



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESQUEMAS DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACIÓN
CON MICROBOMBAS OSMÓTICAS EN OVEJAS
DOMÉSTICAS COMO MODELO PARA HEMBRAS CIMARRÓN

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MANUEL PÉREZ MEDINA

Asesores:

Dr. Vicente Octavio Mejía Villanueva
MVZ MC. José de Jesús Núñez Saavedra
MVZ MC. Juan Arturo Rivera Rebolledo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

| | Página |
|-----------------------------|--------|
| RESUMEN----- | 1 |
| ABSTRACT----- | 2 |
| INTRODUCCIÓN----- | 3 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA----- | 5 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS----- | 28 |
| MATERIAL Y MÉTODOS----- | 29 |
| RESULTADOS----- | 36 |
| DISCUSIÓN----- | 40 |
| CONCLUSIONES----- | 46 |
| REFERENCIAS----- | 47 |

ESQUEMAS DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACIÓN CON MICROBOMBAS OSMÓTICAS EN OVEJAS DOMÉSTICAS COMO MODELO PARA HEMBRAS CIMARRÓN (Bajo la dirección de: Dr. Octavio Mejía Villanueva, MVZ M en C. Juan Arturo Rivera Rebolledo y MVZ M en C. Jesús Núñez Saavedra). **Apoyado por PAPIIT IN222706-3.**

RESUMEN

Como modelo para producir embriones en borregas cimarrón, se probaron cuatro esquemas de sincronización y superovulación en 21 ovejas domésticas. T I: sincronización con FGA durante 16 días y superovulación con 290 mg de FSH en 6 aplicaciones IM, en esquema constante; T II: sincronización con FGA 16 días, superovulación con 290 mg de FSH en 4 microbombas osmóticas SC más 90 mg IM; T III: sincronización con FGA 16 días y superovulación con 200 mg de FSH en 3 microbombas osmóticas más 50 mg IM; T IV: sincronización con FGA durante 12 días y superovulación con 200 mg de FSH, en 6 aplicaciones IM, en esquema decreciente. En todos los tratamientos, al retirar la esponja, se aplicaron 200 UI de eCG. La detección de estro se realizó cada 3 h y las ovejas recibieron monta natural dirigida cada 6 h, mientras permanecieron receptivas. La recolección de los embriones se realizó mediante laparotomía medio ventral el día 6 posterior a la primera monta. En la respuesta a la sincronización no se reportaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), considerando el tiempo y la proporción de hembras en estro, Se evaluó la respuesta a la superovulación contando el número de cuerpos lúteos y clasificándolos en normales o en regresión. Las estructuras recolectadas fueron clasificadas morfológicamente en ovocitos o embriones. El promedio de embriones fue significativamente mayor en T III (5.20 ± 0.58) y T IV (6.67 ± 0.80) ($P < 0.05$). En el número de ovocitos se reportaron diferencias significativas en T I (7.7) y T II (6.8) ($P < 0.05$). En el número de cuerpos lúteos y estructuras totales no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$). En el porcentaje de recuperación se encontraron diferencias significativas entre T I (53.42%), T II (73.68%) y T III (53.06%) ($P < 0.05$).

SCHEMES OF SYNCHRONIZATION AND SUPEROVULATION WITH MICRO-OSMOTIC PUMPS IN DOMESTIC EWES AS MODEL FOR BIGHORN EWES

Abstract

As model to produce embryos in bighorn ewes, four synchronization and superovulation schemes were proved in 21 domestic ewes: T I: synchronization FGA during 16 days and superovulation with 290 mg of FSH in 6 equal doses IM. T II: synchronization FGA during 16 days and superovulation with 290 mg of FSH in 4 micro-osmotic pumps SC plus 90 mg IM; T III: synchronization FGA during 16 days and superovulation with 200 mg of FSH in 3 micro-osmotic pumps plus 50 mg IM; T IV: synchronization FGA during 12 days and superovulation with 200 mg of FSH, in 6 decreasing IM, in decreasing application. At the moment of put out the sponge, in the whole treatments, 200 UI of eCG were applied. Detection estrus was made every 3 h and ewes received natural directed mount every 6 h, while they remained receptive. Embryo recovery was carried out by midventral laparotomy the sixth day after the first mount. In response to the synchronization, there were not reported significant differences between treatments, considering the time and the proportion of females in estrus ($P < 0.05$). The response to the superovulation was evaluated by counting corpus luteum and classified them in normal or regressing. The collected structures were classified morphologically in ovum or embryos. The embryos average was significantly higher in T III (5.20 ± 0.58) and T IV (6.67 ± 0.80), in comparison with T I (2.00 ± 0.91) and T II (1.60 ± 0.68). The number of ovum were reported significant differences in T I (7.7) y T II (6.8) ($P < 0.05$). In the number corpora lutea and total structures did not differ ($P < 0.05$). However, in the percentage of recovered embryo significant differences were found between T I (53.42%), T II (73.68 %) and T III (53.06 %) ($P < 0.05$).

INTRODUCCIÓN

El borrego Cimarrón es un digno exponente de la llamada megafauna carismática de nuestro país y es altamente apreciado regional, nacional e internacionalmente por su importancia científica y cultural, así como por su gran belleza. Ha sido un animal valorado por su porte y costumbres entre las culturas del norte de México, las que lo han convertido en piezas de alto valor cinegético.¹

Actualmente se encuentra en situación de riesgo ya que el desmedido crecimiento de la población humana, la caza irracional, el elevado índice de muerte en las crías, la exposición a diferentes enfermedades transmitidas por especies domésticas que han sido introducidas a su territorio,² la competencia por el alimento con estas especies, la destrucción y fragmentación de su hábitat, conforman un complejo de situaciones que han puesto a esta especie, en grave peligro de extinción.^{3,4}

En México, la protección de esta especie se remonta a principios del siglo pasado, con el establecimiento de vedas y programas de vigilancia, no obstante, estas políticas han resultado insuficientes, por lo que hoy en día se exigen nuevas perspectivas de conservación acordes con la situación ecológica y social imperante.⁵ Así, se ha propuesto comenzar por proteger los ecosistemas (conservación *in situ*), pero de igual manera, se deben proteger a las poblaciones de especies que se encuentran fuera de éstos, como en en zoológicos, reservas o UMA's (conservación *ex situ*). Para ello, actualmente se fomenta el establecimiento y desarrollo de técnicas de reproducción asistida, por ejemplo, la creación de bancos de germoplasma mediante la criopreservación de células y tejidos; la inseminación artificial; la fertilización *in vitro* y la transferencia de embriones.⁶ En nuestro país, esta última, se ha empleado para el mejoramiento genético de especies domésticas, asimismo, en pequeños rumiantes se utiliza para multiplicar rápidamente algunas razas de particular interés, como los ovinos

de raza Dorper y las cabras raza Boer.⁷ El uso de éstas técnicas en la conservación de fauna silvestre amenazada o en peligro de extinción representan opciones viables en el corto y mediano plazo, como ejemplo se pueden citar los trabajos realizados con el Lobo Mexicano (*Canis lupus baileyi*) y el Tití León Dorado (*Leontopithecus rosalia*). Por lo cual se estima que la aplicación de técnicas de reproducción asistida pudiera ser una herramienta útil para la preservación del borrego Cimarrón,^{8,9} consecuentemente en el presente trabajo, se probaron esquemas de sincronización y superovulación en ovejas domésticas, como modelo para producir embriones en hembras Cimarrón.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

El borrego Cimarrón en México

El borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) pertenece al orden *Artiodactyla*, a la familia *Bovidae*, a la subfamilia *Caprinae* y al género *Ovis*. Es un digno exponente de la llamada megafauna carismática de nuestro país y se encuentra dentro de las 14 especies de fauna consideradas en México como prioritarias por el Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural establecido en 1997 por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales; bajo el estatus de protección especial por la NOM- 059-ECOL 2001¹⁰ y dentro de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), en el apéndice II al ser una especie amenazada por la extinción.¹¹ Se estima que actualmente existen en la Península de Baja California y en el extremo occidental del estado de Sonora, entre 5,000 y 8,800 borregos Cimarrón de tres subespecies, que fueron clasificadas por la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN), en diferentes categorías de riesgo. De tal manera, se considera como vulnerable a la *Ovis canadensis mexicana*; como en peligro de extinción a la *Ovis canadensis cremnobates*, y como críticamente en peligro de extinción a la *Ovis canadensis weemsi*.¹²

La reducción en el número de borregos Cimarrón y de muchas otras especies ha sido originada históricamente por la fragmentación y destrucción del hábitat, que, generalmente, es resultado del mal empleo de recursos naturales, como agua o suelo, en actividades agrícolas y ganaderas, utilizadas para la producción de alimento para consumo humano.^{3, 4} La ganadería extensiva implica la competencia por alimento y el riesgo de transmisión de enfermedades del ganado doméstico hacia los borregos silvestres, lo cual constituye un grave problema, ya que los animales silvestres

presentan una baja o nula respuesta inmune ante estas enfermedades.² Otra causa importante de la disminución de borregos Cimarrón en México, es la cacería ilegal o furtiva, que no se conforma sólo con animales viejos sino también con hembras y crías. Debido a la gran demanda de esta especie, se ha reconocido la existencia de un mercado ilícito, en el que un ejemplar se llega a cotizar hasta los 200 mil dólares y el costo promedio de la cacería de un borrego Cimarrón adulto en 60 mil dólares.¹

Uso de técnicas de reproducción asistida como herramienta de conservación

Con el objetivo de conservar la biodiversidad, se ha propuesto comenzar por proteger los ecosistemas, es decir, practicar la conservación *in situ*. De igual manera, se deben proteger a las poblaciones de especies que se encuentran fuera de éstos, como en en zoológicos, reservas o UMA's mediante la implementación de programas de conservación *ex situ*.⁶ Para ello, se fomenta actualmente el establecimiento y desarrollo de técnicas de reproducción asistida, entre las que se encuentran la criopreservación de células y tejidos, para crear bancos de germoplasma; la inseminación artificial; la fertilización *in vitro* y la transferencia de embriones.^{8, 9} En general, estas técnicas ofrecen las siguientes ventajas:¹³

- Facilitan el transporte de material genético y disminuyen los costos de movilizar animales vivos.
- Extienden el intervalo generacional, ya que la diversidad genética sólo se pierde cuando los animales no pueden reproducirse. Por lo tanto, al criopreservar el germoplasma de un animal, puede utilizarse en el futuro. Asimismo, a partir de este material genético pueden hacerse estudios genéticos que proporcionen información valiosa para la conservación de la especie.

- Aumentan la eficiencia reproductiva en cautiverio, porque permiten maximizar la diversidad genética cuando se manejan de forma cuidadosa las poblaciones de especies en peligro de extinción o amenazadas.
- Resuelven problemas de espacio en los zoológicos; además evitan que más animales sean extraídos de vida libre para mantener la diversidad genética de las poblaciones en cautiverio.

Evidentemente, tanto la conservación *ex situ*, como algunas de las técnicas de reproducción asistida desarrolladas en ella, tienen desventajas y limitaciones, por ejemplo:¹³

- Para que una población en cautiverio se mantenga por sí misma necesita tener algunos cientos de animales, lo cual generalmente se consigue después de varios años.
- Los animales mantenidos en cautiverio por generaciones, se adaptan al confinamiento y pueden sufrir cambios en la conducta social e individual que posteriormente, representarán un conflicto para su reintegración a vida libre.
- Los individuos pierden habilidades necesarias para la supervivencia, que debían ser aprendidas de sus padres, siendo los más comúnmente afectados los mamíferos sociales y las aves.
- Los esfuerzos de conservación *ex situ* requieren del seguimiento de planes a largo plazo, inversión económica alta y apoyo gubernamental, lo que, por lo general, no ocurre.
- Al intervenir favoreciendo la reproducción de animales que de forma natural posiblemente no lo lograrían, los descendientes pueden no ser los animales mejor adaptados al medio silvestre, lo que interfiere, sin duda, en la selección natural de la especie.

Aplicación de técnicas de reproducción asistida en ovejas domésticas como modelo animal para la conservación del borrego Cimarrón

Para establecer técnicas de reproducción asistida en animales, es necesario describir con detalle eventos reproductivos como época de reproducción y anestro, gestación o el ciclo estral. Para ello, se han desarrollado métodos no invasivos, que permiten monitorear tanto en cautiverio como en vida libre el estatus reproductivo, con observaciones de la conducta o mediante la cuantificación de hormonas. El radioinmunoanálisis (RIA) y el enzimoimmunoanálisis (EIA) son técnicas que se fundamentan en el uso de anticuerpos específicos para cuantificar hormonas o sus metabolitos conjugados y/o no conjugados, circulantes en sangre o excretados en orina o heces.¹⁴ La observación conductual y la cuantificación hormonal han permitido detectar madurez sexual, ciclo estral, gestación o anestro, en diferentes especies silvestres.¹⁵ En México, se han realizado diferentes trabajos con borregos Cimarrón con el fin de determinar época de reproducción o anestro estacional, estro y gestación. Por ejemplo Soto (2006)¹⁶ y Rodríguez (2007)¹⁷ monitorearon y correlacionaron la conducta reproductiva con los niveles de P_4 y E_2 en heces de borregas Cimarrón mantenidas en cautiverio. Así, estos estudios clasifican a las hembras Cimarrón como poliéstricas estacionales ya que muestran varios ciclos durante una misma estación reproductiva, la cual fue reportada con 8 meses de duración. Asimismo señalan que el ciclo estral, determinado por la observación de montas no fértiles, dura 29 ± 5 días con una etapa de receptividad sexual (estro) de 1 o 2 días. Aunque dichos trabajos no generaron información concluyente sobre la duración de cada una de las etapas del ciclo estral en las hembras Cimarrón en cautiverio, sí fue posible la observación de similitudes con respecto al ciclo estral de ovejas domésticas. Es decir, las oscilaciones

en los niveles hormonales detectadas en las heces de borregas Cimarrón durante el ciclo son semejantes a las observadas en ovejas domésticas. Estas semejanzas, junto con otros factores entre los que se pueden mencionar el reducido número de borregos silvestres en cautiverio, lo riesgoso de su contención y manejo físico, el acceso limitado a poblaciones en vida libre y, principalmente, la falta de información sobre los aspectos reproductivos del borrego Cimarrón, han suscitado el uso de ovejas domésticas como modelo de experimentación para una posterior implementación de programas de conservación con técnicas de reproducción asistida en las hembras Cimarrón.

Control artificial de la reproducción en ovinos domésticos

Ciclo estral

El conocimiento de los perfiles endocrinos relacionados con diferentes eventos ováricos y uterinos que suceden durante el ciclo estral es fundamental en programas de reproducción animal aplicada, tendientes a modificar el ambiente hormonal y consecuentemente, la fisiología del aparato reproductivo.¹⁸

El ciclo estral es el periodo de tiempo comprendido entre un estro y el siguiente, en la oveja doméstica dura en promedio 17 días.¹⁹ Se puede dividir en dos fases: una fase folicular que se caracteriza por el desarrollo y maduración folicular y posterior ovulación, con alta concentración de estrógenos, y una fase lútea donde se da el desarrollo y maduración del cuerpo lúteo con alta concentración de progesterona. Tradicionalmente, se ha subdividido la primera fase en proestro y estro, y la segunda en metaestro y diestro.¹⁸

El estro es la única etapa del ciclo en el que la oveja manifiesta conducta sexual activa y su signo característico es la aceptación del macho; también es llamado celo o calor, y ocurre entre la mitad y el final de la fase folicular del ciclo; los signos clínicos y de conducta que se manifiestan en esta etapa se deben a la alta cantidad de estrógenos que son secretados por los folículos en proceso de ovulación. Usualmente, la oveja doméstica en celo, puede orinar al acercarse al macho, mover la cola insistentemente y balar con frecuencia.¹⁸

Durante las dos fases del ciclo, las gonadotropinas influyen en diferentes eventos ováricos como son el desarrollo y maduración folicular y del ovocito, la ovulación así como la formación y plena funcionalidad del cuerpo lúteo. La regulación en la síntesis y secreción de gonadotropinas implica un balance delicado y complejo entre hormonas

del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el cual, regula el desarrollo de los folículos ováricos y el cuerpo lúteo.¹⁹ La secreción de las gonadotropinas, por los gonadotrofos de la hipófisis anterior, como son la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), es regulada por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos. La liberación de LH de la hipófisis anterior ocurre como respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH.), secretada por el hipotálamo. Los pulsos de LH de la hipófisis, ocurren en sincronía con los pulsos de GnRH de las neuronas hipotalámicas en las ovejas y vacas. Uno de los principales factores que regulan los cambios de secreción de LH son los esteroides ováricos que funcionan en el eje hipotálamo-hipófisis durante el ciclo estral. Los mecanismos de retroalimentación de los esteroides ováricos, por lo tanto, están asociados con la función neuroendocrina de hipotálamo y la función endocrina de la pituitaria, para regular la función ovárica durante el ciclo estral.¹⁹

Manipulación del ciclo estral

Sincronización

El conocimiento de las bases endocrinas de la reproducción y de los mecanismos que regulan la secreción hormonal ha posibilitado el control del ciclo estral de las ovejas por medio de programas de sincronización, los que facilitan el uso de otras técnicas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones, mediante las cuales se logra un mayor aprovechamiento del potencial genético de los animales.²⁰

La sincronización del ciclo estral es una opción desarrollada para incrementar la eficiencia reproductiva de los animales, se realiza en las hembras que se encuentran ciclando naturalmente durante la época reproductiva, con la finalidad de que un grupo de ellas presente estro en forma simultánea.²¹ Así, se obtiene un adecuado control de la temporada de empadre y concentra los partos en periodos de tiempo más cortos, favoreciendo un manejo uniforme de los animales.²² Una vez sincronizado el ciclo estral, a las hembras se les da monta natural dirigida o se les insemina artificialmente.²³

La sincronización del estro se puede lograr a través de métodos naturales y farmacológicos. Dentro de los farmacológicos, algunos pueden usarse casi en cualquier época del año, como son la progesterona natural o sintética (progestágenos); además existen otros fármacos de acción luteolítica como la prostaglandina F2 alfa (PGF₂α); sin embargo, esta se utiliza exclusivamente en época de reproducción, ya que depende de la presencia de un cuerpo lúteo funcional.²⁰

En diversas investigaciones se han observado grados variables de sincronización utilizando progestágenos por diferentes vías, siendo el más común el uso de acetato de fluorogestona (17α-acetoxy-9α-fluro-11β-hydroxy-pregn-4-ene-3,20-dione),²⁴

dosificado a través de esponjas que se colocan en la vagina de la hembra durante 9 a 14 días, ya que se necesita que sus niveles circulantes se mantengan de forma sostenida durante varios días.²⁵ De igual manera, se han desarrollado otros métodos que no requieren la utilización masiva de mano de obra y sin embargo, permiten la administración continua de los fármacos; así se han descrito formas de aplicación como la vía intramuscular, oral y subcutánea.²⁶

La administración de acetato de fluorogestona (FGA) simula la presencia del cuerpo lúteo mediante la liberación lenta de progesterona; provoca, por retroalimentación negativa, que se suprima la secreción de GnRH a nivel hipotalámico y produce una disminución en la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, limitándose así el desarrollo folicular.²⁵ Al retirar la esponja y con ello interrumpirse la administración del progestágeno, cesa la retroalimentación negativa y la hipófisis incrementa la liberación de gonadotropinas, con lo cual se estimula el crecimiento folicular por acción de la FSH y se presenta la ovulación por efecto de la LH,²³ en un lapso de 24 a 36 horas después de terminado el tratamiento.²⁷

La progesterona natural y los progestágenos, como la FGA, son administrados comúnmente en rumiantes pequeños y grandes, durante el número de días que dura la fase de diestro, siendo ésta en ovejas domésticas de alrededor de 10 días, es decir, alrededor de dos terceras partes de la duración total del ciclo estral.²⁶ En consecuencia, si se conoce que en las borregas Cimarrón, el ciclo estral completo dura alrededor de 28 ± 3 días,²⁸ es probable que la fase de diestro, en esta especie, dure alrededor de 16 días. En algunos trabajos se ha señalado que una de las principales desventajas de los progestágenos, es que su utilización por más de 14 días puede resultar en una baja fertilidad del estro inducido.²¹ La baja fertilidad ha sido atribuida a un deficiente transporte de gametos dentro del cérvix, los cuernos uterinos y el oviducto;^{29, 30} así

como a la ovulación de un ovocito desarrollado y mantenido en un folículo con un mayor número de días de haberse formado, en relación a un ciclo natural, cuya consecuencia sería la ovulación de un ovocito relativamente viejo.^{29, 30} También hay trabajos recientes en ovejas, que indican que los progestágenos pueden ser usados durante periodos largos sin afectar la fertilidad, ya que gracias al uso de la ultrasonografía de imagen, han demostrado que el posible efecto negativo se debe a una disminución en las concentraciones del progestágeno exógeno, la cual puede originar secreción de gonadotropinas, la presentación de una oleada de desarrollo folicular y un desbalance hormonal, originado por niveles ascendentes de estradiol, y que proponen, por lo tanto, la sustitución de la esponja colocada inicialmente por una nueva^{31,32, 33, 34, 35}

Dentro de la sincronización del ciclo estral por medio de fármacos también se ha empleado la $PGF_2\alpha$; ésta es una sustancia orgánica que se produce en el útero a partir del ácido araquidónico,³⁶ y se libera en forma pulsátil para producir la lisis del cuerpo lúteo.³⁷ Cuando se administra $PGF_2\alpha$ a partir del día 5 del ciclo estral de la oveja, las células lúteas ya pueden responder a su acción, produciéndose la lisis del cuerpo lúteo, la cual se completa entre 12 y 24 horas de aplicada, presentándose el estro entre 36 y 44 horas post inyección. Este método de sincronización presenta varias limitantes, ya que no puede utilizarse antes del día 5 del ciclo porque no hay cuerpos lúteos funcionales. Además, en la oveja se ha informado de una incidencia relativamente alta de fallas en la regresión lútea cuando se aplica entre el día 8 y 11 del ciclo estral, lo que hace necesario recurrir a tratamientos en los cuales se utilizan dos inyecciones con varios días de separación, o tratamientos combinados con progestágenos.³⁰

Superovulación

La superovulación es una técnica que se ha utilizado en la oveja para incrementar la producción de ovocitos viables.³⁸ Esta técnica es de gran utilidad para la producción de embriones genéticamente superiores.³⁹

Entre las hormonas más utilizadas para lograr la ovulación múltiple se encuentran la hormona folículo estimulante (FSH) y otras hormonas que en dosis altas tienen un efecto similar a la FSH, como la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina menopáusica humana (hMG).^{40, 41}

La FSH es la responsable del crecimiento y de la selección del folículo destinado a ovular.⁴¹ Se conoce que la aplicación exógena de FSH causa que los folículos destinados a sufrir atresia maduren hasta una etapa preovulatoria. Tanto la LH como la FSH tienen una importante repercusión sobre la actividad esteroidogénica del folículo, ya que cuando la LH se acopla a sus receptores en las células de la teca, se producen una serie de cambios bioquímicos encaminados a sintetizar andrógenos a partir del colesterol. Dichos andrógenos son subsecuentemente convertidos en estradiol en las células de la granulosa, por efecto de un proceso de aromatización estimulado por el acople de la LH a sus receptores.⁴¹ Los estrógenos producidos por el folículo actúan en forma sinérgica con la FSH, ya que, junto con los niveles elevados de FSH exógena, estimulan la mitosis de las células de la granulosa y la síntesis de receptores para LH en estas células, permitiendo que un continuo número de folículos maduren hasta el estado ovulatorio, y produciendo así la superovulación.⁴²

Se prefiere utilizar la FSH para la superovulación en comparación con hormonas como la gonadotropina coriónica equina (eCG), ya que resulta en un mayor número de ovulaciones, menor número de folículos anovulatorios y más embriones recuperados y de mejor calidad,⁴³ además de producir una respuesta lútea más aceptable y

consistente.⁴⁴ Debido a que la FSH tiene una vida corta, requiere frecuentes aplicaciones parenterales, para mantener las concentraciones sanguíneas suficientes para afectar la respuesta ovárica. Para ello se han ensayado una gran cantidad de esquemas de superovulación con FSH, en donde se administra cada 12 horas, durante tres o cuatro días, en dosis constantes o decrecientes,^{41,45} que varían entre 180 y 200 mg.^{38, 46} Aunque existen reportes que indican que en pequeños rumiantes, dosis de FSH mayores a los 180 mg, pueden originar la formación de folículos anovulatorios, de cuerpos lúteos con lisis prematura, la recuperación de un mayor número de ovocitos y en consecuencia, de un menor número de embriones.^{47,48}

Otro esquema de aplicación utilizado por Dattena *et al* (1994), consistió en la administración intramuscular de una dosis única de FSH disuelta en un vehiculo de larga acción (polivinilpirrolidona), obteniendo resultados similares a los tratamientos tradicionales de varios días con dosis decrecientes.

En pequeños rumiantes también se ha ensayado la superovulación con gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual es una compleja hormona glicoprotéica en cuanto a su estructura de carbohidratos, con un alto contenido de ácido siálico, que es responsable de la vida media larga de la molécula, por lo que una sola inyección de eCG tiene efectos biológicos en la glándula blanco por más de una semana.^{20, 49, 50, 51, 52, 53}

Asimismo, contiene subunidades alfa y beta similares a las de la LH y la FSH, que le confieren efectos similares a los de estas otras gonadotropinas, principalmente de LH en dosis bajas (200 a 500 UI) y de FSH en dosis altas (750-1500 UI). La eCG favorece la maduración final del o de los folículos preovulatorios, incrementa la producción de estradiol, induce la aparición del pico preovulatorio de LH, y en consecuencia aumenta la tasa de ovulación.^{49, 54} Una vez sincronizado el estro, la eCG se puede aplicar intramuscularmente o subcutáneamente, 48 horas antes de concluir con el tratamiento o

bien al momento de retirar el implante intravaginal.⁵⁴ Generalmente, la mayoría de las ovejas presentan el estro entre las 24 y 36 horas después de finalizado el tratamiento de sincronización.^{24, 54}

Al parecer el efecto superovulatorio que se logra mediante la utilización de dosis altas de eCG, se debe a que esta hormona ocupa los receptores de FSH en el folículo. De esta manera, se logra un incremento en la tasa de ovulación mediante el reclutamiento de pequeños folículos menores a 2 mm de diámetro, en los cuales se aumenta la tasa de crecimiento, además de estimularse el crecimiento sostenido de folículos grandes (mayores de 4 mm de diámetro). Así, se logra un incremento en la tasa de desarrollo folicular, alterando el tamaño y distribución de folículos grandes en el ovario.⁴¹

A pesar de que al utilizar en rumiantes pequeños eCG, como tratamiento superovulatorio y de que se requiere de una sola aplicación, de entre 750 a 1500 UI, su uso no es del todo recomendable, ya que se produce un fuerte incremento en el número de ovocitos no fertilizados.^{56, 57, 58}

Otra desventaja que se ha observado al usar eCG como tratamiento superovulatorio, es que al tener una vida media muy larga, continúa estimulando el desarrollo folicular durante varios días, lo cual ocasiona que a nivel ovárico se continúen desarrollando pequeños folículos después de ocurrida la superovulación. Estos folículos pueden persistir hasta el momento en que se realiza el lavado para la recolección de embriones, y al parecer, los estrógenos producidos por estos folículos anovulatorios, causan regresión prematura de cuerpos lúteos.^{59, 60} Se cree que las concentraciones, relativamente bajas de estradiol, producidas por estos pequeños folículos pueden ser suficientes para desencadenar la secreción prematura de PGF_2 .^{60, 61} ya que el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina en el endometrio, con lo cual, la oxitocina puede estimular al secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ endometrial.⁶²

Luteólisis y mecanismos asociados a la regresión prematura del cuerpo

lúteo

Aunque los mecanismos precisos que regulan la síntesis y secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ no están completamente aclarados, se sabe que el estradiol y la oxitocina juegan un papel sumamente importante en la generación de los pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$.⁶³ El estradiol de origen ovárico, proveniente de los folículos presentes durante la segunda mitad de la fase lútea, estimula la síntesis de receptores para oxitocina de origen lúteo e hipotalámico en el endometrio, lo que permite la unión de la oxitocina con sus receptores y desencadena la síntesis de $\text{PGF}_2\alpha$ por el útero. La $\text{PGF}_2\alpha$ a su vez estimula la liberación de más oxitocina por el cuerpo lúteo. De la misma manera, la oxitocina puede promover la secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ uterina, por lo que se establece un ciclo de retroalimentación positiva entre ellas.⁶² Los receptores para oxitocina son destruidos después de su unión con la oxitocina tanto de origen lúteo como hipotalámico y como la recuperación de estos receptores tarda alrededor de 6 horas,⁶² la $\text{PGF}_2\alpha$ se libera en pulsos de la misma frecuencia.³⁷ Estos pulsos frecuentes de $\text{PGF}_2\alpha$ suprimen la función del cuerpo lúteo y originan su destrucción.^{62, 64, 65, 66}

En diferentes trabajos se ha demostrado que la regresión prematura de los cuerpos lúteos es un fenómeno asociado normalmente a la superovulación, que origina una pobre, o incluso nula, recuperación de embriones.^{27, 67} También se conoce que dosis altas, ya sea de eCG o de FSH, causan una excesiva estimulación ovárica que provoca tanto la persistencia de folículos anovulatorios como la regresión prematura de los cuerpos lúteos formados.

En las ovejas domésticas es común la presentación de ovulaciones seguidas por la formación de un cuerpo lúteo de corta duración, no solamente en hembras

superovuladas, sino también antes de la primera ovulación puberal,^{68, 69} estacional,⁷⁰ postparto,⁷¹ o cuando se induce ovulación sin pre-tratamiento con progesterona.⁷² En todos los casos, las ovulaciones seguidas por la formación de un cuerpo lúteo de corta duración son infértiles.⁷² Este cuerpo lúteo de corta duración secreta elevaciones transitorias de progesterona, las cuales probablemente son necesarias para la manifestación completa del comportamiento estral y aseguran la función normal del cuerpo lúteo del ciclo posterior.^{73, 74}

Se ha demostrado que el cuerpo lúteo de corta duración es intrínsecamente normal^{72, 75, 76} y que su corta vida se debe en realidad a una programación inadecuada de la secreción uterina de la prostaglandina F₂ alfa (PGF₂α).^{77, 78, 79, 80} En condiciones en donde la dinámica folicular se ve alterada, como podría ser el caso de la superovulación, se conoce que el ambiente hiperestrogénico que provoca la superovulación, al estimular la formación de un mayor número de folículos productores de estradiol, puede adelantar la secreción luteolítica de PGF₂α y originar, en consecuencia, la regresión prematura de los cuerpos lúteos formados debido a la acción de las gonadotropinas administradas exógenamente, problema que parece ser más grave entre mayor sea la dosis de gonadotropina utilizada.^{59, 60}

Uso de microbombas osmóticas* para administración de FSH como tratamiento de superovulación

En animales de laboratorio, como el ratón, rata, cobaya, hámster y conejo,⁸¹ el empleo de microbombas osmóticas es común para la dosificación de diferentes sustancias entre las que se puede mencionar la lidocaína y la indometacina, que fueron utilizadas para experimentar su efecto analgésico en modelos animales con dolor neuropático.⁸²

En cabras domesticas y silvestres se ha probado la administración de FSH mediante la aplicación subcutánea de inyectores y de microbombas osmóticas, en las cuales se coloca la dosis total y éstas se encargan de la liberación de la solución con la hormona, durante 3 días continuos. El uso de estos dispositivos disminuye de manera importante el estrés en los animales que son sometidos a la superovulación, ya que por un lado, se evita el frecuente manejo de los animales, y por el otro, origina respuestas a la superovulación similares a las obtenidas con esquemas diferentes. Por ejemplo Fernandez-Arias *et al* (1996),⁸³ en un trabajo en el que superovularon hembras de Ibex español (*Capra pyrenaica*) mediante la administración de FSH por medio de bombas osmóticas Alzet® modelo 1003D, obtuvieron un porcentaje de Cuerpos Lúteos en Regresión de 3.8; 4.6 Embriones Recuperados y un Porcentaje de Recuperación de 69.8

* AlzetC®, Micro-osmotic pump. Modelo 1003D, Alza Corporation. USA.

En el cuadro 1 se indican las dimensiones y los materiales de fabricación de una microbomba osmótica ALZET® modelo 1003D completa y armada.⁸⁴

Cuadro 1.
**DIMENSIONES Y MATERIAL DE LOS COMPONENTES DE LAS
 MICROBOMBAS OSMÓTICAS ALZET® MODELO 1003D**

| | Tubo sellado | Regulador de flujo | Cuerpo de la bomba | Bomba armada |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|---------------------|
| Longitud | 1.1 cm (solo tubo) | 1.3 cm (total) | | 1.7 cm |
| Peso (total) | | 0.05 gr. | | 0.35 gr. (vacío) |
| Diámetro | | | | 0.6 cm |
| Volumen total | | | | 0.45 ml |
| Indicador (sólo tubo) | 27 | 27 | | |
| O. D. (tubo) | 0.04 cm | 0.08 cm | | |
| I. D. (tubo) | 0.02 cm | 0.05 cm | | |
| Material tapa | | Acrilonitrilo de estireno | | |
| Material tubo | | Acero inoxidable | | |
| Material membrana exterior | | | Mezcla de celulosa éster | |
| Material depósito de medicina | | | Elastómero hidrocarbonado termoplástico | |

En el cuadro 2 se describe el desempeño de las bombas micro-osmóticas modelo 1003D

⁸⁴ utilizadas en el presente trabajo para la administración de FSH.

Cuadro 2.
DESEMPEÑO DE MICROBOMBAS OSMÓTICAS ALZET[®]

| | Parámetros |
|----------------------|--------------------------------|
| Nivel de bombeo: | 1.25 μ l/ hora \pm 0.15 |
| Duración | 72 horas (3 días) |
| Volumen del depósito | 90 μ l (\pm 10 μ l) |

Inseminación con monta natural dirigida

La monta natural dirigida consiste en reunir a la hembra en celo con el semental seleccionado, sujetando a la oveja en forma que sea posible la monta, o bien se apartan en un espacio elegido para tal efecto.²⁰ En la producción ovina, se emplea cuando se requiere llevar el registro sobre las crías obtenidas de cada semental, y controlar el momento más adecuado para el apareamiento.⁸⁵ Con la monta dirigida, en ovejas domésticas sincronizadas artificialmente o con celo natural, se logran gestar más del 80% de las hembras inseminadas. No obstante, el resultado depende directamente de la condición fisiológica de los machos disponibles, sobre todo en lo que se refiere a la estación. En los ovinos domésticos fuera de la época de reproducción, el porcentaje de hembras gestantes puede ser inferior al 70%.⁸⁶ En un estudio realizado por Gaisen (1995), se obtuvo un 75% de fertilidad cuando a las hembras se les dio un solo servicio y un 85% cuando se les dieron dos. En ovejas superovuladas es conveniente que el macho monte en repetidas ocasiones a la hembra, cada 6 u 8 horas, mientras permanezca receptiva, lo cual puede favorecer la recolección de un mayor número de embriones.⁴⁷

Recolección y evaluación de embriones

Existen diferentes técnicas para la colección y la transferencia de embriones como son: la laparoscopia, la transcervical y la laparotomía media ventral.⁸⁷

La colección de embriones por laparoscopia se considera una cirugía invasiva menor, ya que elimina la exteriorización y manipulación del tracto genital, evitando de esta manera las adherencias, teniendo entonces como ventaja, que se podrían hacer varios lavados al mismo animal con buenos resultados. Esta técnica requiere de material específico (laparoscopia con sus implementos) y de personal capacitado, por lo que es una técnica compleja y costosa.⁸⁷

Para la técnica de recolección con laparoscopia se hacen dos incisiones en la pared abdominal, a 2 ó 4 cm de la línea media, y aproximadamente 5 a 7 cm anterior a la ubre. Una es para la inserción del laparoscopio y otra para el manipulador de vísceras. Una vez localizado el útero, se inserta otra cánula en la línea media a 0.5 cm anterior a las otras incisiones, y se introduce una aguja roma para hacer una pequeña incisión en la pared uterina craneal, en la bifurcación del útero. Posteriormente, se remueve la aguja y se inserta una sonda de Foley con un estilete metálico a través de la cánula, de manera que éste quede dentro del lumen uterino. Se insufla el balón de 3 ml en el catéter, y se remueve el estilete, en el extremo opuesto del cuerno uterino, se inserta un catéter intravenoso con estilete, se remueve el estilete para permitir el paso del medio de recolección, y que éste sea recuperado a través de la sonda de Foley; finalmente, se obtiene el medio en un filtro colector, y se repite la operación en el otro cuerno uterino.

La recolección de embriones por el método no quirúrgico transcervical se lleva a cabo estando anestesiada la hembra y colocada en decúbito dorsal. Se pone un espéculo lubricado en la vagina, y se visualiza el cérvix. Se retrae un lado de la os externa del cérvix con unas pinzas de Allis hacia el vestíbulo vaginal. Posteriormente se introduce

un catéter dentro de la os externa del cérvix. Se retira el espéculo y se guía el catéter; una vez que el catéter está en el cuerpo del útero se infla el balón y se comienza a lavar pasando el medio para embriones. Este método es más fácil de aplicar en hembras de varios partos, porque su canal cervical se transita fácil, pero en hembras primíparas se ha obtenido mayor índice de embriones con la colección quirúrgica.⁸⁷

La recolección de embriones por el método quirúrgico es por medio de una laparotomía media ventral, para lo cual se somete a las ovejas (diétadas entre 24 y 36 hrs anteriores a la cirugía) a anestesia general. Se realiza una incisión sobre línea media de aproximadamente 6 cm de largo y 4 cm anterior a la ubre, que permite exteriorizar el útero y los ovarios para conocer la respuesta a la superovulación. Se consideran animales superovulados aquellos que presentan más de tres cuerpos lúteos en ambos ovarios. El útero se debe estar irrigando constantemente con solución salina fisiológica con la finalidad de evitar las adherencias. Se lava por separado cada cuerno uterino mediante la inserción de un angiocatéter en la punta del cuerno uterino, se introducen aproximadamente 60 ml de medio para embriones, compuesto por PBS (solución salina buferada) y adicionado con un 4% de SFB (suero fetal bovino), éste es recuperado a través de una sonda de Foley colocada en la base del cuerno, y colectado en un filtro para la posterior búsqueda de los embriones; el útero se regresa a la cavidad abdominal y la incisión es suturada por planos.

La técnica de recolección de embriones por laparotomía puede originar traumas postoperatorios muy importantes, como son las adherencias que se ocasionan por el proceso quirúrgico, las cuales interfieren con la fertilidad posterior de la donadora.

Los embriones al ser recuperados se evalúan morfológicamente con un microscopio estereoscópico y son clasificados con una metodología establecida por Elsdén *et al.* (1978), modificada por Linder *et al.* (1985) y avalada por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). De manera estricta, se consideran como embriones transferibles, aquellos con un grado de desarrollo que corresponda al día en que son recolectados y con una calidad excelente o buena (Cuadro 3). Como los embriones para ser transferidos en fresco o congelados, se obtienen generalmente de los cuernos del útero entre los días 6-7 posteriores al estro, su grado de desarrollo corresponde al de mórula o blastocisto.^{88, 89} (Cuadro 3)

**Cuadro 3.
CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES DE ACUERDO AL GRADO DE
DESARROLLO**

| Clasificación | Grado de desarrollo |
|---------------|--------------------------------|
| 1 | Ovocito (sin fertilizar) |
| 2 | 2 a 12 células |
| 3 | Mórula temprana |
| 4 | Mórula |
| 5 | Blastocisto inicial o temprano |
| 6 | Blastocisto |
| 7 | Blastocisto expandido |
| 8 | Blastocisto maduro |
| 9 | Blastocisto maduro expandido |

La calidad de los embriones se califica en cuatro categorías y se numeran del 1 al 4.

(Cuadro 4)

Los embriones de calidad 1 y 2 se consideran viables para la transferencia y los de las categorías 3 y 4 como no transferibles.^{88, 89}

| Clasificación | Calidad | Características |
|---------------|------------|--|
| 1 | Excelente | Embriones compactos y esféricos; simétricos; células de tamaño, color y textura uniformes, sin gránulos en el citoplasma con pocas vesículas pequeñas y espacio perivitelino vacío. |
| 2 | Bueno | Embriones con ligera asimetría; algunos blastómeros extruídos y un ligero retardo en su desarrollo. |
| 3 | Regular | Ligero grado de degeneración; blastómeros esféricos dispares, poco compactos y de tamaño variable; retardo de 1 a 2 días en su desarrollo; masa celular aparentemente viable pero con grandes vesículas entre las células y superficie irregular; color muy claro o muy oscuro y material de desecho en el espacio perivitelino. |
| 4 | Degenerado | Embriones con zona pelúcida rota; blastocele no visible con grandes zonas de degeneración; poca cantidad de células y blastómeros sueltos de diferentes tamaños |

HIPÓTESIS

El uso de esponjas vaginales con acetato de fluorogestona durante 16 días, más la aplicación de 200 UI de gonadotropina coriónica equina al momento de retirar la esponja, así como la administración mediante microbombas osmóticas ALZET® modelo 1003D, de una dosis alta (290 mg) de hormona folículo estimulante, permitirá y afectará la respuesta a la sincronización y superovulación en ovejas domésticas.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Sincronizar y superovular ovejas domésticas con tratamientos que puedan servir como modelo para hembras cimarrón.

Objetivos particulares

- Comparar entre tratamientos la respuesta a la sincronización: número de hembras en estro y horas a su presentación.
- Comparar entre tratamientos la respuesta a la superovulación: número de cuerpos lúteos totales, número de cuerpos lúteos normales y número de cuerpos lúteos en regresión, así como el número de embriones, número de ovocitos, número de estructuras recolectadas totales (embriones más ovocitos) y el porcentaje de recuperación (número de estructuras recolectadas en relación al número de cuerpos lúteos).

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El centro se encuentra ubicado en el Km. 53.1 de la carretera federal México-Cuernavaca, en el poblado de Tres Marías, municipio de Huitzilac en el estado de Morelos. La altura es de 2,743 msnm y el clima de la región es Cb(m)(w) ig, que corresponde a templado semi-frío con verano fresco y largo, de acuerdo a la clasificación de Köepen modificada. Las lluvias se presentan en los meses de mayo a octubre, y la temporada seca de noviembre a abril, con una temperatura media anual de 9.9° C y una precipitación promedio de 1,724.6 mm.⁹⁰

Animales

Los animales que se utilizaron en el experimento fueron 21 ovejas adultas de las razas Suffolk y Dorset, con edades de 4 a 6 años y una condición corporal entre 2.5 y 3, de acuerdo con una escala subjetiva de 0 a 5,⁹¹ y fueron divididas aleatoriamente en 4 tratamientos de 5 y 6 ovejas. La recolección de los embriones se realizó en plena época reproductiva, tras detectar el estro conductual en al menos dos ocasiones en cada hembra. Las ovejas se manejaron en un sistema tipo intensivo, con pastoreo diurno en praderas compuestas por Rye grass, Orchard, Kikuyo y Trébol blanco; por la tarde fueron alojadas en corrales, donde se complementó la alimentación con heno de avena y concentrado comercial, proporcionando 3.05 Mcal de EM y 14.7% de PC/Kg de MS.

Tratamientos hormonales

Tratamiento I (n= 5): Sincronización utilizando esponjas vaginales con 40 mg de FGA,¹ por 16 días, y la inyección intramuscular de 200 UI de eCG^x al momento de retirar la esponja. Superovulación con una dosis total de 290 mg de FSH[‡] en esquema constante dividida en 6 aplicaciones intramusculares durante 3 días.

| | | Inyecciones IM (FSH) | | | | | |
|-----------------------|---|------------------------|-------|------------------------|-------|------------------------|---------------|
| | | 49 mg | 49 mg | 48 mg | 48 mg | 48 mg | 48 mg |
| Am DIA 0 pm | → | am DIA 14 pm | | am DIA 15 pm | | am DIA 16 pm | |
| Colocación Esponja | | Reemplazo Esponja | | | | Retiro Esponja | 200 UI eCG IM |

Tratamiento II (n= 5): Sincronización utilizando esponjas vaginales con 40 mg de FGA¹ por 16 días, y la inyección intramuscular de 200 UI de eCG^x al momento de retirar la esponja. Superovulación con una dosis total de 290 mg de FSH[‡] administrando 200 mg por medio de 4 microbombas osmóticas^ï que liberaban en conjunto 2.778 mg/h durante 72 h y 90 mg mediante dos inyecciones intramusculares.

| | | (FSH) | |
|-----------------------|---|--|-------------------|
| | | Implante 4 micro bombas osmóticas 50 mg c/u | |
| Am DIA 0 pm | → | am DIA 14 pm | → |
| Colocación Esponja | | Reemplazo Esponja | |
| | | | Retiro Esponja |
| | | | 200 UI eCG IM |

¹ Chronogest[®] Dispositivo vaginal con acetato de fluorogestona, Intervet. Francia.

^x Folligon[®] Intervet. Francia.

[‡] Folltropin-V[®] Extracto de pituitarias porcinas, Bioniche. Canadá.

^ï Alzet[®] Micro-osmotic pump. Modelo 1003D, Alza Corporation. USA.

Tratamiento III (n= 5): Sincronización utilizando esponjas vaginales con 40 mg de FGA¹ por 16 días, y la inyección intramuscular de 200 UI de eCG^x al momento de retirar la esponja. Superovulación con una dosis total de 200 mg de FSH[‡] administrando 150 mg por medio de 3 microbombas osmóticas[‡] que liberaban en conjunto 2.085 mg/h durante 72 h y 50 mg mediante dos inyecciones intramusculares.

| | | (FSH) | |
|-----------------------|---|--|------------------------------------|
| | | Implante 3 micro bombas osmóticas 50 mg c/u | |
| | | 30 mg IM | 20 mg IM |
| Am DIA 0 pm | → | am DIA 14 pm | → am DIA 16 pm |
| Colocación Esponja | | Reemplazo Esponja | Retiro Esponja 200 UI eCG IM |

Tratamiento IV o Control (n= 6): Sincronización con esponjas vaginales de 40 mg de FGA² por 12 días, y la inyección intramuscular de 200 UI de eCG^x al momento de retirar la esponja. Superovulación con una dosis total de 200 mg de FSH[‡] en esquema decreciente dividida en 6 aplicaciones intramusculares por 3 días.

| | | Inyecciones IM (FSH) | | | | | |
|-----------------------|---|----------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|-------|-------|
| | | 50 mg | 40 mg | 35 mg | 35 mg | 25 mg | 15 mg |
| Am DIA 0 pm | → | am DIA 10 pm | am DIA 11 pm | am DIA 12 pm | | | |
| Colocación Esponja | | | | | Retiro Esponja 200 UI eCG IM | | |

² Chronogest[®] Dispositivo vaginal con acetato de fluorogestona, Intervet. Francia.

^x Folligon[®], Intervet. Francia.

[‡] Folltropin-V[®] Extracto de pituitarias porcinas, Bioniche. Canadá.

[‡] Alzet[®] Micro-osmotic pump. Modelo 1003D, Alza Corporation. USA.

Carga de microbombas osmóticas

Cada bomba de 90 μ l (0.09 ml) fue completamente cargada con una solución de FSH (50 mg/0.09 ml), utilizando una jeringa de 1.0 ml, sin aguja, acoplada al filtro del tubo de llenado. Primeramente, colocando la bomba en posición vertical, con la abertura hacia arriba, se introdujo el tubo de llenado hasta el fondo de la bomba, luego de forma lenta para evitar la formación de burbujas de aire dentro del depósito, se vertió la solución, hasta que la bomba estuvo llena. Posteriormente, se retiró el tubo de llenado y se insertó el regulador de flujo alineándolo con el borde superior de la bomba.⁸⁴

Implante de las microbombas osmóticas

Las bombas fueron colocadas subcutáneamente, en la región de la axila, siguiendo las especificaciones de higiene y asepsia requeridas para cualquier procedimiento quirúrgico. Se eligió colocarlas en este sitio por ser un lugar desprovisto de lana y de fácil acceso. Las ovejas fueron inmovilizadas mediante la inyección intramuscular de xilazina³ a una dosis de 0.22 mg/kg de PV y ketamina^x a una dosis de 1 mg/kg de PV. Posteriormente fueron colocadas decúbito lateral y se procedió a lavar, afeitar y desinfectar la zona. Después se aplicó anestesia local mediante la inyección de lidocaína.[‡] A continuación, se practicaron dos incisiones en la piel de aproximadamente 1 cm de largo. Luego, con la ayuda de una sonda canalada, se separó el tejido subcutáneo formando una bolsa en la cual se colocaron las bombas con el regulador de flujo orientado hacia el dorso de la oveja. Finalmente, se suturaron las incisiones.⁸³

* Sedazine, Fort Dodge USA.

× Anesket, Lapisa México.

‡ Servcaína, Intervet. México.

Detección del estro e inseminación con monta natural dirigida

La detección de estro se realizó con machos enteros cubiertos con un mandil; inició 12 horas después de retirar la esponja vaginal, y se repitió cada 3 horas hasta las 48 horas posteriores. Las ovejas que presentaron celo conductual recibieron monta natural dirigida, cada 6 horas, durante todo el tiempo que permanecieron receptivas.^{93 94}

Recolección y evaluación de embriones

La recolección de los embriones se llevó a cabo mediante laparotomía medio ventral el día 6 posterior a la primera monta, ya que en este momento los embriones se encuentran en los cuernos uterinos y su estadio de desarrollo corresponde al de mórula o blastocisto.⁴⁹ Para la recolección, las hembras se inmovilizaron mediante la inyección intramuscular de xilazina⁴ y la aplicación endovenosa de ketamina[×] con una dosis de 0.44 mg/kg de PV y 1 mg/kg de PV respectivamente. Para llevar a cabo la recolección, se colocó a la oveja en una camilla de cirugía en decúbito dorsal y se lavó, afeitó y desinfectó la región abdominal. A continuación, se realizó una incisión de aproximadamente 6 cm de largo y 2 cm anterior a la ubre sobre la línea media para entrar a la cavidad abdominal. Posteriormente la camilla se inclinó 45° para facilitar la visualización y exteriorización del útero. Una vez exteriorizados los cuernos uterinos, se expusieron los ovarios para contar el número de cuerpos lúteos y verificar su calidad con el fin de determinar la respuesta a la superovulación y estimar así el número de embriones a obtener. Aquellas hembras que presentaron 3 o menos cuerpos lúteos (CL) no se consideraron superovuladas.^{27, 95} La calidad de los CL se evaluó con base en su tamaño y color, con lo que se estableció si eran normales o si se encontraban en

* Sedazine, Fort Dodge USA

× Anesket, Lapisa México

regresión prematura. Se consideraron normales a los que presentaron un color rojo brillante y sobresalían de la superficie del ovario, y en regresión prematura a los CL que se observaron color rosa pálido o blancos.⁹⁶

Cuando se estableció que la hembra había respondido a la superovulación, los ovarios se regresaron a la cavidad y se procedió a lavar cada uno de los cuernos del útero por separado. Para realizar este procedimiento, se efectuó una punción con un catéter intravenoso (14G x 5½) en la base del cuerno uterino y se introdujo una sonda Foley (calibre 10 Fr),⁵ A través de otro catéter intravenoso (18G x 1¼) insertado en la punta del cuerno uterino, se administraron 60 ml de medio de lavado.[×] Este, se colectó en un filtro concentrador[‡] por medio de la sonda de Foley. Concluida la recolección de los embriones, el útero se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la incisión.⁹⁷ Los embriones fueron conservados en una solución de mantenimiento[‡] y evaluados morfológicamente en un microscopio estereoscópico, clasificándose de acuerdo a su grado de desarrollo y calidad.^{88,89, 98}

Por otra parte, las microbombas osmóticas implantadas fueron quirúrgicamente retiradas al finalizar el procedimiento de recolección de embriones.

Finalmente se aplicó yohimbina[§] con una dosis de 0.125 mg /kg de PV y se administró antibiótico de amplio espectro[☆].

Análisis estadístico.

⁵ Sonda Foley Adex[®]. Sonda de látex estéril tipo Foley de 2 vías. Adex. México.

[×] Vigro Complete Flush Solution[®]. Solución de lavado. AB Technology. USA.

[‡] Filtro Em Con[®]. Concentrador de embriones irradiado. Immunsystems Inc. USA.

[‡] Vigro Holding Plus[®]. Medio de mantenimiento. AB Technology. USA.

[§] Reverze, antagonista α -adrenérgico Vetcross. Uruguay.

[☆] Penimox LA[®] Bayer. México.

Para comparar la respuesta a la sincronización, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente al azar, contemplando el efecto del tratamiento como variable independiente. Se consideraron como variables dependientes la proporción de ovejas que manifestaron estro conductual (% ESTRO) y el tiempo de presentación del estro (HRS PRES).

En cuanto a la superovulación, las variables dependientes que se tomaron en cuenta fueron: cuerpos lúteos totales (CLT), cuerpos lúteos normales (CLN) y cuerpos lúteos en regresión (CLR), así como las estructuras recolectadas totales (ESTOT), embriones (EMB) y ovocitos (OVO). Para las variables CLT, CLN y EMB se realizó una prueba de ANOVA y para las variables CLR, OVO y ESTOT se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido a que, éstas variables, no presentaron distribución normal de probabilidades.

El porcentaje de recuperación (% REC) fue cotejado mediante ANOVA. El análisis estadístico se realizó en la versión 8.2 de SAS/STAT.^{99, 100}

RESULTADOS

En la comparación de los tratamientos de sincronización, no se reportaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). (Cuadro 5)

Cuadro 5.
RESPUESTA DE OVEJAS DOMÉSTICAS A DISTINTOS ESQUEMAS DE SINCRONIZACIÓN CON FGA

| Tratamiento | % ESTRO | HRS PRES* |
|-------------|----------------------|-----------------------------|
| I | 5/5=100 ^a | 28.8 ^a ± 2.24 |
| II | 5/5=100 ^a | 28.2 ^a ± 1.20 |
| III | 5/5=100 ^a | 29.4 ^a ± 1.98 |
| IV | 6/6=100 ^a | 32.5 ^a ± 1.20 |

% ESTRO= Porcentaje de ovejas que presentaron estro conductual; HRS PRES= Tiempo de presentación de estro conductual.

*Promedio ± e e.

a,b para una determinada variable, literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

En los días posteriores a la colocación de las esponjas, una oveja correspondiente al Tratamiento I presentó un cuadro infeccioso en la vagina, por lo que no recibió monta, en consecuencia para las variables CLT, CLN Y CLR se consideraron valores de 21 ovejas y para las variables EMB, OVO y ESTOT sólo se consideraron los valores de 20 ovejas.

En el promedio de ovocitos obtenidos en las ovejas del Tratamiento I (7.7) y del Tratamiento II (6.8) se encontró diferencia significativa con respecto al promedio de ovocitos obtenidos con el Tratamiento III (0.0) y con el Tratamiento IV (0.8) ($P < 0.05$).

El promedio de embriones recolectados con el Tratamiento III (5.2±0.5) y con el Tratamiento IV (6.6±0.8) fue significativamente mayor comparado con los obtenidos con el Tratamiento I (2.0±0.9) y con el Tratamiento II (1.6±0.6) (P<0.05). (Cuadro 6)

En el promedio de cuerpos lúteos totales (CLT), cuerpos lúteos normales (CLN), cuerpos lúteos en regresión (CLR) y estructuras totales recolectadas (ESTOT), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (P<0.05). En el Tratamiento I se registró el mayor número de cuerpos lúteos en regresión (1.8). (Cuadro 6)

Cuadro 6.
RESPUESTA DE OVEJAS DOMÉSTICAS A DISTINTOS ESQUEMAS DE SUPEROVULACIÓN CON DIFERENTES DOSIS DE FSH

| Tratamiento | n= 21* | | | N= 20* | | |
|-------------|----------------------------|----------------------------|------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| | CLT † | CLN † | CLR ‡ | EMB † | OVO ‡ | ESTOT ‡ |
| I | 14.6 ^a ± 2.3 | 12.8 ^a ± 2.8 | 1.8 ^a | 2.0 ^a ± 0.9 | 7.7 ^b | 9.7 ^a |
| II | 11.4 ^a ± 1.7 | 11.0 ^a ± 1.7 | 0.4 ^a | 1.6 ^a ± 0.6 | 6.8 ^b | 8.4 ^a |
| III | 9.8 ^a ± 1.7 | 8.2 ^a ± 2.6 | 1.6 ^a | 5.2 ^b ± 0.5 | 0.0 ^a | 5.2 ^a |
| IV | 12.0 ^a ± 1.0 | 11.5 ^a ± 0.8 | 0.5 ^a | 6.6 ^b ± 0.8 | 0.8 ^a | 7.5 ^a |

CLT= Cuerpos lúteos totales; CLN= Cuerpos lúteos normales; CLR= Cuerpos lúteos en regresión; EMB= Embriones; OVO= Ovocitos; ESTOT= Estructuras recolectadas totales.

* Para las variables CLT, CLN Y CLR se consideraron valores de 21 ovejas; para EMB, OVO y ESTOT se consideraron valores de 20 ovejas.

†ANOVA ‡Kruskal-Wallis

Promedio ± e e.

a,b, para una determinada variable, literales diferentes indican diferencias significativas (P<0.05)

En el análisis del porcentaje de recuperación, (proporción de estructuras totales recolectadas con respecto al número de cuerpos lúteos totales observados) se encontraron diferencias significativas entre los Tratamientos I (53.42%) y III (53.06%) con el Tratamiento II (73.68%) ($P > 0.05$). (Cuadro 7)

Cuadro 7.
**PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN EN OVEJAS DOMÉSTICAS
 TRATADAS CON DISTINTOS ESQUEMAS DE SINCRONIZACIÓN CON
 FGA Y SUPEROVULACIÓN CON DIFERENTES DOSIS DE FSH**

| Tratamiento | CLT | ESTOT | % REC |
|-------------|-----|-------|---------------------|
| I | 73 | 39 | 53.42 ^a |
| II | 57 | 42 | 73.68 ^b |
| III | 42 | 26 | 53.06 ^a |
| IV | 72 | 45 | 62.50 ^{ab} |

CLT= Cuerpos lúteos totales; ESTOT= Estructuras recolectadas totales; % REC= Porcentaje de recuperación.

a,b, para una determinada variable, literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

En el cuadro 8 se observa el porcentaje de embriones y ovocitos con respecto al número de estructuras totales recolectadas.

Cuadro 8.
**PROPORCIÓN DE EMBRIONES Y OVOCITOS CON RESPECTO AL
NÚMERO DE ESTRUCTURAS TOTALES RECOLECTADAS**

| Tratamiento | ESTOT | OVO (%) | EMB (%) |
|-------------|-------|-------------|-------------|
| I | 9.75 | 7.7 (79.49) | 2.0 (20.51) |
| II | 8.4 | 6.8 (80.96) | 1.6 (19.04) |
| III | 5.2 | 0.0 (00.00) | 5.2 (100) |
| IV | 7.5 | 0.8 (11.07) | 6.6 (88.93) |

ESTOT= Estructuras recolectadas totales; OVO= Ovocitos; EMB= Embriones

DISCUSIÓN

Para la sincronización del ciclo estral en ovinos domésticos pueden utilizarse dispositivos vaginales impregnados con progesterona o con algún progestágeno, como el acetato de fluorogestona (FGA). La administración de este progestágeno simula la presencia de un cuerpo lúteo funcional (fase lútea del ciclo estral),²⁵ por lo cual, el fabricante sugiere su aplicación durante 9 a 14 días, ya que considera que la dosis de FGA contenida en las esponjas es suficiente, por este lapso de tiempo, para una efectiva inhibición de las gonadotropinas. Menchaca *et al.* (2004)¹⁰¹ citando a diversos autores, menciona que la inserción de un dispositivo vaginal impregnado con progesterona, en cabras que se encuentran en la etapa de anestro provoca durante los primeros tres o cuatro días, un agudo aumento en las concentraciones séricas de progesterona, y después de seis días de tratamiento, éstas concentraciones declinan y permanecen a un menor nivel hasta que el dispositivo es retirado. Este evento es el contrario de lo que sucede normalmente en la fase lútea del ciclo estral, en las que fisiológicamente, las concentraciones séricas de progesterona son bajas al principio y se van incrementando conforme avanza el ciclo. En ovejas sucede un fenómeno similar cuando se colocan esponjas con progestágenos como el FGA o el MAP. La reducción en las concentraciones de progesterona puede promover un crecimiento folicular excesivo, así como la persistencia de folículos grandes, lo que aumenta la edad de dichos folículos ovulatorios y del ovocito que contienen.¹⁰¹ En ganado vacuno la ovulación de los folículos grandes y persistentes es usualmente seguida de una baja fertilidad, aparentemente, porque ocurre una temprana reanudación de la meiosis en los ovocitos. Aunque se ha observado, que en ovejas y cabras, tratamientos de 12 días de duración

afectan la dinámica folicular y por lo tanto la tasa de fertilidad, de acuerdo con Evans (2003),¹⁰² el efecto negativo que se observa por la utilización de FGA durante largos periodos, es todavía materia de debate.

En el presente trabajo, para la sincronización del grupo testigo o control (Tratamiento IV) se utilizó una sola esponja durante 12 días, sin embargo, a las hembras de los tratamientos experimentales, la FGA debía administrárseles por un periodo de 16 días, ya que éste es el tiempo que probablemente dura la fase lútea en las hembras Cimarrón.²⁸ Por ello, en los Tratamientos I, II y III se utilizaron 2 esponjas; la primera se aplicó por 14 días, y posteriormente se reemplazó con otra esponja nueva que se retiró el día 16. Cabe mencionar que el cambio de esponja coincidió con el inicio del tratamiento de superovulación con lo cual, se evitó un manejo físico extra de los animales.

No obstante que en ovinos no hay estudios en los cuales se sustituya la esponja con FGA después de 14 días de haber sido colocada, existen otros trabajos en los cuales se ha reemplazado la esponja, aunque con diferentes objetivos. Por ejemplo, mediante la práctica de reemplazo de esponjas en ovejas domésticas superovuladas con FSH, González-Bulnes *et al* (2004)¹⁰³ obtuvieron un menor porcentaje de presentación de estros en aquellas ovejas a las cuales les cambiaron la esponja al día 7 después de su colocación, en comparación con aquellas que fueron sincronizadas utilizando una sola esponja, (71.4% y 85%, respectivamente), sin embargo, el número de embriones recolectados (4.9 ± 1.2) fue más alto en las ovejas sincronizadas con dos esponjas, comparado con el obtenido cuando se usó una sola esponja (4.3 ± 1.2), sin que se presentaran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

En este trabajo, en cuanto al porcentaje de hembras que manifestaron estro conductual y el tiempo en el que lo presentaron, no se reportaron diferencias significativas entre

tratamientos. Se encontró que la utilización de un progestágeno por 16 días, no alteró la presentación de celo, ya que el 100% de las ovejas correspondientes a cada uno de los tratamientos experimentales, presentaron estro conductual dentro de las 24 a 36 horas posteriores al retiro del progestágeno, que es el tiempo habitual de su presentación.²⁷

En respecto de la respuesta a la superovulación en el presente trabajo, se observó que el mayor número de ovocitos correspondió a los Tratamiento I y II, cuyas ovejas fueron sincronizadas con FGA durante 16 días y superovuladas con 290 mg de FSH, por lo que pudiera especularse que, en este caso, la fertilización pudo haber sido afectada por el largo periodo de FGA combinado con una dosis alta de FSH; esto sucedió a pesar de no haberse inducido la formación de un número significativo de cuerpos lúteos con regresión prematura. En estudios preliminares, en los que comparan los esquemas de dosis constantes (como el utilizado en el Tratamiento I), contra los esquemas de dosis decrecientes, González-Bulnes *et al.* (2004)¹⁰³ reportaron que los tratamientos en esquema decreciente, inducen cambios similares a los que ocurren normalmente en la fase folicular de ciclos no estimulados y por lo tanto, tienden a presentar mejores resultados en cuanto a la recuperación y viabilidad de embriones. Además, indican que la administración de FSH en dosis altas, durante la fase folicular temprana, provoca atresia en los folículos grandes y que esto podría explicar la elevada incidencia de fracaso en la tasa de fertilidad, cuando la FSH se administra en esquemas constantes. Asimismo, Schiewe *et al.* (1990)⁴⁴ y Hawk *et al.* (1987)⁴⁶ reportaron que la FSH, en dosis altas, provoca una sobrestimulación en la formación de folículos productores de estradiol, causando la alteración del medio ambiente uterino, lo cual interfiere con el transporte de los espermatozoides a través del aparato reproductor de la oveja, así como con el desarrollo embrionario temprano (antes de la implantación), y en consecuencia, se manifiesta una reducción en la tasa de fertilidad y de sobrevivencia embrionaria.

Uno de los principales problemas en la superovulación es la presencia de cuerpos lúteos en regresión al momento de la colección embrionaria, los cuales ocasionan una disminución en el número de embriones que se recolectan. En este trabajo no se observaron altas cantidades de cuerpos lúteos en regresión, ni se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, al igual que en el trabajo de Cerbón (1995)⁶⁷ se demostró la asociación de cuerpos lúteos normales con cuerpos lúteos en regresión, aunque Schiewe *et al.* (1990)⁴⁴ señalan que dicha asociación no puede presentarse. Probablemente, la coexistencia de ambos tipos de cuerpos lúteos se deba a que aquellos que se consideran como normales, en realidad ya iniciaron el proceso de luteólisis, y que esto no pueda distinguirse por la simple observación de sus características morfológicas.

En cualquier especie animal, doméstica o silvestre, cuando se aplica un tratamiento de superovulación, ya sea para lograr una rápida reproducción o para ayudar en la conservación de la especie, el número de embriones recolectados se considera como el más importante de los resultados, ya que con ello se puede determinar la efectividad del tratamiento. Esto es, se busca que la respuesta ovárica al tratamiento se manifieste con un elevado número de cuerpos lúteos totales, una moderada cantidad de cuerpos lúteos en regresión y un considerable número de embriones recuperados. Diversos autores, entre los cuales se pueden mencionar a Torrès *et al.* (1984)¹⁰⁴ Scudamore *et al.* (1993)¹⁰⁵ y Cueto *et al.* (2004),¹⁰⁶ han realizado investigaciones sobre tratamientos habituales de superovulación con FSH en ovejas domésticas de diferentes razas, y han obtenido un promedio de embriones recolectados de 6.1, 4.1 y 5.3 respectivamente. De igual manera, Fernández-Arias *et al.* (1996),⁸³ en un trabajo en el que superovularon cabras silvestres utilizando microbombas osmóticas para la administración de FSH, obtuvieron un promedio de 4.6 embriones recuperados.

En el presente trabajo, el promedio de embriones en el Tratamiento III y el Tratamiento IV fue mayor en relación al Tratamiento I y el Tratamiento II. Si bien en el Tratamiento III, se administró FGA durante 16 días, no se encontró diferencia significativa con el Tratamiento IV que, tanto en el número de cuerpos lúteos totales como en el de embriones fue el que mejores resultados generó; esto puede ser consecuencia de que, en los Tratamientos III y IV, se administró una dosis menor de FSH (200 mg), en comparación con la dosis utilizada en los Tratamientos I y II (290 mg). Es decir, los resultados de los Tratamientos I y II, aparentemente, se vieron afectados negativamente por la combinación de los efectos de un tratamiento largo con FGA, señalados por Menchaca *et al.* (2004)¹⁰¹, así como por los efectos de la administración de FSH en una dosis elevada, indicados por Schiewe *et al.* (1990)⁴⁴ y Hawk *et al.* (1987)⁴⁶, ya que ambos fenómenos tienden a causar detrimento en la tasa de fertilización y en la sobrevivencia embrionaria.

Referente al porcentaje de recuperación, en los Tratamientos I y III, se obtuvo un resultado por debajo de lo establecido por Fernández-Arias *et al.* (1996)⁸³ en el estudio con cabras superovuladas mediante microbombas osmóticas, en el cual, consiguieron un índice de recuperación del 69.8%. Con todo, se podría decir que esta situación no constituye un problema grave si se tiene en cuenta que el 100% de las estructuras recolectadas con el Tratamiento III, fueron embriones.

Según Mejía *et al.* (2000)⁴⁷ y Cervantes *et al.* (2007),⁴⁸ los resultados del Tratamiento IV son los esperados para un protocolo de uso común en ovejas y cabras domésticas. Es decir, las ovejas tratadas con este esquema presentaron un alto número de cuerpos lúteos totales, una reducida cantidad de cuerpos lúteos en regresión y un elevado número embriones recuperados. Sin embargo, de acuerdo al objetivo, de este trabajo la opción más viable para sincronizar y superovular hembras Cimarrón, es la

aplicación del Tratamiento III ya que, además de ser estadísticamente igual al Tratamiento IV, al utilizar las microbombas osmóticas para administrar la FSH, se disminuye el número de veces en las que hay que someter físicamente al animal y, con ello, se reduce el estrés que se les causa con este manejo.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se puede concluir que la utilización de esponjas intravaginales de 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA) durante 16 días, más la aplicación intramuscular de 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) al momento de retirar la esponja, así como la administración de 200 mg de hormona folículo estimulante (FSH), mediante microbombas osmóticas ALZET[®] modelo 1003D, permite la sincronización y superovulación de ovejas domésticas. De esta forma se obtiene un número aceptable de embriones, por lo que este protocolo puede implementarse para la sincronización y superovulación de hembras Cimarrón.

REFERENCIAS

1. Guerrero I, Tovar I, Álvarez S. Factores que afectan la distribución espacial del borrego cimarrón (*Ovis canadensis weemsi*) en la Sierra del Mechudo, BCS México. *Anales del Instituto Nacional de Biología, UNAM. Serie Zoología* 2003; 74 (1): 83-98.
2. Gross J, Singer-Francis J, Moses. Effects of disease, dispersal, and area on bighorn sheep restoration. *Restoration Ecology* 2000; 8:25-37.
3. Gross E. Evaluating effects of an expanding mountain goat population on native bighorn sheep: a simulation model of competition and disease. Natural Resource Ecology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, USA. *Biological Conservation* 2000; 101: 171-185.
4. Nowak M. Artiodactyla: Bovidae. In: Walker's Mammals of the World Vol II. 5ª ed. The Johns Hopkins. Baltimore & London 1991: 1494-1499.
5. Ayala S, Martínez R Determinación de los niveles de hormonas esferoidales (P,E,T) en excretas de la población de borrego cimarrón (*O.c. cremnobates*) en la sierra de san Pedro Mártir en Baja California, México. (tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UABC. México 1997.
6. Wildt D, Monfort S, Donoghue A, Johnston L, Howard J, 1992. Embryogenesis in conservation biology-or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*. 37, 161-184.
7. Rancho la Reforma.com [homepage on the Internet]. México: Xoles Consultores c2005-2007 [updated 2007 agosto 23; cited 2007 agosto 23]. Available from: <http://www.rancholareforma.com>

8. Bunch T, Foote W, Whitaker B. Interspecies ovum transfer to propagate wild sheep. *J Wildl Manag* 1977; 41: 726-730.
9. Bunch T, Workman G. Hybridization of desert Bighorn and Argali-Mouflon wild sheep. *Desert Bighorn Counc Trans* 1988; 32:16-18.
10. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Norma Oficial Mexicana-059-ECOL-2001. Instituto Nacional de Ecología. México DF: SEMARNAP, 2001.
11. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural 1997-2000. Instituto Nacional de Ecología. México DF: SEMARNAP, 1997.
12. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) en México. Instituto Nacional de Ecología. México DF: SEMARNAP, 2000.
13. Lasley L, Loskutoff M, Anderson B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. *Theriogenology* 1994; 41: 119-132.
14. Carpenter A. Antibody-Based Methods. In *Manual of clinical laboratory immunology USA*: ASM Press 2002.
15. Schwarzenberger F, Möstl E, Bamberg E. Fecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild zoo animals. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 515- 526.

16. Soto S. Monitoreo no invasivo de las etapas productivas en borrego Cimarrón en cautiverio mediante la observación conductual reproductiva y cuantificación de esteroides fecales. (tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 2006.
17. Rodríguez C. Determinación del ciclo estral en borregas Cimarrón mediante la observación conductual y determinación de progesterona en heces. (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 2007.
18. Heredia M. Ovulación múltiple y transplante de embriones en ovinos. Conducta estral y detección de estros. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma de Yucatán. México: 1998.
19. Quintal J. Ovulación múltiple y transplante de embriones en ovinos. Perfiles endocrinos asociados con el ciclo estral de los rumiantes. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma de Yucatán. México: 1998.
20. Hafez E. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª ed. España: Mc Graw Hill, 2000.
21. Quispe T, Zarco L, Valencia J, Ortiz A. Estrus synchronization with elengestrol acetate in cycle ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. *Theriogenology* 1994; 41:1385-1392.
22. Porras A, Galina H. Inducción y sincronización de estros utilizando progestágenos. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bovina. México DF. 1990; 126-142.
23. Evans G, Maxwell M. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. España: Acribia, 1990.

24. Crempien CH, Rojas C, Avendaño J. Efecto del tratamiento con progestágeno sintético sobre la sincronización de estros, concentración de partos y eficiencia reproductiva de ovinos. *Agricultura Técnica* 1984; 44:347-351.
25. Vaillancourt D. La gestion de la reproduction chez les petits ruminants: le contrôle du cycle œstral. *Le Médecine Vétérinaire du Québec* 2003 3; 33(1-2): 43-49.
26. Quirke F. Regulation of pubertal reproduction in female lambs: A review. *Livestock Production Science* 1981; 8: 37-53.
27. Scudamore L, Robinson J, Aitken P. The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, whit sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenealogy* 1991; 35: 907.
28. Bunch T, Workman W. Artificial insemination of wild sheep. *Desert Bighorn Counc Trans* 1991; 20-21.
29. Hackett J, Lagfort A, Robetson A. Fertility of ewes alters synchronization of estrus whit prostaglandin $F_{2\alpha}$ and insemination. *Theriogenealogy* 1981; 15: 4-6.
30. Herrera H, Feldman S, Zarco L, Valencia M, Ortiz H, Ángeles C. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Méx.* 1990; 21: 143-147.
31. López Sebastián A, Cognie Y, Cocero MJ, De la Puente J, Poulin N. Affect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep *Theriogenology* 1990; 34: 175-181.
32. Mitchel M, Dingwall S, Mylne J, Hunton J, Matthews K, Gebbie E, et al. Season affects characteristics of the preovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Anim Rep Sci* 2002; 74: 163-174.

33. González-Bulnes, García-García M, Castellanos, Santiago-Moreno, Ariznavarreta, Domínguez V, et al. Influence of maternal environment of the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Rep Nutr Dev* 2003; 43:17-28.
34. Folch J, Roche A, Cocero J, Alabart JL, Olivera J. Embryo transfer applied to a sheep selection program *Rep Fert Dev* 2004; 16(4): 512-517.
35. Veiga-López A, González Bulnes A, García-García RM, Domínguez V, Cocero MJ. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatment in sheep. *Theriogenology* 2005; 63:1973-1983.
36. McCracken A, Scharamm W, Barcikowski B, Wilson L. The identification of prostaglandin $F_2\alpha$ as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. *Act Vet Scand* 1981; 77 Suppl 1: 77-88.
37. Zarco L, Bradford E, Kindahl H. Modification of prostaglandin $F_2\alpha$ and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrus cycle of different lengths *J Reprod Fert.* 1988; 83:517-526.
38. Alwan F, Boland P, Gordon. Superovulation and oocyte recovery in the ewe. *Theriogenology* 1998; 29:1143-1148.
39. Maxwell M, Butler LG. Intrauterine insemination of ewes with frozen semen *J Agric Sci Camb* 1984; 102:233-235.
40. Wollen S, Shultz H, Newkirk L. Use and Handling of drugs and biological in embryo transfer. *Theriogenology* 1985; 23:31-43.
41. Driancurt A, Fry C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim Reprod Sci* 1992; 27: 279-292.

42. Newman A. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Ovology* 1991; 124:44-101.
43. Cognie Y, Chupin D, Saumande J. Comparison of two treatment schedules to induce superovulation in ewes. *Theriogenology* 1985; 23:185.
44. Schiewe C, Howard G, Goodrowe L, Stuart D, Wildt E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after PF_{2α} synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 1990; 34:3.
45. Buckrell C, Gartley J, Mehren G, Goodrowe L. Superovulation in Dall's sheep. *Theriogenology* 1990; 33:201.
46. Hawk W, Cooper S, Conley H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology* 1987; 28:139-153.
47. Mejía O, Murcia C, Valencia J, Espinosa F. Administración postmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Veterinaria México* 2000; 31: 129-135.
48. Cervantes J, Juárez L, Mejía O, Berruecos M, Vera R, Valencia J. Use of fluorogestone acetate alter breeding to reduce the effect premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced whit FSH. *Anim Reprod Sci* 2007; 97: 47-54.
49. Galina C, Valencia J. *Reproducción de animales domésticos*. 2ª ed. México: Limusa, 2006.
50. Mejía O. *Manejo Reproductivo e inseminación artificial en pequeños rumiantes*. Curso teórico-practico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Oct 1997.

51. Córdova I. Inducción y sincronización de celos en ovejas criollas anéstricas estacionales con esponjas vaginales impregnadas con FGA y PMSG inyectable. Arch. Zootec 1999; 48: 437-440.
52. Thimonier J. Practical uses of prostaglandins in sheep and goats. Acta Veterinaria Scandinavica 1981; 77: 1993-1208.
53. Mutiga E. Effect of the method of estrus synchronization and PMSG on estrus and twinning in Ethiopian menze sheep. Theriogenology 1992; 38: 727-734.
54. Valencia J. Manipulación del ciclo estral en la oveja. Ier Congreso Nacional de Producción Ovina. México: 1988.
55. Boulitrop P. Sincronización de calores en ovinos y caprinos. Síntesis lechera México 1989; 37-42.
56. Rainio V. PMSG-dose in Finnsheep embryo production. Theriogenology 1991; 35:261.
57. Ungerfeld R. Gonadotropina Coriónica Equina: Caracterización y utilización. Center for Reproductive Biology, Swedish University of Agricultural Sciences. Suecia: 1998.
58. Luyando C, Mejía O, Balcázar A, Valencia J, Zarco L, Caballero V, et al. Respuesta ovárica y recuperación de embriones ovinos utilizando dos dosis de pFSH. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. UNAM Vet Méx noviembre 1995; 26 (Supl): 2.
59. Baird T, Land B, Scaramuzzi J, Wheeler G. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androsterone and uterine prostaglandin $F_{2\alpha}$ throughout the oestrus cycle. J Endocr 1976; 69: 275-286.

60. Saharrea A, Valencia J, Balcazar A, Mejia O, Cerbon J, Caballero V, et al. Premature regression in goats superovulated with PMSG: Effect of hCG or Ngr. Administration during early luteal phase. *Theriogenology* 1998; 50: 1039-1052.
61. Carson S, Findlay K, Burger G, Trounson O. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod* 1981; 24: 105-113.
62. McCracken A, Schams W, Okulicz C. Hormone receptors control of prostaglandin secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy *Anim Reprod Sci* 1984; 7:31-55.
63. Silvia J, Lewis S, McCracken A, Thatcher W, Wilson Jr. L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants *Biol Reprod* 1991; 45:655-663 .
64. Battye M, Fairclough J, Cameron W, Trounson O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 1988; 84:425-430.
65. Thatcher W, Hansen J, Gross S, Helmer D, Plante C, Bazer W. Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil* 1989; 37Suppl 1: 91-99.
66. Sheldrick L. Oxitocin and luteal maintenance in the ewe. *J Reprod Fertil Suppl.* 43:105-107 1991.
67. Cerbón J. Recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural. (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1995.

68. Rodríguez R. Efecto de la suplementación sobre el inicio de la actividad reproductiva de la oveja tabasco o pelibuey. (tesis de doctorado en Producción Animal). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1991.
69. Balcázar A Efecto de la suplementación alimenticia sobre la eficiencia reproductiva de corderas pelibuey inducidas a la pubertad con acetato de melengestrol. (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1992.
70. Oldham M, Marti B. Simulation of seasonally anovular Merino ewes by rams. II Premature regression of ram induced corpora lutea. *Anim Reprod Sci* 1979 1: 291-295.
71. Braden D, King F, Odde G, Niswender D. Functional and morphologic characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 525-533.
72. Balcázar A. Efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo folicular, duración de la fase lútea y fertilidad de ovejas inducidas a ovular mediante la administración de hCG. (tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (DF) Mexico: UNAM, 1995.
73. Berardinelli G, Dailey A, Butcher L, Inskoop K. Source of circulating progesterone in pre-puberal ewes. *Biol Reprod* 1980; 22:233-236.
74. McLeod J, Haresing W. Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *J Reprod Fertil* 1984 65: 223-230.

75. Hunter G, Ayad J, Gilbert L, Southee JA, Wathes DC. Role of prostaglandin F₂ and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anestrus ewes. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 551-556.
76. Garverick A, Zollers Jr G, Smith F. Mechanism associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 111-124.
77. Southee A, Hunter G, Law S, Haresing W. Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH induced ovulation in the anoestrus ewe. *J Reprod Fertil* 1988; 84:149-155.
78. Copelin P, Smith F, Keisler H, Garverick A. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against PF₂ α on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *J Reprod Fertil* 1989; 87:197-207.
79. Peter T, Bosu T, Liptrap M, Cumming E. Temporal changes in serum prostaglandin F₂ α and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first post-partum ovulation. *Theriogenology* 1989; 32:277-284.
80. Cooper A, Carver A, Villeneuve P, Silvia J, Iskeep K. Effects of progesterone treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J Reprod Fertil* 1991; 91:411-421.
81. Morton B, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. *Lab Anim* 2001; 35:1-41.
82. Smith J, Shih A, Miletic G, Miletic V. La infusión sistémica continua de lidocaína proporciona analgesia en un modelo animal de dolor neuropático. *Rev Soc Esp Dolor* 2002; 9 (7):432-440.

83. Fernandez-Arias A, Folch J, Alabart L, Ramón J. Successful interspecific embryo transfer between Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) and domestic goat (*Capra hircus*) using micro-osmotic pumps for FSH administration. *Theriogenology* 45: 247 1996.
84. Alza Corporation. Instruction and specification sheet, ALZET[®] micro-osmotic pump, model 1003D. USA: 1996.
85. McDonald A. Reproducción y Endocrinología Veterinaria. 4^a ed. México: Interamericana, 1989.
86. Bearden J. Reproducción animal aplicada, México: El Manual Moderno, 1982.
87. Agrwal P, Bhattachayya K. Non surgical transplantation of embryos in goats. Proc III Int Cong on goat prod and disease. Dairy Goat J Publ Co 1982; 340.
88. Elsdon P. Freezing bovine embryos: causes of damage. *Embryo transfer*. 1987 2: 1-6.
89. Trejo A. Control de la reproducción caprina y ovina en la producción de pequeños rumiantes. México: AGT Editor SA, 1996.
90. FMVZ.unam.mx [homepage on the Internet] México DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; c1997-2007 [updated 2007 Agosto 23; cited 2007 Agosto 23] UNAM; [about 3 screens]. Available from: www.fmvz.unam.mx/centrosprod/ceiepo
91. Sheep Industry Development Program. Sheep production handbook. USA (Colorado State): SID, 1990.
92. Mejía O. Efecto del líquido folicular equino en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF: 1995.
93. Buxadé C. Zootecnia Bases de la Producción Animal. Tomo VIII Producción ovina. España: Mundi-Prensa, 1996.

94. Flores G. Embryo transfer in Kenyan goats Proceedings of a workshop on embryo transfer Held on 14th June 1991 at Sam Holiday In. Naivasha 1992.
95. Schiwe C, Fitz A, Brown L, Stuart D, Wildt E. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F₂ α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J Reprod Fertil* 1991; 93: 19-30.
96. Ruttle J, Lucero S, Key D, Daniels M, Rodriguez F, Yim HS, *et al.* Ovine estrus synchronization and superovulation using norgestone B and follicle stimulating hormone-pituitary. *Theriogenology* 1988; 30: 421-427.
97. Baril G, Brebion P, Chesné P. Manual de Información práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Roma: FAO, 1995.
98. Witenberger-Torrés S, Sevellec C. Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. INRA Publ Versailles 1987; 51.
99. Daniel W. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4^a ed. México, DF: LIMUSA, 2004.
100. SAS/STAT (computer program) versión 8.8. Cary (NC): SAS Institute Inc, 2004.
101. Menchaca A, Rubianes E. New trataments Associated with timed artificial insemination inn small ruminants. *Rep Fert Dev* 2004; 16: 403-413.
102. Evans O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Rep Sci* 2003; 78: 289-306.
103. González-Bulnes A, Baird T, Bruce K, Cocotero M, García-García R, Keith E, *et al.* Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Rep Fert Dev* 2004; 16:421-435.

104. Torrès S, Cognié Y. Superovulation and egg transfer in the ewe. *Rep Nutr Dev* 1984; 24(5A): 623-631.
105. Scudamore C, Robinson J, Aitken R, Robertson I. The effect of method of oestrous synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. *Anim Rep Sci* 1993; 34(2): 127-133.
106. Cueto M, Gibbons A. Transferencia de embriones en ovinos. *IDIA XXI, INTA Buenos Aires* 2004 A. 4(7): 79-82.

REFERENCIAS

1. Guerrero I, Tovar I, Álvarez S. Factores que afectan la distribución espacial del borrego cimarrón (*Ovis canadensis weemsi*) en la Sierra del Mechudo, BCS México. Anales del Instituto Nacional de Biología, UNAM. Serie Zoología 2003; 74 (1): 83-98.
2. Gross J, Singer-Francis J, Moses. Effects of disease, dispersal, and area on bighorn sheep restoration. Restoration Ecology 2000; 8:25-37.
3. Gross E. Evaluating effects of an expanding mountain goat population on native bighorn sheep: a simulation model of competition and disease. Natural Resource Ecology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, USA. Biological Conservation 2000; 101: 171-185.
4. Nowak M. Artiodactyla: Bovidae. In: Walker's Mammals of the World Vol II. 5^a ed. The Johns Hopkins. Baltimore & London 1991: 1494-1499.
5. Ayala S, Martínez R Determinación de los niveles de hormonas esferoidales (P,E,T) en excretas de la población de borrego cimarrón (*O.c. cremnobates*) en la sierra de san Pedro Mártir en Baja California, México. (tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UABC. México 1997.
6. Wildt D, Monfort S, Donoghue A, Johnston L, Howard J, 1992. Embryogenesis in conservation biology-or, how to make an endangered species embryo. Theriogenology. 37, 161-184.
7. Rancho la Reforma.com [homepage on the Internet]. México: Xoles Consultores c2005-2007 [updated 2007 agosto 23; cited 2007 agosto 23]. Available from: <http://www.rancholareforma.com>
8. Bunch T, Foote W, Whitaker B. Interspecies ovum transfer to propagate wild sheep. J Wildl Manag 1977; 41: 726-730.

9. Bunch T, Workman G. Hybridization of desert Bighorn and Argali-Mouflon wild sheep. *Desert Bighorn Counc Trans* 1988; 32:16-18.
10. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Norma Oficial Mexicana-059-ECOL-2001. Instituto Nacional de Ecología. México DF: SEMARNAP, 2001.
11. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural 1997-2000. Instituto Nacional de Ecología. México DF: SEMARNAP, 1997.
12. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) en México. Instituto Nacional de Ecología. México DF: SEMARNAP, 2000.
13. Lasley L, Loskutoff M, Anderson B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. *Theriogenology* 1994; 41: 119-132.
14. Carpenter A. Antibody-Based Methods. In *Manual of clinical laboratory immunology USA*: ASM Press 2002.
15. Schwarzenberger F, Möstl E, Bamberg E. Fecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild zoo animals. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 515- 526.
16. Soto S. Monitoreo no invasivo de las etapas productivas en borrego Cimarrón en cautiverio mediante la observación conductual reproductiva y cuantificación de esteroides fecales. (tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 2006.

17. Rodriguez C. Determinación del ciclo estral en borregas Cimarrón mediante la observación conductual y determinación de progesterona en heces. (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 2007.
18. Heredia M. Ovulación múltiple y transplante de embriones en ovinos. Conducta estral y detección de estros. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma de Yucatán. México: 1998.
19. Quintal J. Ovulación múltiple y transplante de embriones en ovinos. Perfiles endocrinos asociados con el ciclo estral de los rumiantes. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma de Yucatán. México: 1998.
20. Hafez E. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª ed. España: Mc Graw Hill, 2000.
21. Quispe T, Zarco L, Valencia J, Ortiz A. Estrus synchronization with elengestrol acetate in cycle ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. *Theriogenology* 1994; 41:1385-1392.
22. Porras A, Galina H. Inducción y sincronización de estros utilizando progestágenos. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bovina. México DF. 1990; 126-142.
23. Evans G, Maxwell M. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. España: Acibia, 1990.
24. Crempien CH. Rojas C, Avendaño J. Efecto del tratamiento con progestágeno sintético sobre la sincronización de estros, concentración de partos y eficiencia reproductiva de ovinos. *Agricultura Técnica* 1984; 44:347-351.

25. Vaillancourt D. La gestion de la reproduction chez les petits ruminants: le contrôle du cycle œstral. *Le Médecine Vétérinaire du Québec* 2003 3; 33(1-2): 43-49.
26. Quirke F. Regulation of pubertal reproduction in female lambs: A review. *Livestock Production Science* 1981; 8: 37-53.
27. Scudamore L, Robinson J, Aitken P. The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenology* 1991; 35: 907.
28. Bunch T, Workman W. Artificial insemination of wild sheep. *Desert Bighorn Counc Trans* 1991; 20-21.
29. Hackett J, Lagfort A, Robetson A. Fertility of ewes alters synchronization of estrus with prostaglandin $F_{2\alpha}$ and insemination. *Theriogenology* 1981; 15: 4-6.
30. Herrera H, Feldman S, Zarco L, Valencia M, Ortiz H, Ángeles C. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Méx.* 1990; 21: 143-147.
31. López Sebastián A, Cognie Y, Cocero MJ, De la Puente J, Poulin N. Affect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep *Theriogenology* 1990; 34: 175-181.
32. Mitchel M, Dingwall S, Mylne J, Hunton J, Matthews K, Gebbie E, et al. Season affects characteristics of the preovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Anim Rep Sci* 2002; 74: 163-174.

33. González-Bulnes, García-García M, Castellanos, Santiago-Moreno, Ariznavarreta, Domínguez V, et al. Influence of maternal environment of the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Rep Nutr Dev* 2003; 43:17-28.
34. Folch J, Roche A, Cocero J, Alabart JL, Olivera J. Embryo transfer applied to a sheep selection program *Rep Fert Dev* 2004; 16(4): 512-517.
35. Veiga-López A, González Bulnes A, García-García RM, Domínguez V, Cocero MJ. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatment in sheep. *Therlogenology* 2005; 63:1973-1983.
36. McCracken A, Scharamm W, Barcikowski B, Wilson L. The identification of prostaglandin $F_2\alpha$ as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. *Act Vet Scand* 1981; 77 Suppl 1: 77-88.
37. Zarco L, Bradford E, Kindahl H. Modification of prostaglandin $F_2\alpha$ and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrus cycle of different lengths *J Reprod Fert.* 1988; 83:517-526.
38. Alwan F, Boland P, Gordon. Superovulation and oocyte recovery in the ewe. *Therlogenology* 1998; 29:1143-1148.
39. Maxwell M, Butler LG. Intrauterine insemination of ewes with frozen semen *J Agric Sci Camb* 1984; 102:233-235.
40. Wollen S, Shultz H, Newkirk L. Use and Handling of drugs and biological in embryo transfer. *Therlogenology* 1985; 23:31-43.
41. Driancurt A, Fry C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim Reprod Sci* 1992; 27: 279-292.

42. Newman A. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Ovology* 1991; 124:44-101.
43. Cognie Y, Chupin D, Saumande J. Comparison of two treatment schedules to induce superovulation in ewes. *Theriogenology* 1985; 23:185.
44. Schiewe C, Howard G, Goodrowe L, Stuart D, Wildt E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after PF₂ α synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 1990; 34:3.
45. Buckrell C, Gartley J, Mehren G, Goodrowe L. Superovulation in Dall's sheep. *Theriogenology* 1990; 33:201.
46. Hawk W, Cooper S, Conley H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology* 1987; 28:139-153.
47. Mejía O, Murcia C, Valencia J, Espinosa F. Administración postmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Veterinaria México* 2000; 31: 129-135.
48. Cervantes J, Juárez L, Mejia O, Berruecos M, Vera R, Valencia J. Use of fluorogestone acetate alter breeding to reduce the effect premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced whit FSH. *Anim Reprod Sci* 2007; 97: 47-54.
49. Galina C, Valencia J. *Reproducción de animales domésticos*. 2^a ed. México: Limusa, 2006.
50. Mejía O. Manejo Reproductivo e inseminación artificial en pequeños rumiantes. Curso teórico-practico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Oct 1997.

51. Córdova I. Inducción y sincronización de celos en ovejas criollas anéstricas estacionales con esponjas vaginales impregnadas con FGA y PMSG inyectable. Arch. Zootec 1999; 48: 437-440.
52. Thimonier J. Practical uses of prostaglandins in sheep and goats. Acta Veterinaria Scandinavica 1981; 77: 1993-1208.
53. Mutiga E. Effect of the method of estrus synchronization and PMSG on estrus and twinning in Ethiopian menze sheep. Theriogenology 1992; 38: 727-734.
54. Valencia J. Manipulación del ciclo estral en la oveja. 1er Congreso Nacional de Producción Ovina. México: 1988.
55. Boulitrop P. Sincronización de calores en ovinos y caprinos. Síntesis lechera México 1989; 37-42.
56. Rainio V. PMSG-dose in Finnsheep embryo production. Theriogenology 1991; 35:261.
57. Ungerfeld R. Gonadotropina Coriónica Equina: Caracterización y utilización. Center for Reproductive Biology, Swedish University of Agricultural Sciences. Suecia: 1998.
58. Luyando C, Mejía O, Balcázar A, Valencia J, Zarco L, Caballero V, et al. Respuesta ovárica y recuperación de embriones ovinos utilizando dos dosis de pFSH. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. UNAM Vet Méx noviembre 1995; 26 (Supl): 2.
59. Baird T, Land B, Scaramuzzi J, Wheeler G. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androsterone and uterine prostaglandin F₂α throughout the oestrus cycle. J Endocr 1976; 69: 275-286.

60. Saharrea A, Valencia J, Balcazar A, Mejia O, Cerbon J, Caballero V, et al. Premature regression in goats superovulated with PMSG: Effect of hCG or Ngr. Administration during early luteal phase. *Theriogenology* 1998; 50: 1039-1052.
61. Carson S, Findlay K, Burger G, Trounson O. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod* 1981; 24: 105-113.
62. McCracken A, Schams W, Okulicz C. Hormone receptors control of pulsatile secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy *Anim Reprod Sci* 1984; 7:31-55.
63. Silvia J, Lewis S, McCracken A, Thatcher W, Wilson Jr. L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants *Biol Reprod* 1991; 45:655-663 .
64. Battye M, Fairclough J, Cameron W, Trounson O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 1988; 84:425-430.
65. Thatcher W, Hansen J, Gross S, Helmer D, Plante C, Bazer W. Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil* 1989; 37Suppl 1: 91-99.
66. Sheldrick L. Oxitocin and luteal maintenance in the ewe. *J Reprod Fertil Suppl.* 43:105-107 1991.
67. Cerbón J. Recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural. (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1995.

68. Rodríguez R. Efecto de la suplementación sobre el inicio de la actividad reproductiva de la oveja tabasco o pelibuey. (tesis de doctorado en Producción Animal). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1991.
69. Balcázar A Efecto de la suplementación alimenticia sobre la eficiencia reproductiva de corderas pelibuey inducidas a la pubertad con acetato de melengestrol. (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DF) México: UNAM, 1992.
70. Oldham M, Marti B. Simulation of seasonally anovular Merino ewes by rams. II Premature regression of ram induced corpora lutea. *Anim Reprod Sci* 1979 1: 291-295.
71. Braden D, King F, Odde G, Niswender D. Functional and morphologic characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 525-533.
72. Balcázar A. Efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo folicular, duración de la fase lútea y fertilidad de ovejas inducidas a ovular mediante la administración de hCG. (tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (DF) Mexico: UNAM, 1995.
73. Berardinelli G, Dailey A, Butcher L, Inskoop K. Source of circulating progesterone in pre-puberal ewes. *Biol Reprod* 1980; 22:233-236.
74. McLeod J, Haresing W. Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *J Reprod Fertil* 1984 65: 223-230.

75. Hunter G, Ayad J, Gilbert L, Southee JA, Wathes DC. Role of prostaglandin F₂ and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anestrus ewes. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 551-556.
76. Garverick A, Zollers Jr G, Smith F. Mechanism associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 111-124.
77. Southee A, Hunter G, Law S, Haresing W. Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH induced ovulation in the anoestrus ewe. *J Reprod Fertil* 1988; 84:149-155.
78. Copelin P, Smith F, Keisler H, Garverick A. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against PF₂ α on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *J Reprod Fertil* 1989; 87:197-207.
79. Peter T, Bosu T, Liptrap M, Cumming E. Temporal changes in serum prostaglandin F₂ α and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first post-partum ovulation. *Theriogenology* 1989; 32:277-284.
80. Cooper A, Carver A, Villeneuve P, Silvia J, Iskeep K. Effects of progesterone treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J Reprod Fertil* 1991; 91:411-421.
81. Morton B, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. *Lab Anim* 2001; 35:1-41.
82. Smith J, Shih A, Miletic G, Miletic V. La infusión sistémica continua de lidocaína proporciona analgesia en un modelo animal de dolor neuropático. *Rev Soc Esp Dolor* 2002; 9 (7):432-440.

83. Fernandez-Arias A, Folch J, Alabart L, Ramón J. Successful interspecific embryo transfer between Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) and domestic goat (*Capra hircus*) using micro-osmotic pumps for FSH administration. *Theriogenology* 45: 247 1996.
84. Alza Corporation. Instruction and specification sheet, ALZET[®] micro-osmotic pump, model 1003D. USA: 1996.
85. McDonald A. Reproducción y Endocrinología Veterinaria. 4^a ed. México: Interamericana, 1989.
86. Bearden J. Reproducción animal aplicada, México: El Manual Moderno, 1982.
87. Agrwal P, Bhattachayya K. Non surgical transplantation of embryos in goats. *Proc III Int Cong on goat prod and disease. Diary Goat J Publ Co* 1982; 340.
88. Elsdén P. Freezing bovine embryos: causes of damage. *Embryo transfer*. 1987 2: 1-6.
89. Trejo A. Control de la reproducción caprina y ovina en la producción de pequeños rumiantes. México: AGT Editor SA, 1996.
90. FMVZ.unam.mx [homepage on the Internet] México DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; c1997-2007 [updated 2007 Agosto 23; cited 2007 Agosto 23] UNAM; [about 3 screens]. Available from: www.fmvz.unam.mx/centrosprod/ceiepo
91. Sheep Industry Development Program. Sheep production handbook. USA (Colorado State): SID, 1990.
92. Mejía O. Efecto del líquido folicular equino en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF: 1995.
93. Buxadé C. Zootecnia Bases de la Producción Animal. Tomo VIII Producción ovina. España: Mundi-Prensa, 1996.

94. Flores G. Embryo transfer in Kenyan goats Proceedings of a workshop on embryo transfer Held on 14th June 1991 at Sam Holiday In. Naivasha 1992.
95. Schiwe C, Fitz A, Brown L, Stuart D, Wildt E. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F₂ α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J Reprod Fertil* 1991; 93: 19-30.
96. Ruttle J, Lucero S, Key D, Daniels M, Rodriguez F, Yim HS, *et al.* Ovine estrus synchronization and superovulation using norgestone B and follicle stimulating hormone-pituitary. *Theriogenology* 1988; 30: 421-427.
97. Baril G, Brebion P, Chesné P. Manual de Información práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Roma: FAO, 1995.
98. Witenberger-Torrés S, Sevellec C. Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. INRA Publ Versailles 1987; 51.
99. Daniel W. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4^a ed. México, DF: LIMUSA, 2004.
100. SAS/STAT (computer program) versión 8.8. Cary (NC): SAS Institute Inc, 2004.
101. Menchaca A, Rubianes E. New trataments Associated with timed artificial insemination inn small ruminants. *Rep Fert Dev* 2004; 16: 403-413.
102. Evans O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Rep Sci* 2003; 78: 289-306.
103. González-Bulnes A, Baird T, Bruce K, Cocotero M, García-García R, Keith E, *et al.* Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Rep Fert Dev* 2004; 16:421-435.

104. Torrès S, Cognié Y. Superovulation and egg transfer in the ewe. *Rep Nutr Dev* 1984; 24(5A): 623-631.
105. Scudamore C, Robinson J, Aitken R, Robertson I. The effect of method of oestrous synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. *Anim Rep Sci* 1993; 34(2): 127-133.
106. Cueto M, Gibbons A. Transferencia de embriones en ovinos. *IDIA XXI, INTA Buenos Aires* 2004 A. 4(7): 79-82.