Observations on the normal Oestrus cycle and breeding season in goats and possibilities of modifications of the breeding season with gonadotrophic hormones. *Anim. J. Vet. Res.* 1943;4:360-367
4. Wani GM. Oestrous activity in goats. *World review of animal production* 1991;26:73-77
5. Downing JA, Scaramuzzi RJ. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophin and metabolic hormones in sheep. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1991;43:209-227
6. Robinson JJ. Nutrition and reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:25-34
7. Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1995;103:137-145
8. O'Callaghan DO, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 2000;118:303-313
9. Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, McConnell K, Spicer LJ, Boland MP, Roche JF. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fert.* 1991;92:333-338
10. Lindsay DR. The usefulness to the animal producer of research findings in nutrition on reproduction. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 1976;9:217-224
11. Gutiérrez CG, Saharrea A, Palacios T, Álvarez J, Aguilera I, López N. The effect of short-term administration of a glycogenic solution on plasma glucose concentrations and ovulation rate in Pelibuey sheep. *Journal of Reproduction and Fertility.* 2000;abstract series 25
12. Gonzalez A, Murphy BD, Foote WC, Ortega E. Circannual estrous variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Research* 1992;8:225-232
13. Chemineau P, Gauthier D, Poirier JC, Saimande J. LH, FSH, prolactin, Oestradiol 17 $\beta$  and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology* 1982;17:313-323
14. Mahesh V, Brann DW. Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids.* 1998;63:616-629
15. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 1st ed. USA: Current conceptions, Inc. 1997
16. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ª ed. México, 1996
17. Hernández CJ. El ciclo estral en la oveja y en la cabra. Memorias del curso: Manejo reproductivo e inseminación artificial en pequeños rumiantes; 1997 octubre 20-24; Distrito federal, México. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, 1997: 26-34
18. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001;55:1211-1239
19. Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield J, McNatty KP. Origins of follicular cells and ontogeny of steroids in ovine fetal ovarios. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002;191:1-10
20. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell, Tisdall DJ. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Celular Endocrinology.* 2000;163:11-20

21. Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutiérrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement*. 2003;61:1-20
22. Findlay JK, Drummond AE. Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1999;10:183-188
23. Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 55: 1193-1210
24. McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N and Tisdall DJ. Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 1999; 54:3-16
28. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular endocrinology*. 2000;163:53-60
- 29 Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutiérrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of reproduction and fertility suppl.* 1999; 54: 33-48.
30. Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*. 1996; 47: 3-12
31. Evans ACO, Duffy P, Hynes N and Boland MP. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 2000; 53: 699-715
32. Palmer E, Driancourt MA. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology* 1980;13:203-216
33. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*. 1984;21:495-504
34. Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*. 1994;42:987-1001
35. Schrick FN, Surface RA, Dailey RA, Townsend EC, Inskeep EK. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*. 1993;49:1133-1140
36. Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*. 2000;60-61:61-79
37. Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. 1997;48:75-87
38. Gibbons JR, Kot K, Thomas DL, Wiltbank MC and Ginther OJ. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulatory rates. *Theriogenology* 1999; 52: 1005-1020
39. Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 1999; 54:17-32
40. Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, García-García RM, del Campo A, Gómez-Brunet A, Lopez-Sebastian A. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon Sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Animal Reproduction Science*. 2001;65:265-272
41. De Castro T, Rubianes E, Mencahca A, Rivero A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology* 1999; 52: 399-411
42. Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare, basics and applied aspects*. 2nd edn. Equiservices, Cross Plańis, WI, USA, pp. 176-185, 457-498
43. Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. *Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.* 1972:119-151
44. Rajakoski E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special referente to seasona, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol.* 1960;34(suppl 52):7-68

45. Figueredo RA, Barros CM, Pinheiro, Soler JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 1997;47:1489-1505
46. Ahmad N, Townsend EC, Dailey RA and Inskeep EK. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beefs cows and heifers. *Animal reproduction science* 1997; 49:13-18
47. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 1989; 32:787-795
48. Bartlewsky PM, Beard AP, Rawlings NC. An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. *Theriogenology*. 2000;54:229-245
49. Nambo Y, Kaneko H, Nagata S, Oikawa M, Yoshihara T, Nagamine N, Watanabe G, Taya K. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 1998;50:545-557
50. Sharma GT, Majumdar AC. Control of follicular steroidogenesis in early- and late-luteal phase goat ovaries. *Small Ruminant Research* 1999; 34: 111-117
51. Baird DT, Campbell BK. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 145: 89-95
52. Khalid M, Haresing W, Luck MR. Secretion of IGF-1 by ovine granulosa cells: effects of growth hormona and follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*. 2000;58:261-272
53. Lucy MC, Bilby CR, Kirby CJ, Yuan W, Boyd CK. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal of reproduction and fertility Suppl*. 1999; 54: 49-59
54. Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2000;163:89-93
55. Behl R, Pandey RS. Effect of recombinant insulin like growth factor-1 on caprine granulosa cell steroidogenesis, in vitro. *Small Ruminant Research* 1999; 33: 165-169
56. Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Sacramuzzi RJ. Studies on the role of LH in the maturation of the pre-ovulatory follicle in sheep using a GnRH-antagonist. *Animal Reproduction Science*. 1997;48:219-234
57. Taru Sharma G, Majumdar AC. Control of follicular steroidogenesis in early- and late-luteal phase goat ovaries. *Small Ruminant Research* 1999;34:111-117
58. Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR, Ginther OJ. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1991;91:511-519
59. Kaneko H, Taya K, Watanabe G, Noguchi J, Kikuchi K, Shimada A, Hasegawa Y. Inhibin is involved in the supresión of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. *Domestic Animal Endocrinology*. 1997;14:263-271
60. Manikkam M, Calder MD, Salfen BE, Youngquist RS, Keisler DH, Garverick HA. Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Animal Reproduction Science*. 2001;67:189-203
61. Watson ED, Thomasen R, Steele M, Heald M, Leask R, Groome NP, Riley SC. Concentrations of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. *Animal Reproduction Science*. 2002;74:55-67
62. Knight PG. Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1996;17:476-509

63. Findlay JK, Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Wreford NG, Robertson DM, Groome NP, Jones MEE, Simpson ER. The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2000;163:81-87
64. Shidaifat F. Inhibin-A and estradiol content of sheep follicles and their association with follicular diameter. *Small Ruminant Research*. 2001; 42: 179-183
65. Driancourt MA, Guet P, Magallon T. Ovine follicular fluid inhibits aromatase activity. *Domestic Animal Endocrinology*. 2000; 18: 349-362
66. Hagemann LJ. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*. 1999; 51: 449-459
67. Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams GP. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 1997;47:1479-1488
68. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*. 1999;51:1351-1361
69. Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: novel mechanisms and protein factors. *Reviews of Reproduction*. 1997;2:139-146
70. Perks CM, Denning-Kendall PA, Gilmour RS, Wathes DC. Localization of Messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology*. 1995;136:5266-5273
71. Armstrong DG, Baxter G, Gutiérrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*. 1998; 139: 2146-2154
72. Armstrong DG, Hogg CO, Campbell BK, Webb R. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effect of IGF-I, gonadotropin and follicle size. *Biology of Reproduction*. 1996;55:1163-1171
73. Kirby CJ, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Lucy MC. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 in bovine uterus, ovary and oviduct. *Biology of Reproduction* 1996;55:996-1002
74. Lucy MC, Boyd CK, Koenigsfeld AT, Okamura CS. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *Journal of dairy science* 1998;81:1889-1895)
75. Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction*. 1991;45:941-949
76. Bister JL, Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Mbayahaga J, Paquay R. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*. 1999;17:315-328
77. Deaver, DR, Bryan KA. Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. *Domestic Animal Endocrinology*. 1999;17:287-297
78. Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science*. 1997;75:1876-1884
79. Joyce IM, Khalid M, Haresign W. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulation rate. *Theriogenology*. 1998;50:873-884
80. Scaramuzzi RJ, Murray JF, Downing JA, Campbell BK. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*. 1999;17:269-277

81. Folch J, Ramón JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*. 2001;55:1777-1785
82. Findlay JK, Drummond AE, Dyson M, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2001;180:139-144
83. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;191:35-43
84. Shidaifat F. Effect of activin-A on goat granulosa cell steroidogenesis. *Theriogenology*. 2001; 56: 591-599
85. Fujiwara T, Lambert-Messerlian G, Sidis Y, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer A. Analysis of follicular fluid hormone concentrations and granulosa cell mRNA levels for the inhibin-activin-follistatin system: relations to oocyte and embryo characteristics. *Fertility and Sterility*. 2000;74:348-355
86. Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Groome NP, García-García RM, Lopez-Sebastian A, Baird DT. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*. 2002;57:1263-1272
87. Saumande J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum free medium. The effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *Journal of Steroids Biochemistry*. 1990;38:189-196
88. Singh J, Adams GP. Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. *Biology of Reproduction*. 1998;59:561-570
89. Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves. A review. *Journal of Animal Science*. 1998;76:1903-1921
90. Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Gutiérrez CG, Logue D, Crawshaw WM, Robinson JJ. Nutritional effect on reproductive performance Cattle practice. 1997 a;5:361-367
91. Boland MP, Lonergan P, O'Callagan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*. 2001;55:1323-1340
92. Canfield RW, Butler WR. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Dom. Anim. Endocrinol*. 1990;7:323-330
93. Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED. Effect of undernutrition on gonadotrophin profiles in non-pregnant, cycling goats. *Anim. Reprod. Sci*. 1996;43:25-33
94. Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, Martín GB. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH y testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *J. Reprod. Fertil*. 1994;102:351-360
95. Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Mialot JP, Sauvant D, Thibier M. Influence of postpartum energy restriction on energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod. Fertil*. 1995;104:173-179
96. Rhind SM, McNeilly AS. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproduction Science*. 1998;52:131-138
97. De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Tatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (Somatitribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci*. 1993;76:1002-1013
98. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 2000;60-61:449-457

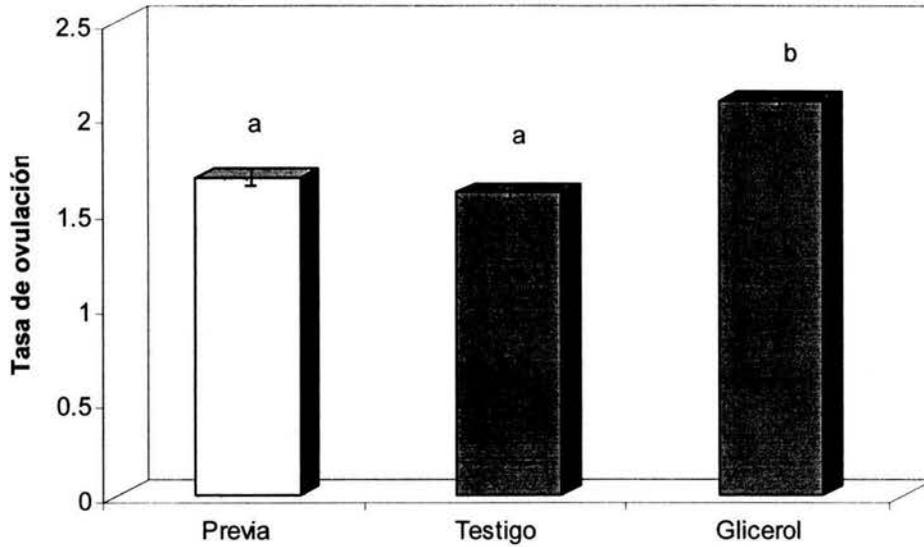
99. Cohick WS, Armstrong JD, Withacre MD, Lucy MC, Harvey RW, Campbell RM. Ovarian expression of insuline-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, and growth hormone (GH) receptor in heifers actively immunized against GH-releasing factor. *Endocrinology* 1996;137:1670-1677
100. Clarke IJ, Fletcher TP, Pomares CC, Holmes JHG, Dunshea F, Thomas GB, Tilbrook AJ, Walton PE, Galloway DB. Effect of high-protein feed supplements on concentrations of growth hormone (GH), insuline-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in plasma and on the amounts of GH and messenger RNA for GH in the pituitary glands of adults rams. *J. Endocrinol.* 1993;138:421-427
101. Armstrong JD, Cohick WS, Harvey RW, Heimer EP, Campbell RM. Effect of feed restriction on serum somatotropin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and binding proteins in cyclic heifers actively immunized against growth hormone releasing factor. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1993;10:315-324
102. Landau S, Houghton JAS, Mawhinney JR, Inskeep EK. Protein sources affect follicular dynamics in ewes near the onset of the breeding season. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996;8:1021-1028
103. Rahul Behl, Pandey RS. Effect of recombinant insulin like growth factor-1 on caprine granulosa cell steroidogenesis, in vitro. *Small Rum. Res.* 1999;33:165-169
104. Driancourt MA, Disenhaus C. Lack of effects of growth hormone administration on ovarian function of lactating goats. *Anim. Reprod. Sci.* 1997;46:123-132
105. Coop IE. Effect of flushing on reproductive performance of ewes. *J Agric Sci Camb.* 1996;67:305-323
106. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993;5:459-478
107. Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 1995;146:403-410
108. Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. A mixture of the branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine increases ovulation rate in ewes when infused during the late luteal phase of the oestrous cycle: an effect that may be mediated by insulin. *J. Endocrinol.* 1995;145:315-323
109. Landau S, Bor A, Leibovich H, Zoref Z, Nitsan Z, Madar Z. The effect of ruminal starch degradability in the diet of Booroola crossbred ewes on induced ovulation rate and prolificacy. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;38:97-108
110. Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED. The effects of low level of feeding on response to sincronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology* 1992;38:1013-1022
111. Goonewardene LA, Whitmore W, Jaeger S, Borchert T, Okine E, Ashmawy O, Emond S. Effect of prebreeding maintenance diet on subsequent reproduction by artificial insemination in Alpine and Saanen goats. *Theriogenology* 1997;48:151-159
112. Saharrea MA. Métodos para la inducción del estro, incremento de la prolificidad y superovulación en caprinos. *Memorias del curso: Manejo reproductivo e inseminación artificial en caprinos; 1998 noviembre 9-12; México, D.F: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1998:28-33*
113. Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial de ovejas y cabras.* Zaragoza, España: Acribia, 1990
114. Baird DT. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J. Reprod. Fertil.* 1983;69:343
115. Land RB, Morris BA, Baxter G, Fordyce M, Forster J. Improvement of sheep fecundity by treatment with antisera to gonadal steroids. *J. Reprod. Fertil.* 1982;66:625

116. Driancourt MA, Philipon P, Terqui M, Molenat G, Mirman B, Louault C, Avdi M, Folch J, Cognie Y. Possibilities for immunization against steroids to improve ovulation rate and litter size in sheep and goats. *Productions Animales* 1990;3:31-37
117. Scaramuzzi RJ, Martensz ND, Van Look PFA. Ovarian morphology and the concentrations of steroids, and of gonadotropins during the breeding season in ewes actively immunized against oestradiol-17 $\beta$  or estrone. *J. Reprod. Fertil.* 1980;59:303
118. Roberts AJ, Reeves JJ. Kidding rates of angora goats passively immunized against estrogens. *J. Anim. Sci.* 1988;66:2443-2447
119. Buckler HM, Healy DL, Burger HG. Purified FSH stimulates production of inhibin by the human ovary. *J. Endocrinol.* 1989;122:279-285
120. McNeilly AS, Swanston IA, Crow W, Tsonis CG, Baird DT. Changes in the plasma concentration of inhibin throughout the normal sheep oestrous cycle and after the infusion of FSH. *J. Endocrinol.* 1989;120:295-305
121. Tsonis CG, Messinis IE, Templeton AA, McNeilly AS, Baird DT. Gonadotropic stimulation of inhibin secretion by the human ovary during the follicular and early luteal phase of the cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988;66:915-921
122. Boland MP, Kane M, Headon DR, Williams DH, Goulding D, Sunderland SJ, Roche JF. Persistence of increased ovulation rate in ewes immunized against the  $\alpha$ 1-26 fragment of inhibin. *J. Reprod. Fertil* 1995; Abstr Series No. 15:21 abstr.
123. Wrathall JHM, McLeod BJ, Glencross RG, Beard AJ, Knight PG. Inhibin Immunoneutralisation by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin subunit: effects on gonadotrophin concentration and ovulation rate in sheep. *J. Endocrinol.* 1990;124:167-176
124. Glencross RJ, Bleach ECL, McLeod BJ, Beard AJ, Knight PG. Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 1994;100:599-605
125. Schanbacher BD, Schemm SR, Rhind SM. Gonadotrophin concentrations and ovulation rates in Suffolk ewes actively or passively immunized against inhibin alpha. *J. Reprod. Fertil* 1991;93:133-139
126. Mantovani R, Enright WJ, Roche JF, Boland MP. The effect of immunization of heifers against  $\alpha$  1-26 inhibin conjugate on the superovulatory response to pFSH. *Theriogenology* 1997;47:511-519
127. Anderson. Increased ovulation rate in Merino ewes immunized against small synthetic peptide fragments of the inhibin  $\alpha$ 102 subunit. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10:5
128. Shelton M. The influence of the presence of the male goat in the initiation of Oestrus and ovulation in goats: Influence of various exteroceptive factors on initiation of oestrus cycling and ovulation in Angora does. *Journal of Animal Science.* 1960;19:368-375
129. Underwood EJ, Shier FL, Davenport N. Studies in sheep husbandry in western Australia. V. The breeding season of Merino crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. *Journal of the department of agriculture of west Australia.* 1994;11:135-143
130. Folch J, Cognie Y, Signoret JP. Use of the male effect manipulation for the timing of onset and establishment of regular cycles and pregnancy in the ewe. In: Bros GB-G, editor. 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European association for animal production; 1985; Kallithea-Kassandra-Halkindiki-Greece; 1995:122-123
131. Martin GB, Oldham CM, Cognie Y, Pearce DT. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams. A review. *Livestock Production Science.* 1986;15:219-247
132. Heape W. Abortion, barrenness and fertility in sheep. *Journal of the Royal Agricultural Society* 1899;10:217-248

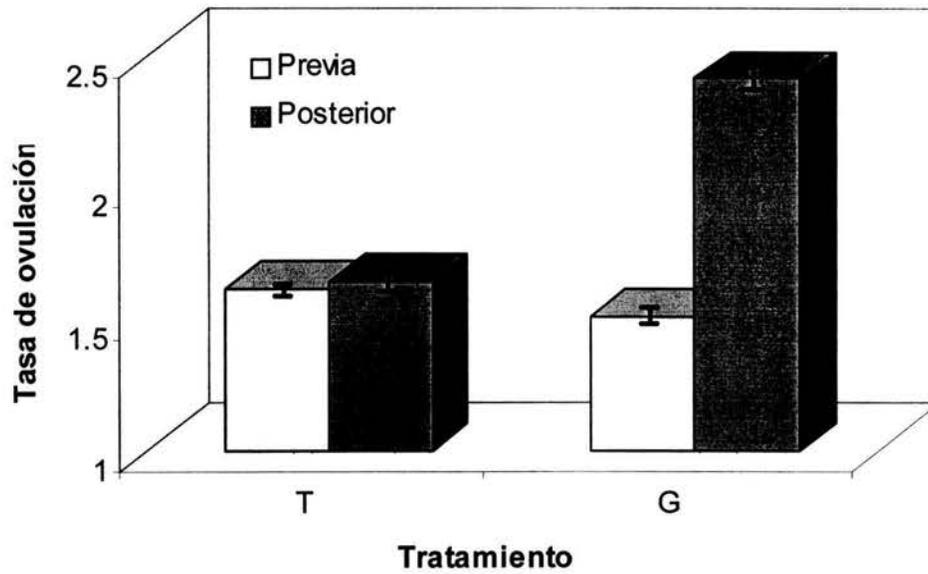
133. Coop IE. Liveweight-productivity relationships in sheep. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 1962;5:249-264
134. Morley FHW, White DH, Kenney PA, Davis IF. Predicting ovulation rate from liveweight in ewes. *Agricultura Systems* 1978;3:27-45
135. Nottle MB, Kleemann DO, Seamark RF. Effect of previous undernutrition on the ovulation rate of Merino ewes supplemented with lupin grain. *Anim. Reprod. Sci.* 1997;49:29-36
136. Wilkins JF; Method of stimulating ovulation rate in Merino ewes may affect conception but not embryo survival. *Animal Reproduction Science* 1997;47:31-42
137. Nottle MB, Kleeman DO, Grosser TI, Seamark RF. Evaluation of a nutritional strategy to increase ovulation rate in Merino ewes mated in late spring-early summer. *Animal Reproduction Science* 1997; 47:255-261
138. Branca A, Molle G, Sitzia M, Decandia M, Landau S. Short-term dietary effects on reproductive wastage after induced ovulation and artificial insemination in primiparous lactating Sarda ewes. *Animal Reproduction Science.* 2000;58:59-71
139. Molle G, Landau S, Branca A, Sitzia M, Fois N, Ligios S, Casu S. Flushing with soybean meal can improve reproductive performances in lactating Sarda ewes on a mature pasture. *Small Ruminant Research.* 1997;24:157-165
140. Molle G, Branca A, Ligios S, Sitzia M, Casu S, Landau S, Zoref Z. Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in sarda ewes. *Small Ruminant Research* 1995;17:245-254
141. Bronson FH. Energy balance and ovulation: small cages versus natural habits. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10:2
142. Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 2001;68:29-43
143. Whitley NC, McFadin-Buff EL, Keisler DH. Effect of insulin on feed intake and reproductive performance of well-nourished nulliparous ewes. *Teriogenology.* 2000;54:1049-1054
144. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1996;1:3418-3423
145. Keisler DH, Daniel JA, Morrison CD. The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 1999;54:425-435
146. Howland BE, Kirkpatrick RL, Pope AL, Casida LE. Pituitary and ovarian function in ewes fed on two nutritional levels. *Journal of Animal Science* 1966;25:716-721
147. Bellows RA, Pope AL, Meyer RK, Chapman AB, Casida LE. Physiological mechanisms in nutritionally-induced differences in ovarian activity of mature ewes. *Journal of Animal Science* 1963;22:93-100
148. Rhind SM, Leslie LD, Gunn RG, Doney JM. Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of Cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive performance. *Animal Reproduction Science* 1985;8:301-313
149. Rhind SM, Martin GB, McMillen S, Tsonis CG, McNeilly AS. Effect of level of food intake of ewes on the secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) and on the pituitary response to gonadotrophin releasing hormone (GnRH) in ovariectomized ewes. *Journal of Endocrinology* 1989;121:325-330
150. Rhind SM, McMillen S, Wetherill GZ, McKelvey WAC, Gunn RG. Effects of low levels of food intake before and/or after mating on gonadotrophin and progesterone profiles in Greyface ewes. *Animal Production* 1989;49:267-273
151. Spicer LJ, Enright WJ, Murphy MG, Roche JF. Effect of dietary intake on concentrations of insulin-like growth factor-I in plasma and follicular fluid, and ovarian function in heifers. *Domestic animal endocrinology* 1991;8:431-437

152. Short RE, Adams DC. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. *Can. J. Anim. Sci.* 1988;68:29-39
153. Rabiee AR, Lean IJ. Uptake of glucose and cholesterol by the ovary of sheep and cattle and the influence of arterial LH concentrations. *Animal Reproduction Science* 2000;64:199-209
154. Downing JA, Scaramuzzi RJ. The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulatory rate and on plasma concentrations of LH, FSH and glucose in ewes. *Theriogenology* 1997;47:747-759
155. Downing JA. Interactions of nutrition and ovulation rate in ewes. Ph.D. Thesis, Macquarie University, Australia
156. Millar DW, Blache D, Martin GB. The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotropin secretion in mature male sheep. *Journal of endocrinology* 1995;147:321-329
157. Echternkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF, Hammond JF. Concentrations of insulin-like growth factor-1 in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biology of Reproduction* 1990;43:8-14
158. Spicer LJ, Echternkamp SE, Canning SF, Hammond JF. Relationships between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biology of Reproduction* 1988;39:573-580
159. Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to FSH and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* 1997;56:608
160. Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentration of LH, FSH, GH, prolactin and insulin in ewes infused with tryptophan, tyrosine or tyrosine plus phenylalanine during the luteal phase of the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science* 1997;45:283-297
161. Martínez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Mapletoft RJ. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology* 2000;54:757-769
162. Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martínez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 1995;39:193-204
163. Garcia A. Effect of estrus synchronization with estradiol valerate or estradiol 17  $\beta$  and progesterone on follicular wave dynamics in dairy heifers. Ph.D. Thesis 1998. Utrecht University, The Netherlands; Martínez MF
164. Meikle A, Forsberg M, Garófalo EG, Carlsson MA, Lundeheim N, Rubianes E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 $\beta$ . *Animal Reproduction Science* 2001;67:79-90
165. Foster DW. Diabetes mellitus. In Braunwald E, et al (Editors). *Harrison's textbook of internal medicine*. 11th ed. New York, USA: Yorke medical books, 1987
166. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patología estructural y funcional II*. 4a ed. Madrid, España: Interamericana/McGraw-Hill, 1990

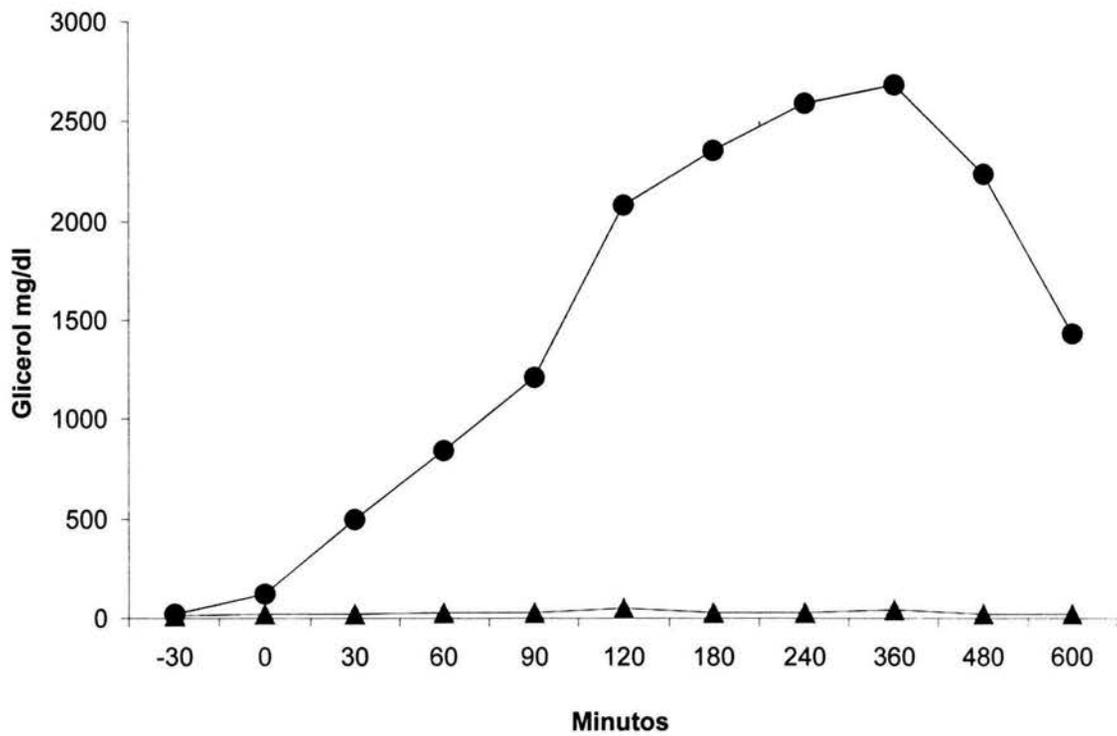
## 12. ANEXO I



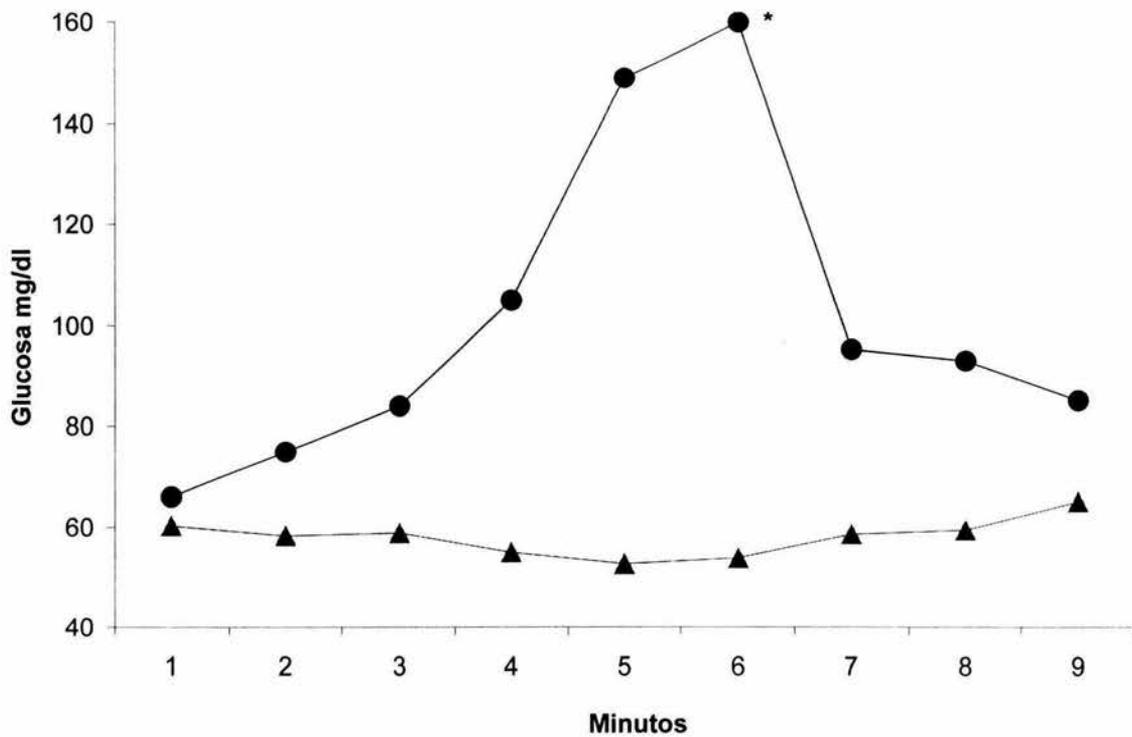
**Figura 1.** Tasa de ovulación previa y en respuesta al tratamiento (glicerol), o no (testigo), con 300 ml de solución glucogénica oral compuesta de glicerol:agua (90:10 v/v). El tratamiento se aplicó al momento de la sincronización del estro con PGF2 $\alpha$ . Se encontró diferencia estadística en la tasa de ovulación del grupo glicerol con el testigo y con la tasa de ovulación previa ( $P < 0.0001$ ).



**Figura 2.** Tasa de ovulación previa y posterior al tratamiento con glicerol (G) al momento de la luteólisis. Se encontró diferencia estadística entre la tasa de ovulación previa y posterior ( $P < 0.02$ ). La tasa de ovulación posterior del grupo G fue estadísticamente diferente a la del grupo T ( $P < 0.01$ ).



**Figura 3.** Concentraciones de glicerol sanguíneo en el grupo testigo (▲) y en el grupo glicerol (●) (tratado don 300 ml de solución de glicerol al 90% en forma oral), desde 30 minutos previos hasta 600 minutos posteriores al tratamiento.



**Figura 4.** Concentraciones de glucosa sanguínea en el grupo testigo (▲) y en el grupo glicerol (●) (tratado con 300 ml de solución de glicerol al 90% en forma oral), desde 30 minutos previos hasta 600 minutos posteriores al tratamiento. \* Los valores estuvieron por arriba del límite de detección del ensayo.