



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**"EFECTO DE LA PROGESTERONA APLICADA EN DOS MOMENTOS DEL
METAESTRO SOBRE EL TAMAÑO DEL EMBRIÓN, TAMAÑO Y FUNCIÓN DEL
CUERPO LÚTEO (CL) EN OVEJAS"**

Tesis de Grado, previo a la obtención del
título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTORES:

PABLO PATRICIO PEÑALOZA ZUMBA
JONATHAN LEONARDO ROMERO TACURI

DIRECTOR:

DR. RICARDO HORACIO ALBERIO Ph.D.

Cuenca - Ecuador

2016



RESUMEN

Se evaluó el efecto de la progesterona exógena aplicada en dos momentos del metaestro temprano sobre el tamaño del embrión, tamaño y función del cuerpo lúteo, en 21 ovejas de la raza Corriedale en la Granja Irquís de la Universidad de Cuenca en un diseño de bloques al azar. Se compararon las medias con la prueba de Tukey con nivel de significación de 0,05. Los tratamientos realizados fueron: T1) Control; T2) aplicación de P4 entre los días 2 al 4 posteriores al servicio; T3) aplicación de P4 entre los días 3 al 5 posteriores al servicio. La duración del estudio fue de 60 días. El incremento de los niveles séricos de progesterona en sangre evidencia una diferencia significativa ($P<0,05$), entre tratamientos con valores promedio 8,20; 21,0; 13,6 ng/ml para los tratamientos T1, T2, T3 respectivamente. No hubo diferencias significativas entre tratamientos para el tamaño y función del cuerpo lúteo. Los resultados indican que la aplicación de P4 en etapa del metaestro temprano no afectó el tamaño y función del cuerpo lúteo, pero incrementa significativamente los niveles de P4 en esa etapa.

Palabras clave: OVEJAS, PROGESTERONA, METAESTRO TEMPRANO, CUERPO LÚTEO.



ABSTRACT

The effect of exogenous progesterone was evaluated applied in two moments of early metaestrus on embryo size and size and function of the corpus luteum in 21 sheeps Corriedale breed in Irquís Farm of the University of Cuenca in a block design was valued at random. The means were compared with Tukey test with significance level of 0.05. The treatments performed were: T1) Control; T2) application of P4 between 2 to 4 days after the service; T3) application of P4 between days 3 to 5 after the service. The study duration was 60 days. Increased serum levels of progesterone in blood evidence a significant difference ($P<0.05$) between treatments with average values 8.20; 2.0; 13.6 ng/ml for T1, T2, T3 respectively treatments. There were no significant differences between treatments for the size and function of the corpus luteum. The results indicate that the application of P4 in the early stage of metaestrus not affect the size and function of the corpus luteum, but significantly increases the levels of P4 at that stage.

Keywords. EWES, PROGESTERONE, EARLY METAESTRUS, CORPUS LUTEUM.



INDICE

1	INTRODUCCIÓN	16
1.1	Objetivo general	19
1.2	Objetivo específico	19
2	MARCO TEÓRICO	20
2.1	FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA OVEJA	20
2.1.1	Estacionalidad	20
2.1.2	Pubertad y peso a la pubertad.....	22
2.1.3	Características del ciclo estral	22
2.1.4	Ovulación.....	24
2.2	EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES	25
2.2.1	Desarrollo embrionario	25
2.2.2	Clasificación de embriones.....	28
2.3	MORTALIDAD Y SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA	29
2.3.1	Causas de mortalidad embrionaria	30
2.4	IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN.....	34
2.5	CUERPO LÚTEO (CL)	35
2.5.1	Desarrollo y regresión fisiológica del CL.....	35
2.5.2	Función del cuerpo lúteo	37
2.6	PROGESTERONA	39
2.6.1	Mecanismo de acción de la progesterona sobre el embrión.....	39
2.6.2	Efecto de la progesterona en el útero.....	42
2.6.3	Niveles de progesterona en sangre.....	43
2.7	SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y ESTIMULACIÓN OVÁRICA.....	45
2.7.1	Principio de la sincronización del celo.	45
2.7.2	Métodos de sincronización del estro.....	45
2.7.3	Tratamiento de estimulación ovárica	47



3 MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1 MATERIALES	52
3.1.1 Biológicos	52
3.1.2 Físicos	52
3.1.3 Químicos	52
3.2 MÉTODOS	53
3.2.1 Área de estudio.....	53
3.2.2 Metodología de la investigación.....	54
3.2.3 Tratamientos.....	58
3.2.4 Diseño	59
3.2.5 Aplicación de P4 y toma de muestras sanguíneas	59
3.2.6 Técnica quirúrgica	60
3.2.7 Medición del cuerpo lúteo.....	61
3.2.8 Colecta de embriones.....	61
3.2.9 Búsqueda de embriones.....	62
3.2.10 Variables.....	63
3.2.11 Análisis estadístico	63
4 RESULTADOS.....	65
5 DISCUSIÓN	70
6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
6.1 CONCLUSIONES.....	76
6.2 RECOMENDACIONES	77
7 BIBLIOGRAFÍA	78
8 ANEXOS	92



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1. Influencia de la P4 en el desarrollo embrionario.	33
Cuadro N° 2. Porcentaje de crías en ovejas tratadas con P4.	34
Cuadro N° 3. Valores promedios \pm DE de los niveles de P4 en metaestro.	65
Cuadro N° 4. Valores promedios \pm DE del tamaño del cuerpo lúteo.	66
Cuadro N° 5. Valores promedios \pm DE del tamaño de la masa del total de CL.	67
Cuadro N° 6. Valores promedios \pm DE, de los niveles de P4 en el día 13	67
Cuadro N° 7. Análisis de Correlación entre variables en estudio	68



INDICE DE GRAFICOS

Grafico N° 1. Ciclo estral de la oveja.	23
Grafico N° 2. Fase folicular	24
Grafico N° 3. Desarrollo y tránsito del embrión en el tracto genital.	26
Grafico N° 4. Cronología del desarrollo embrionario en la oveja	27
Grafico N° 5. Formación del cuerpo Lúteo.	36
Grafico N° 6. Concentraciones promedio de P4 durante el ciclo estral de la oveja	
	43
Grafico N° 7. Variaciones hormonales durante el ciclo estral de la oveja.	44
Grafico N° 8. Valores promedios de P4 sérica durante los días 2 a 5 del metaestro	
temprano por tratamientos.	66



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Estudio Ecográfico.	92
Anexo N° 2. Flushing y conducción del rebaño al potrero y limpieza del establo.	92
Anexo N° 3. Sincronización de celos y superovulación.	93
Anexo N° 4. Servicio con carneros.	93
Anexo N° 5. Toma de muestras de sangre y procesamiento de las muestras en laboratorio de biotecnologías reproductivas.	93
Anexo N° 6. Medición de los cuerpos lúteos y lavado de embriones.	94
Anexo N° 7. Protocolos de Superovulación	94
Anexo N° 8. Resumen del Diseño Experimental	95
Anexo N° 9. Porcentaje de respuesta ovulatoria de las ovejas en estudio	95
Anexo N° 10. Prueba de normalidad.	96
Anexo N° 11. ANOVA de las variables.	96
Anexo N° 12. Correlaciones de Pearson entre variables.	97

**Cláusula de derechos de autor.**

Yo, Pablo Patricio Peñaloza Zumba, autor de la tesis "Efecto de la progesterona aplicada en dos momentos del metaestro sobre el tamaño del embrión, tamaño y función del cuerpo lúteo (CL) en ovejas", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art.5 literal c) de su reglamento de propiedad intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médico Veterinario Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca 22 de julio del 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Peñaloza", is written over a horizontal line.

Pablo Patricio Peñaloza Zumba

C.I: 0105788871



Cláusula de propiedad intelectual

Yo, Pablo Patricio Peñaloza Zumba, autor de la tesis "Efecto de la progesterona aplicada en dos momentos del metaestro sobre el tamaño del embrion, tamaño y función del cuerpo lúteo (CL) en ovejas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca 22 de julio del 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pablo Patricio Peñaloza Zumba". It is placed over a dotted horizontal line.

Pablo Patricio Peñaloza Zumba

C.I: 0105788871

**Cláusula de derechos de autor.**

Yo, Jonathan Leonardo Romero Tacuri, autor de la tesis "Efecto de la progesterona aplicada en dos momentos del metaestro sobre el tamaño del embrión, tamaño y función del cuerpo lúteo (CL) en ovejas", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art.5 literal c) de su reglamento de propiedad intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médico Veterinario Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca 22 de julio del 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "JONATHAN LEONARDO ROMERO TACURI".

Jonathan Leonardo Romero Tacuri

C.I: 110498997-3



Cláusula de propiedad intelectual

Yo, Jonathan Leonardo Romero Tacuri, autor de la tesis "Efecto de la progesferona aplicada en dos momentos del metaestro sobre el tamaño del embrión, tamaño y función del cuerpo lúteo (CL) en ovejas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca 22 de julio del 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read "JLRT", is placed over a dotted line.

Jonathan Leonardo Romero Tacuri

C.I: 110498997-3



AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradecemos a Dios por bendecirnos y permitirnos cumplir esta meta.

A la Universidad de Cuenca y las autoridades de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por darnos la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa institución, a los profesores y ex profesores por sus enseñanza, confianza, apoyo y dedicación, que nos impartieron.

A nuestro director de tesis, Dr. Ricardo Horacio Alberio Ph.D., por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y motivación nos ayudó a culminar el presente trabajo.

Asimismo nos gustaría agradecer a todos los profesionales que durante el desarrollo de esta investigación aportaron con un granito de arena, en especial a los doctores: Andrés Galarza, Daniel Argudo, Cristina Bernardi, Guillermo Guevara, por compartirnos sus experiencias y conocimientos.

También agradecemos a los Doctores: Johnny Narváez, Hernán Rivadeneira y en especial al Dr. Manuel Soria por haber brindado las facilidades para la realización de esta investigación.

A nuestros amigos y compañeros, especialmente Sofía Quezada y Mariana González por ser parte de este proceso de formación.

“MUCHAS GRACIAS”.

PABLO PEÑALOZA

JONATHAN ROMERO



DEDICATORIA

A mi hijo, quien fue la motivación para superarme académicamente y en todos los aspectos de la vida.

A mis padres quienes con su amor, sabiduría y constancia me apoyaron en todo momento durante el transcurso de mi carrera hasta llegar a cumplir esta meta.

A María, por ser parte de mi vida, quien con su amor y comprensión, consiguió regalarme tranquilidad en todo momento.

Pablo Peñaloza



DEDICATORIA

A mis padres Rosa y Leonardo, por su perseverancia, motivación constante, tiempo que han destinado a mis ilusiones, su apoyo; y más que nada, por su amor.

A mis hermanos Jorge, Andrea, Eduardo, John, por su cariño, amistad y sobre todo por aquellos detalles que han envuelto mi corazón de felicidad, a mis abuelitas y toda mi familia que me incitan a luchar por mis sueños.

A Magaly por ser esa persona especial en mi vida, por su paciencia, apoyo y amor incondicional.

Jonathan Romero



1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies animales con fines zootécnicos, la explotación ovina es una de las producciones extendida por todo el mundo y en los países industrializados, su producción a gran escala ha permitido obtener grandes beneficios (Galora, 2006). En los países en desarrollo, salvo excepciones, la explotación ovina no ha tenido este tipo de desarrollo sino que han sido en general explotaciones de tipo familiar. Ejemplo de ello es lo ocurrido en el Ecuador en donde la crianza del ganado ovino ha constituido tradicionalmente un medio de vida e ingresos para personas e instituciones, pero sobre todo para muchos pueblos indígenas. De cualquier forma esto ha mantenido un equilibrio entre lo económico, lo social y la ecología a lo largo de muchos años, contribuyendo con una diversidad de productos y derivados aprovechados por el hombre.

Sin embargo, los productores en ocasiones tienen dificultades que limitan alcanzar la mejor eficiencia y rentabilidad de sus explotaciones. Aunque el ovino se caracteriza por tener altos niveles de fertilidad por celo (superior al 60%), esto está lejos del 90 al 100% de fertilización que se sabe ocurre en esta especie. Según Benjamín, (1988) citado por Vélez, *et al.* (2009) un factor limitante de la fertilidad es precisamente la muerte embrionaria antes de su implantación.

Las causas de la muerte embrionaria son diversas y pueden ser divididas en los siguientes factores actuantes: fallas de fertilización (es la causa menos frecuente) daños genéticos en el ovocito y embrión (Willingham, *et al.* 1986) y pérdidas de



causas poco conocidas entre las cuales están las disfunciones endocrinas, el estrés calórico, la edad de la madre, la época, las ovulaciones múltiples (Kleemann & Walker, 2005) y las alteraciones en el ambiente uterino (Thatcher, et al. 1994). En las ovejas se estima que entre un 25 a 40% de los embriones mueren en las tres primeras semanas de gestación a pesar de ser normales, y una de las causas es la insuficiencia del cuerpo lúteo (Benjamín, 1988). Pope, (1988) indica que una de las causas de la mortalidad es la asincronía entre el desarrollo del embrión y el comienzo de la luteólisis. Esta asincronía se puede deber por un lado al crecimiento anormalmente lento del embrión lo cual impide que la señal provista por el mismo a través del interferón TAO para evitar la síntesis de PGF_{2α} no llegue a tiempo. En segundo lugar, un adelantamiento de la luteólisis podría terminar con el apoyo progesterónico que necesita el embrión en crecimiento.

Según Benjamín,(1988) citado de Vélez, et al. (2009) una proporción considerable de la asincronía entre embrión y cuerpo lúteo puede ser atribuida a las concentraciones circulantes inadecuadas de progesterona en el metaestro temprano y las consecuencias posteriores sobre el endometrio, entre ellas: la expresión génica de sus células y la secreción del histotrofo dentro del lumen uterino.

Estos factores hacen que la productividad potencial de una hembra de tener una cría por periodo productivo se vea reducida y a su vez abre las puertas para intentar corregir los desequilibrios mencionados (Peñaloza & Romero, 2015).



Estudios como los de Benjamín, (1988) y Ataman, *et al.* (2013) mencionan que algunos de estos factores podrían controlarse con el uso de hormonas aplicadas en momentos estratégicos. Entre estas, la progesterona (P4), la gonadotrofina coriónica equina (eCG) y la hormona gonadotrofina coriónica humana (HCG) han sido aplicadas después del servicio con este fin (Beck, *et al.* 1994; Cam & Kuran, 2004). Sin embargo, hasta el presente es insuficiente la información existente respecto a la aplicación de P4 en momentos estratégicos del metaestro en ovinos. Pope, *et al.* (1994) en un trabajo observó que el aumento de la P4 entre los días 2 y 4 del metaestro mejoraba el tamaño del embrión pero acortaba la vida media del CL. En la presente investigación se busca profundizar los estudios realizados por el mencionado autor corriendo ligeramente el momento en que la P4 es inyectada y así disminuir su efecto negativo sobre la vida media del CL. Se trata así de generar nueva información sobre la problemática de la baja P4 en el metaestro temprano y eventualmente, aportar alternativas para dar una solución al aspecto de las pérdidas embrionarias producto de los desequilibrios mencionados, y así mejorar la eficiencia reproductiva.

Por lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:



1.1 Objetivo general

- Mejorar la performance reproductiva de las ovejas a través de la mejora del ambiente uterino inmediatamente después de la fecundación.

1.2 Objetivo específico

Evaluar el efecto de la progesterona exógena aplicada en dos momentos del metaestro sobre:

- Los niveles de progesterona logrados en los primeros días después de la ovulación.
- El tamaño del cuerpo lúteo.
- Función del cuerpo lúteo en el día 13 post-servicio.
- El desarrollo embrionario temprano.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA OVEJA

2.1.1 Estacionalidad

La estacionalidad de la reproducción, como parte de selección natural, es un mecanismo de adaptación desarrollado por algunos mamíferos silvestres, como estrategia para minimizar el impacto del ambiente en la supervivencia de las crías, de manera que los nacimientos ocurren en la época más favorable del año, con abundancia de pastos y temperatura ambiental confortable (Malpaux, *et al.* 2002).

Los ovinos presentan anualmente dos etapas fisiológicas bien definidas (Arroyo, 2011). Una fase de anestro estacional, con ausencia de ciclos estrales regulares, receptividad sexual y ovulación, y por ello, incapacidad de desarrollo embrionario, provocado por la evolución del fotoperíodo (Lopez, *et al.* 1993). En el macho, cesa la espermatogénesis y la libido (Arroyo, 2011). La otra etapa fisiológica, conocida como época reproductiva, se caracteriza por la ocurrencia de ciclicidad estral, conducta de estro y ovulación en la hembra; en el macho, se restablece la espermatogénesis y el deseo sexual (Malpaux, *et al.* 1999).

El fotoperíodo es el factor ambiental primario que regula estos eventos. La oveja posee un sistema neurofisiológico capaz de transformar la señal luminosa en una señal hormonal a través de la síntesis de melatonina y de esta manera detecta las variaciones anuales en la duración del fotoperíodo; algunos factores que influyen



en la estacionalidad son, latitud, especie, raza, estado nutritivo y el lactacional (Malpaux, *et al.* 2002). El estrés psicológico puede también producir interrupción de la actividad cíclica (Duran, 2008).

La latitud y la raza deben considerarse juntos, ya que en un alto porcentaje, la producción ovina se realiza con razas autóctonas adaptadas a un medio determinado (Malpaux, *et al.* 2002).

La gestación en la oveja tiene una duración aproximada de cinco meses, en consecuencia, en las regiones templadas su estación reproductiva se debe iniciar en otoño para permitir que los nacimientos ocurran en la primavera, que es la época de mayor producción forrajera (Porras, *et al.* 2003). Esta estrategia reproductiva se presenta en las razas que viven en latitudes iguales o mayores a los 35°, donde los cambios ambientales son contrastantes en las diferentes estaciones del año (Lindsay, 1991). Por ello, la mayoría de las razas de ovejas domésticas conservan un patrón reproductivo estacional similar al que se desarrolló en la oveja silvestre de este tipo de regiones, aunque existe la posibilidad de encontrar individuos con la capacidad para reproducirse en cualquier época del año (Porras, *et al.* 2003).

Al comienzo de la estación reproductiva, la actividad hipofisaria se incrementa, subiendo los niveles de gonadotropinas y estimulando el crecimiento y maduración de los folículos. Durante el anestro, la hipófisis está relativamente inactiva y secreta muy pocas gonadotropinas a la corriente sanguínea. Consecuentemente,



el crecimiento folicular no se ve estimulado y la hembra no presenta estro, ni ovulación (Duran, 2008).

2.1.2 Pubertad y peso a la pubertad

Es la etapa del desarrollo en la que el individuo adquiere la capacidad de liberar gametos viables y por lo tanto reproducirse. Es un proceso gradual dinámico y progresivo, exactamente no delimitado (Galina & Valencia, 2009), determinada por varios factores tales como: genética, niveles hormonales, ambiente y la nutrición (Padilla, 2006). Las ovejas en promedio llegan a esta etapa a los 7 meses, alrededor de 20 a 30 kg de peso vivo (Fraser & Stamp, 1978).

2.1.3 Características del ciclo estral

El estro es el periodo fértil en el cual, si la hembra no concibe, se repite cada 16 - 17 días en la mayoría de las ovejas (14 – 19 días). En animales jóvenes, este intervalo puede ser menor en 1 a 2 días (Duran, 2008). Este ciclo se divide en dos fases, la folicular (periodo de crecimiento folicular) y la lútea (periodo de cuerpo lúteo) Hafez, 1987 citado por (Simonetti, 2008). El estro se presenta en la última parte de la fase folicular (duración de 24 a 30 hs), la fase folicular es relativamente corta, sólo consta de 3 a 4 días, ocupando la fase lútea el resto del ciclo con un total de 12 a 13 días (Duran, 2008).

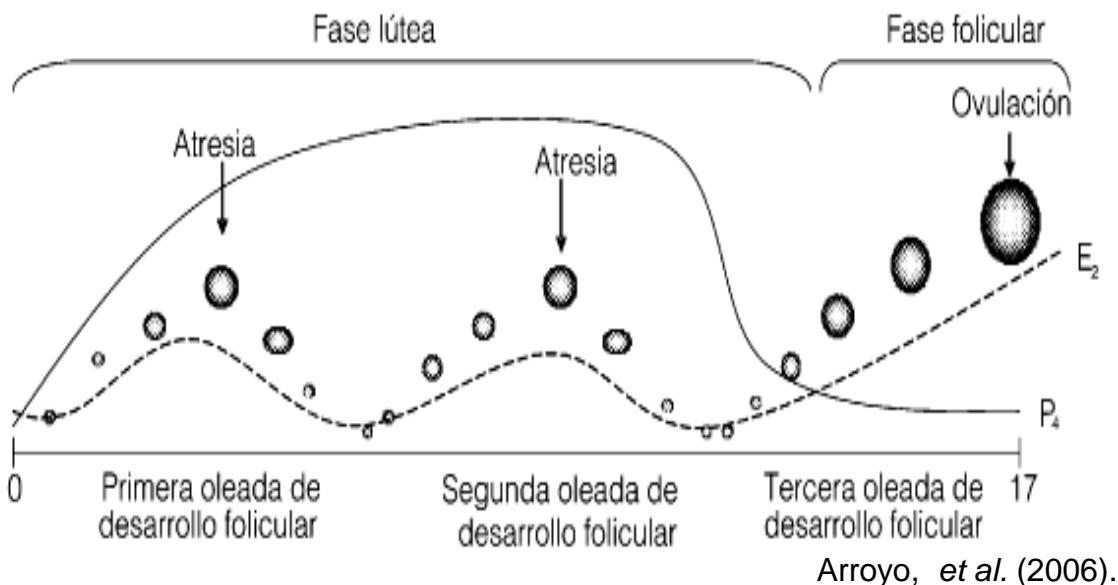


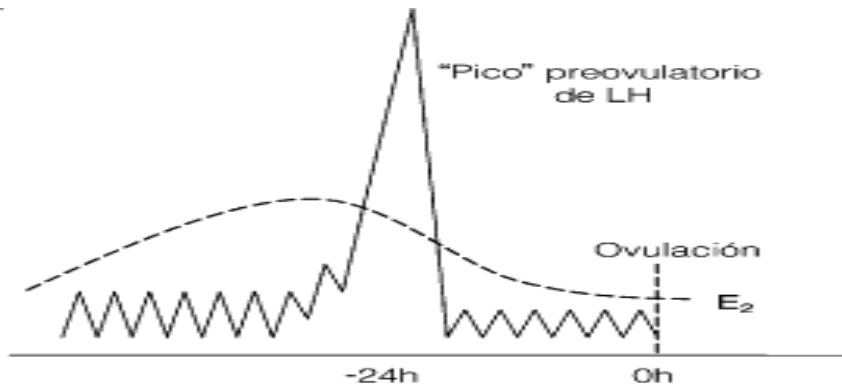
Grafico N° 1. Ciclo estral de la oveja.

En la fase lútea existen folículos en desarrollo, los cuales sufren atresia por insuficiencia gonadotrófica. Los folículos en desarrollo durante esta etapa segregan estradiol (E_2 17 beta); sin embargo, la progesterona en altos niveles inhibe la secreción pulsátil de LH a nivel central y esto impide la maduración folicular y ovulación. Durante la fase folicular, cuando la concentración de P_4 disminuye por efecto de la PGF2 α , el estradiol secretado por los folículos en desarrollo estimula la secreción pulsátil de LH y se ejerce un sistema de retroalimentación positivo, favoreciendo la maduración folicular, la ovulación y la manifestación externa del celo. Por lo general se observan dos o tres oleadas foliculares durante el ciclo estral de la oveja (Arroyo, *et al.* 2006).

El pico preovulatorio de LH precede a la ovulación en aproximadamente 24h y se asocia con la conducta del estro. Este evento requiere un incremento en la



secreción de GnRH hipotalámica y el aumento de la sensibilidad hipofisiaria, ambos eventos son de pendientes del estradiol Se requiere el estímulo generado por la GnRH para que ocurra el pico preovulatorio de LH (Caraty, 2002).



Arroyo, et al. (2006)

Grafico N° 2. Fase folicular

2.1.4 Ovulación

El tiempo de ovulación está relacionado con el estro; en ovejas merinas ocurre entre 25 y 30h después del estro (la ovulación se presenta en el final del estro), cuando maduran dos o más folículos en el mismo ciclo estral, los ovocitos se liberan con 2 y 3h de diferencia entre ellos (Durán, 2008).

Cuando se produce la fecundación y posterior desarrollo embrionario, el CL se mantiene durante toda la gestación aportando las concentraciones de P4 necesarias para la preparación del endometrio y desarrollo del embrión. Sin embargo en la oveja, como en otros rumiantes, la presencia del CL sólo es



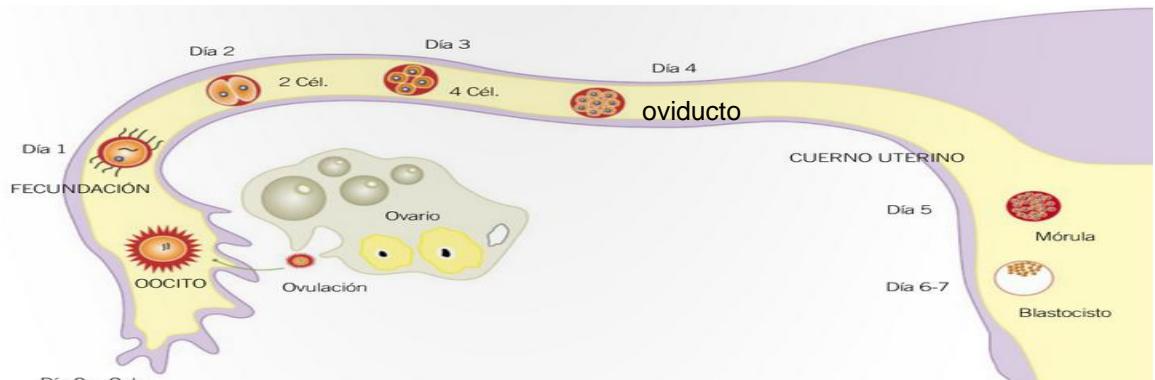
imprescindible en el primer tercio de la gestación (día 70 aproximadamente), cuando la placenta comienza a segregar cantidades de progesterona muy superiores a las del CL (Lòpez, et al. 1993).

2.2 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES

2.2.1 Desarrollo embrionario

El ovocito después de su liberación es "atrapado" por las fimbrias del infundíbulo y dirigido al interior del oviducto a través de la actividad ciliar. Pocas horas después de la fusión ovocito-espermatozoide (aproximadamente 24h), comienza la división nuclear mitótica y las nuevas células se denominan blastómeros (Palma, 2001). El ovocito fertilizado, o embrión, se mueve hacia la parte inferior del oviducto, hacia el útero y al mismo tiempo continúa la división celular (Duran, 2008).

El desarrollo hasta los 8 días ocurre dentro de la zona pelúcida. En los primeros 6 días de desarrollo no se manifiesta aumento de tamaño, sólo incrementa el número de blastómeros (Palma, 2001). El embrión unicelular se multiplica en el oviducto a razón de un ciclo celular diario de 24h aproximadamente; siendo el intervalo entre la división más temprana y la más tardía es de alrededor de 4h (Pedersen, 1988). Durante 5 a 6 días de tránsito oviductal en el estadio de mórula llega al útero donde continúa su proceso de desarrollo. El embrión permanece libre en el útero hasta que se une a las paredes del mismo, lo que acontece entre los días 20 y 25 después de la fertilización (Duran, 2008).



(Barañao, 2011)

Grafico N° 3. Desarrollo y tránsito del embrión en el tracto genital.

El día 5 después de la fertilización, aproximadamente, se produce el ingreso al cuerno uterino en estadio de **mórula temprana**, momento a partir del cual es posible recuperar el embrión en forma quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad.

Clasificación del desarrollo embrionario según (Palma, 2001).

Mórula compacta (Mc), d5-6, con 32-64 blastómeros aproximadamente. Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60%-70% del espacio perivitelino.

Blastocisto temprano (Bt), d7 con 100-200 células. Caracterizado por el inicio del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación del blastocele en el interior del embrión. Ocupa el 70-80% del espacio perivitelino.

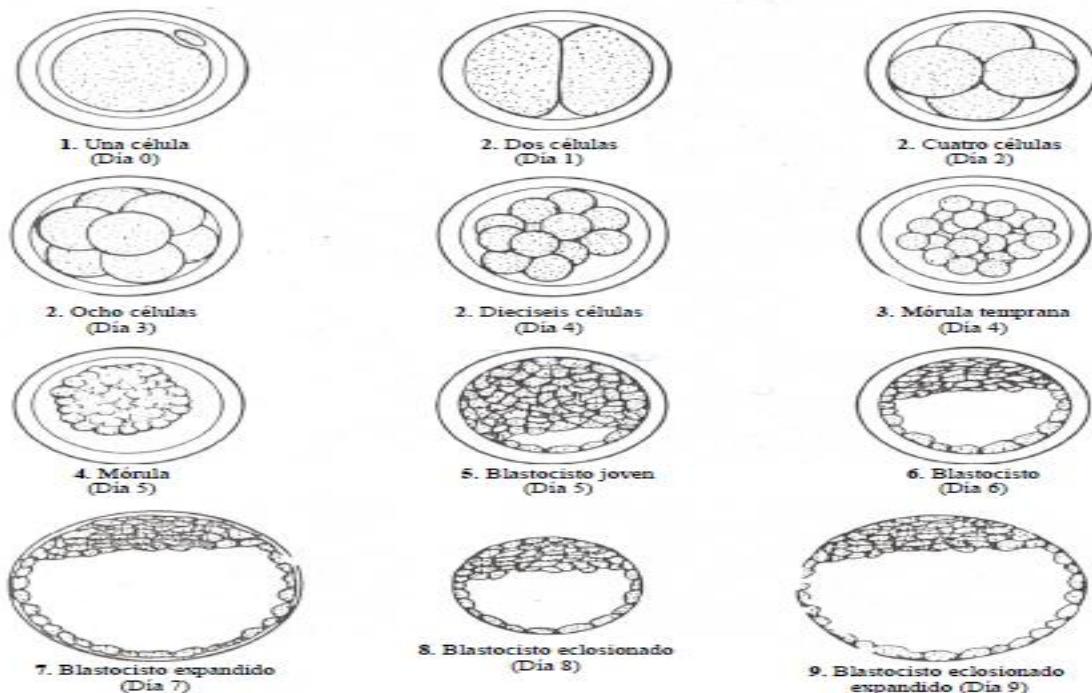
Blastocisto (B), d7- 8, 100-200 células. Marcada diferenciación entre las células del trofoblasto y la masa celular interna. Este proceso comenzó en el estadio de



Mc. Su membrana celular se adosa a la zona pelúcida y la masa celular interna (**disco embrionario**) es más oscura.

Blastocisto expandido (Be), d7- 8, más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente (1,2 a 1,5x), con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original.

Blastocisto protruido (Bp), d8-9, 200-800 células. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado.



(Gibbons & Cueto, 2013)

Grafico N° 4. Cronología del desarrollo embrionario en la oveja



En el gráfico 4 se pueden observar las características de cada estructura. **1.** Identifica un ovocito no fertilizado o un embrión de una célula. **2.** Identifica embriones en secuencia que se desarrollan de 2 hasta las 16 células. **3.** Identifica una mórlula temprana. **4-9.** Identifica estadios embrionarios de compactación (Gibbons & Cueto, 2013).

2.2.2 Clasificación de embriones

Se realiza en base a sus aspectos morfológicos observados a 40 aumentos. Para su observación se usa una micropipeta de vidrio que permitirá mover los embriones para poder observarlos desde distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la zona pelúcida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera hasta un máximo de 24h de retraso. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración. El grado de calidad es una estimación de la predicción de sobrevivencia embrionaria (Gibbons & Cueto, 2013).

Uno de los sistemas de clasificación utilizado es el propuesto por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) y consiste en cuatro categorías:

Grado I. Excelente, embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles y la zona pelúcida está intacta.



Grado II. Bueno, hay algunas imperfecciones, tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas.

Grado III. Regular, posee defectos definidos: detritus celular, forma irregular, color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida.

Grado IV. Malo, el embrión posee severos defectos: los correspondientes al grado III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida y el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. Esta categoría de embriones no es transferible.

2.3 MORTALIDAD Y SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA

La supervivencia embrionaria es un factor que afecta la producción y la eficiencia económica en todos los sistemas de producción de rumiantes. “Efectos directos de la mortalidad embrionaria son reflejados en la reducción de la tasa de concepción por servicio y la reducción del tamaño de la camada” (Diskin & Morris, 2008).

Los embriones genéticamente anormales o aquellos penetrados por más de un espermatozoide, normalmente no van más allá de las primeras divisiones. Otros embriones puede que no sean capaces de unirse al útero en el momento de la implantación. Estos embriones también morirán y se reabsorberán o pasaran del útero a la vagina (Duran, 2008). Según Benjamín. (1988), citado por Vélez, et al. (2009) “en las ovejas un 25 al 40% de los embriones mueren en las tres primeras



semanas de preñez a pesar de ser normales, y una de las causas es la insuficiencia del CL”.

Durante los primeros 14 días se pierden cerca del 30% de las gestaciones, sin que clínicamente sean detectadas, dentro de este periodo la mayoría (80%) se pierden antes del octavo día considerando que la transición de mórula a blastocistos es un periodo crítico para la supervivencia del embrión. Entre los 14 y 19 días, un 5-10% se pierden alrededor del reconocimiento materno de preñez. Después viene el periodo de formación de la placenta, entre el día 18-28 y el 30 al 42 donde en cada uno de esos periodos también se pierden alrededor del 5- 10% de los embriones (Diskin & Morris, 2008).

En los animales jóvenes o en los muy viejos, estas pérdidas pueden ser aún mayores. Por otro lado, la mortalidad embrionaria es más alta cuando los embriones son de mala calidad, están sujetos a estrés por calor u otras formas de estrés (Duran, 2008).

2.3.1 Causas de mortalidad embrionaria

La etiología de la muerte embrionaria es de naturaleza diversa, pero puede resumirse en factores genéticos y ambientales. Dentro de los factores genéticos están consideradas las anormalidades cromosómicas, éstas pueden producirse espontáneamente durante la gametogénesis, la fertilización o la embriogénesis.



Wilmut, *et al.* (1986) mencionan que las anomalías cromosómicas ocurren aproximadamente en 7.5% de los embriones. Los factores ambientales son responsables de la mayor parte de las muertes embrionarias tempranas. Aquí están considerados los factores de naturaleza hormonal, nutrimental, climática e infecciosa (Hernández & Morales, 2001).

Factores hormonales

Durante los primeros días del desarrollo, el embrión es dependiente totalmente de las secreciones uterinas y oviductales, las cuales son reguladas por las hormonas esteroideas, en particular la progesterona. Como consecuencia de lo anterior, se ha señalado que las anomalías en la función del CL son una causa importante de la falla en la concepción (Hernández & Morales, 2001).

Diskin & Morris (2008) citados por O'Hara, *et al.* (2014) afirman que en el ganado, la mayoría de las pérdidas embrionarias se producen en el período previo al reconocimiento de la preñez, y que una proporción considerable de esta pérdida puede ser atribuible a las concentraciones circulantes inadecuadas de P4 y las consecuencias posteriores sobre el endometrio, la expresión génica y la secreción de histotrofo dentro del lumen uterino.

Robinson, *et al.* (1999) afirman que “durante la gestación temprana los embriones deben inhibir el desarrollo del mecanismo luteolítico para mantener la secreción de P4 necesaria para continuar el desarrollo. Por lo tanto los embriones deben secretar interferón TAO”. Este último actúa localmente en el útero inhibiendo la



secreción de PGF2 α por disminución del desarrollo de los receptores de oxitocina en el epitelio luminal y la inducción de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas.

Spencer & Bazer, (1996) también en sus conclusiones mencionan que, “para el establecimiento de la preñez en rumiantes se necesita que el embrión entre en el útero estimulado por la P4 y que este debe crecer, desarrollarse y producir interferón TAO, para bloquear la síntesis de prostaglandina”.

Por otra parte Mann & Lamming, (2001) citados por Nava-Trujillo, *et al.* (2008), indican que “el desarrollo del embrión depende de la sincronía entre éste y el útero y que esta sincronía está regulada por el momento post-ovulatorio en el cual los niveles de P4 aumentan”.

Cuando estos incrementos de P4 ocurren en etapa temprana, el desarrollo del embrión es importante en vacas y ovejas, debido a que el ambiente uterino es adecuado. Sin embargo para que se forme el CL y sea funcional deberán pasar de 4 a 5 días en la oveja. En consecuencia, en esta etapa, la P4 es insuficiente para controlar este proceso debido a que el CL aún no produce los niveles adecuados de P4, coincidiendo con lo que afirma Durán (2008) que “si el CL falla en la producción de suficiente P4 para nutrir al útero se producirá la muerte del embrión, y que la mortalidad también puede ocurrir si el embrión llega demasiado temprano, antes de que la P4 ejerza sus efectos”.



Cuadro N° 1. Influencia de la P4 en el desarrollo embrionario.

Intervalo inter-estros en ovejas no gestantes, morfología de embriones en el día 13 en ovejas apareadas, y diferentes dosis de P4 tratadas entre los días 2-4.

Dosis diaria de P4.	Días del estro	Número de ovejas que contienen embriones con su respectiva morfología.			
		Esférica/ovoide	Tubular	Pequeña filamentosa	Grande filamentosa
0	17.0	6	4	3	1
1.5	16.7	5	4	5	0
3.0	16.7	5	4	4	0
6.0	15.8	1	1	9	1
12.0	15.4	1	0	9	1

Citado de Pope, *et al.* (1994). Traducido por Peñaloza & Romero. (2015)

En este estudio se observa la influencia de la P4 exógena en diferentes dosis sobre el desarrollo embrionario al día 13 de preñez.

En una investigación realizada en bovinos, Garrett, *et al.* (1988), citados por Clemente, *et al.* (2009) administraron 100 mg de P4 en los días 1, 2, 3 y 4 luego del servicio y esto resultó en un aumento periférico de la concentración plasmática de P4 en los días 2-5 y un aumento significativo del tamaño de los embriones en el día 14. Carter, *et al.* (2008), usaron un implante con P4 en el día 3 después del servicio encontrando concentraciones significativamente elevadas de P4 hasta el día 8 y esto fue asociado a embriones de mayor tamaño recuperados en el día 16 después de la inseminación artificial. Del mismo modo, cuando las ovejas recibieron diariamente inyecciones de 25 mg P4 a las 36 horas pos-monta el diámetro del blastocito aumentó en 220% al día 9 y el alargamiento de los blastocitos era mayor (Satterfield, Bazer, & Thomas, 2006).



Cuadro N° 2. Porcentaje de crías en ovejas tratadas con P4.

	Control	P4
Numero de ovejas de la raza Targhee		
Individual	4	5
Gemelos	28	23
Trillizos	2	6
Cuatrillizos	0	0
Total	34	34
Numero de ovejas de la raza Polypay		
Individual	1	2
Gemelos	11	5
Trillizos	1	10
Cuatrillizos	0	1
Total	13b	18
% de partos		
Targhee	194	203
Polypay	200	256
Total	196	221
% de concepción	89	93

Citado de Pope, *et al.* (1994). Traducido por Peñaloza & Romero. (2015)

En el estudio realizado por Pope, *et al.* (1994) se demostró que además de mejorar el desarrollo del embrión, la aplicación de P4 exógena post-servicio aumentó ($P < 0,05$) el porcentaje de parición en las ovejas.

2.4 IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN

“Es un complejo proceso que comprende una serie de etapas interactivas, que comienzan con la fijación del blastocito al útero y terminan con la formación de la placenta definitiva” (Góngora, 2002).

El ovulo fertilizado, se mueve hacia la parte inferior del oviducto, al mismo tiempo comienza la división celular. El nuevo ser permanece libre en el útero hasta que se



une a las carúnculas de la pared uterina, lo que acontece entre los días 20 y 25 después de la fertilización (Durán, 2008).

Según Harvey, *et al.* (1995) citado por Góngora, *et al.* (2002 “el éxito de la implantación depende de la sincronía e intercambio molecular madre-embrión inducidos en el útero cuyo control se atribuye principalmente, a los E2 y P4”.

La implantación alcanza 3 etapas: **pre-adhesión**, elongación considerablemente.

Aposición, contacto celular entre el trofoblasto y el epitelio uterino. **Adhesión**, etapa final del proceso, el cual culmina con un aumento de la estructura celular de la placenta (Góngora, *et al.* 2002).

El período peri-implantación es crítico con respecto a la supervivencia del embrión. Cuando esta dinámica es adecuada, se asegura la supervivencia del embrión en sus primeras fases, tomando en cuenta que no intervienen otros factores que impidan terminar la gestación (Durán, 2008).

2.5 CUERPO LÚTEO (CL)

2.5.1 Desarrollo y regresión fisiológica del CL

El CL es una glándula temporal que se desarrolla a partir a del folículo ovulatorio, proceso conocido como luteinización. Este proceso consiste en cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos que ocurren en el folículo preovulatorio hasta que este se transforma en un CL funcional (Hernández & Zarco, 1998).

Durán (2008), afirma que después de la ovulación el folículo de Graaf que ha ovulado, se llena por un coágulo de sangre constituyendo lo que se conoce con el nombre de cuerpo hemorrágico. Por influencia de la oleada de hormona luteinizante (LH), las células de la granulosa, en la pared del folículo ovulado, proliferan y se transforman en células luteínicas que subsiguientemente llenan el antro del folículo. Para llegar a CL funcional, este crecimiento celular se acompaña de un aumento de la actividad de síntesis de las mismas (síntesis de P4), proceso que dura entre 4 y 5 días.



Adaptado de Senger, 2004

Grafico N° 5. Formación del cuerpo Lúteo.

El CL es de los pocos órganos que tienen una fase de crecimiento, desarrollo y regresión. La regresión lútea es ocasionada por la liberación pulsátil de PGF2 α , la cual actúa sobre el CL ocasionando cambios que conducen a su degeneración. El mecanismo por el cual se inicia la síntesis y secreción de la PGF2 α depende de una interacción entre el CL, los folículos ováricos, sus secreciones y el útero. Los E2 desempeñan un papel importante en el inicio de la secreción de PGF2 α (Hernández & Zarco, 1998).



2.5.2 Función del cuerpo lúteo

Los niveles de P4 en la corriente sanguínea, alcanzan un máximo 6 días aproximadamente después de la ovulación y, en el caso de haber fertilización y gestación, permanecen altos a lo largo de la misma. Hernández & Zarco, (1998), afirman que “en los días 4 o 5 después de la ovulación las concentraciones de P4 en sangre son mayores de 1 ng/ml, lo que indica que el CL ha adquirido su plena funcionalidad”. Si la hembra no es capaz de concebir, transcurrido unos 11- 12 días (oveja), el endometrio comienza a segregar PGF2 α , el CL disminuye de tamaño, empalidece y comienza a descender la secreción de P4.

Las disfunciones del CL han sido las más discutidas como la causa de pérdidas embrionarias. Se pueden encontrar dos tipos de alteraciones en la función lútea: la primera consiste en un acortamiento de su vida media y la segunda, en la que se observa una producción subnormal de P4 (Hernández & Zarco, 1998).

- Regresión Prematura y muerte embrionaria

En los animales estacionales, como la oveja y la cabra, se desarrollan CL de vida corta al iniciarse la estación reproductiva, estos CL se caracterizan porque la regresión lútea ocurre entre el día 4 y 6 después de la ovulación, lo cual obedece a un adelanto en la secreción pulsátil de PGF2 α de origen uterino, similar a la que ocurre al final de una fase lútea normal. La causa de la liberación prematura de PGF2 α no se conoce totalmente, sin embargo, se ha observado que en las



hembras que presentan CL de vida corta aparecen en endometrio receptores para oxitocina desde el día 5 después de la ovulación (Hernández & Zarco, 1998).

La regresión prematura del CL también es un problema frecuente en las hembras ovinas y caprinas superovuladas, en las cuales, debido a la presencia de folículos anovulatorios que aportan concentraciones altas de estradiol, se desencadena la secreción de PGF2α provocando regresión lútea temprana. Duran, (2008) en sus citas menciona que si el CL falla en la producción de P4 para nutrir al útero se producirá la muerte del embrión, al igual que la muerte también puede ocurrir si el embrión llega demasiado temprano, sin capacidad de segregar interferón TAO y por lo tanto incapaz de inhibir la secreción por parte del endometrio, con lo cual el CL será destruido antes de tiempo. Producto de esto, la P4 no ejerce sus efectos y el embrión muere.

- Secreción subnormal de progesterona y muerte embrionaria

Esta anormalidad también es común en vacas en lactación que se encuentran en balance negativo de energía durante las siguientes 6 semanas posparto (Hernández & Zarco, 1998). Se ha observado que las vacas sujetas a estrés calórico producen menos P4 que las vacas que se encuentran en temperatura de confort. Mann & Lamming, (2001).



2.6 PROGESTERONA

2.6.1 Mecanismo de acción de la progesterona sobre el embrión

El mecanismo de acción por el que la P4 estimula el desarrollo del embrión no se ha dilucidado, pero hay evidencias disponibles que indican que los cambios inducidos por la P4 en la expresión de genes endometriales conducen a cambios en la composición de histotrofo que son necesarios para la supervivencia después de la eclosión y el crecimiento del producto de la concepción (Forde, *et al.* 2009).

Garrett, *et al.* (1988) afirman que “la P4 actúa sobre el útero para estimular indirectamente el crecimiento del blastocistos y el alargamiento del embrión antes de la implantación”.

Según Booth & McDonald (1988) mencionan que la P4 regula los cambios que deben ocurrir en el oviducto y el útero para que el embrión se desarrolle, al mismo tiempo actúa coordinando las secreciones uterinas, de las cuales los embriones recibirán los nutrientes y sustancias que estimulan su crecimiento y diferenciación.

Clemente, *et al.* (2009) en sus conclusiones menciona que el efecto de la P4 en el desarrollo embrionario es mediada exclusivamente a través del endometrio. Más aún, el embrión no necesita estar presente en el útero durante el período de elevación de la P4 con el fin de beneficiarse de ella. Esto sugiere que las concentraciones de P4 antes del día 7 son las causantes de las modificaciones



uterinas que, a través de las modificaciones del histotrofo tendrán sus efectos en el desarrollo embrionario.

Forde, *et al.* (2009) indicaron la importancia del histotrofo (leche uterina) para el desarrollo del embrión. Esto se demostró en un modelo de ovinos con knockout de sus glándulas uterinas (UGKO; uterine gland knock-out) en el que los embriones no se desarrollan más allá de la etapa de blastocistos (ej. día 14) (Spencer & Gray, 2006). El mismo autor y su grupo Spencer, *et al.* (2008) mencionan que es probable que la P4 afecte el desarrollo del embrión, al menos en parte, mediante la alteración de la expresión temporal y espacial de genes reguladores clave requeridos como parte de la cascada bioquímica que controla el desarrollo embrionario temprano hacia la preparación del endometrio para la implantación.

En las conclusiones de un estudio realizado por Clemente, *et al.* (2009) en bovinos menciona que: 1) el ARNm para PGR (receptor nuclear para progesterona) existe en el embrión, lo que aumenta la posibilidad de un efecto directo de P4 en el embrión. 2) La suplementación con P4 durante el cultivo de embriones in vitro no afecta a la proporción de los cigotos que llegan a la etapa de blastocito in vitro, el número de células y la asignación dentro del blastocito, la abundancia de ARNm de las transcripciones seleccionadas o alargamiento después de la eclosión in vivo. 3) La elevación de P4 in vivo antes de la transferencia de embriones conduce a un aumento dramático en longitud del embrión en el día 14 (4 veces más grande). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la asociación bien



descrita entre la elevación temprana de P4 post-concepción y la longitud avanzada del embrión no se debe a un efecto directo de la P4 sobre el embrión, sino más bien debido a los cambios inducidos por P4 en el entorno en el que el embrión se está desarrollando.

Beltman, *et al.* (2009) citan “la reducción de las concentraciones circulantes de P4 durante los primeros 7 días post-servicio resultan en una alteración en el transcriptoma endometrial y el retraso en la elongación del embrión”.

Sin embargo, y en forma opuesta a los efectos beneficiosos de la P4 en la elongación embrionaria, también hay evidencias en la literatura de que su administración en un momento temprano después de la fertilización puede comprometer la función del CL, en última instancia conduciendo a luteólisis temprana y a la pérdida de embriones (Garret, *et al.* 1988).

De acuerdo a las conclusiones realizadas por estos autores se puede observar que tanto los niveles subóptimos y supraóptimos de P4 afectarían la tasa de supervivencia embrionaria en las primeras semanas de gestación. Esto sugiere que para la aplicación de esta hormona, previamente se debe definir la dosis con la que por una parte se beneficie directamente al desarrollo del embrión y por otra, no se afecte la vida útil del CL o que al menos, este acortamiento no afecte la sobrevida embrionaria (Peñaloza & Romero, 2015).



2.6.2 Efecto de la progesterona en el útero

A lo largo del ciclo estral, la P4 determina los cambios histológicos en el útero, estimula el crecimiento y desarrollo del endometrio, además actúa en la acumulación de glucógeno, la secreción en las glándulas uterinas, disminuye la sensibilidad del miometrio a la oxitocina y en las trompas de falopio, estimula el transporte de las gametas (Kayser, *et al.* 2006).

Gonella, *et al.* (2010) mencionan que “los estrógenos estimulan la vascularización del endometrio durante el estro y aumentan la actividad muscular uterina, en tanto que la progesterona provoca disminución de la motilidad y crecimiento de los epitelios de revestimiento y glandular del endometrio”.

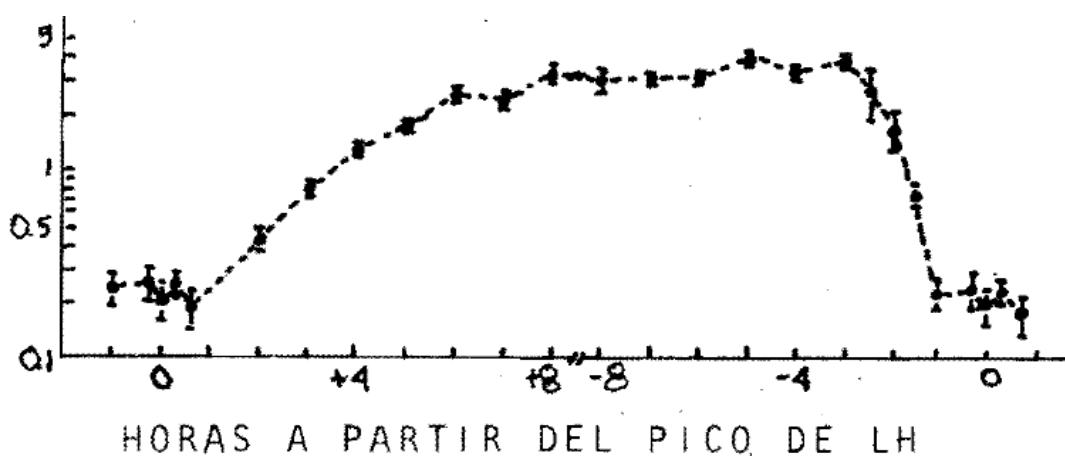
Según Rabbani & Rogers, (2001) citados por Gonella, *et al.* (2010) “Los cambios morfológicos del útero debidos al control materno, se observan en todo el órgano, mientras que el embrión los induce sobre la zona de preferencia para la implantación”.

El control materno se hace principalmente a través de la P4 la cual, en la fase luteal, inhibe la expresión de algunas moléculas de la familia de factores de crecimiento (VEGF, Factor de Crecimiento Epidermal y sus receptores específicos), que son normalmente estimulados durante la fase folicular por acción del estradiol, por ende, durante la fase luteal disminuye el edema y aumenta la producción glandular del útero.



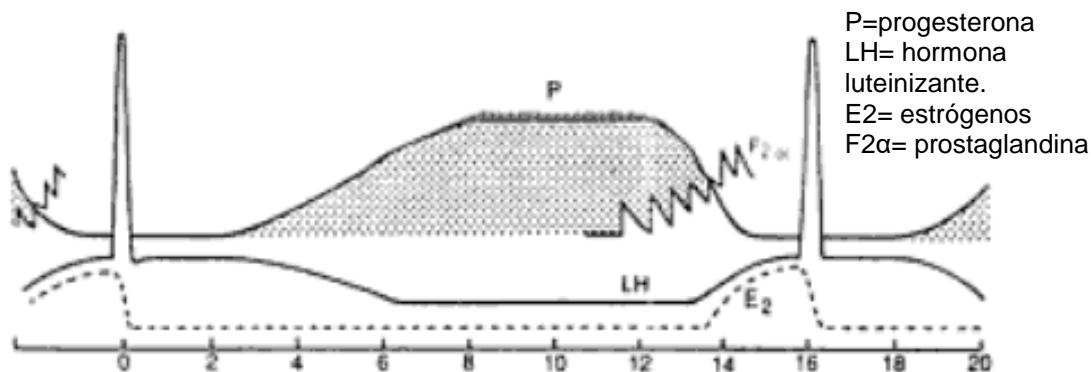
Si no hay una señal de reconocimiento materno habrá lisis del CL y se dará inicio a un nuevo ciclo estral. Cuando termina el diestro, la oxitocina estimula la producción de PGF_{2α} en el endometrio, principal molécula luteolítica en los rumiantes. Los mecanismos luteolíticos que se originan en el endometrio uterino requieren de una secuencia de efectos producidos por las hormonas progesterona estrógenos y la oxitocina, las cuales actúan a través de sus receptores específicos (Cullinan & Koos, 1993).

2.6.3 Niveles de progesterona en sangre.



Padilla, et al. (1988) indican que durante el ciclo estral de la oveja la concentración de P4 presenta variaciones cíclicas en sangre periférica. Los niveles basales (0.2 ng/ml), se observan alrededor del estro, desde uno o dos días antes hasta cuatro días después. Por otro lado López, et al. (1993) exponen que en sangre periférica

las concentraciones de P4 comienzan a ser detectables a partir de los tres días del celo. A partir del quinto día la concentración aumenta a 2-4ng/ml y permanece estable hasta por seis o siete días. Estas concentraciones disminuyen a valores menores a 1.0 ng/ml dentro de las 36 h que preceden al siguiente estro (Grafico 6) (Padilla, et al. 1988).



(Mediavilla, 1994).

Grafico N° 7. Variaciones hormonales durante el ciclo estral de la oveja.

Por su lado (Mediavilla, 1994) en la grafica 7, menciona que la secreción de P4 es de tipo pulsátil y experimenta un aumento gradual desde el día 0 del ciclo (los niveles en sangre son casi indetectables los primeros tres días) hasta el día 7, a partir del cual permanece prácticamente constante hasta el día 14.



2.7 SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y ESTIMULACIÓN OVÁRICA

2.7.1 Principio de la sincronización del celo.

De forma natural, las ovejas se reproducen en ciertas épocas del año. Sin embargo, cuando el estro y la ovulación son inducidos, estas hembras pueden ser inseminadas en cualquier momento siempre que tengan buena salud y presenten buena condición corporal (Córdova, *et al.* 2008)

El tratamiento hormonal está basado en la simulación de los acontecimientos endocrinos que regulan el ciclo sexual de la oveja, con la finalidad de inducir el celo y estimular el crecimiento y la ovulación de la población de folículos en un momento determinado (Simonetti, 2008).

2.7.2 Métodos de sincronización del estro

Progestágenos

La progesterona y sus análogos sintéticos han sido empleados en la regulación del ciclo astral de los ovinos a partir de la observación de que la progesterona producida naturalmente por el cuerpo lúteo inhibe el desarrollo folicular terminal y la ovulación. El método más difundido es la utilización de esponjas de poliuretano impregnadas de un análogo de la progesterona o progestágeno. Los progestágenos más utilizados son el acetato de medroxiprogesterona (MAP) y el acetato de flurogestona (FGA) (Córdova, *et al.* 2008).



La colocación de esta esponja es por vía intravaginal y tiene por finalidad simular la fase lútea del ciclo sexual, independientemente de la época del año o del momento del ciclo en que se encuentre la oveja al iniciar dicho tratamiento. La esponja permanece en la vagina durante un tiempo equivalente al de la fase lútea de un ciclo natural, es decir 12 a 14 días, al final del cual es retirada por tracción de sus hilos (Córdova, *et al.* 2008).

Durante su permanencia, la esponja va liberando su principio activo, de modo que las concentraciones elevadas del progestágeno inhiben la secreción pulsátil de GnRH por parte del hipotálamo, con el consecuente bloqueo de la secreción de LH y de la ovulación. La retirada de la esponja provoca la disminución rápida en la circulación de las concentraciones del progestágeno y por lo tanto se produce la desaparición de la inhibición del eje hipotálamo-hipofisario y el comienzo de los acontecimientos endocrinos que inducen el celo y la ovulación. Estos fenómenos se presentan en forma sincronizada (Baril, *et al.* 1995).

Prostaglandinas

La PGF_{2α} en forma natural provoca la regresión del CL (luteólisis) en todas las hembras de mamíferos, incluyendo la especie ovina. Entre los días 13 a 15 del ciclo astral de la oveja se produce la luteólisis y la caída brusca de los niveles de progesterona por acción de la PGF_{2α} sintetizada por el endometrio cuando no existe el reconocimiento materno. En virtud de su mecanismo de acción, ha sido propuesta la administración de PGF_{2α} o sus análogos sintéticos en programas de sincronización de los celos (Simonetti, 2008).



Esta hormona necesita por lo tanto la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario de la hembra para poder actuar. Una vez realizada la primera aplicación de prostaglandina, no todas las ovejas responden a la misma (las que están en los primeros y últimos días del ciclo) y en las que responden, la dispersión de celos va a ser alta. Esta limitante en la capacidad de respuesta en función del momento de la fase lútea, hace necesario realizar dos inyecciones con un intervalo de entre 9 a 12 días lo que permite que en la segunda aplicación, todas las ovejas tengan un cuerpo lúteo y por ello la mayoría respondan y las manifestaciones de celo sean más concentradas en tiempo (Prieto, *et al.* 2010).

2.7.3 Tratamiento de estimulación ovárica

Durante los ciclos foliculares, el reclutamiento de los folículos antrales es dependiente de la FSH endógena. Esta es limitada hacia el final del ciclo cuando los folículos dominantes sintetizan cantidades suficientes de inhibina y estradiol. La retroalimentación negativa de estas hormonas sobre la secreción de FSH reduce su concentración por debajo del umbral necesario para un mayor reclutamiento. En la superovulación, las gonadotrofinas exógenas son aplicadas para suplementar a la FSH endógena a los efectos de aumentar el número de folículos reclutados y así aumentar los folículos que ovulan. Su mecanismo de acción está basado en la unión y activación de los receptores de FSH de las células de la granulosa presentes en los folículos (Simonetti, 2008).



El aumento de la tasa ovulatoria por encima de la normal inducido por las gonadotrofinas exógenas se produce mediante la combinación de distintos mecanismos. Entre ellos, el reclutamiento de folículos más pequeños, de modo que el tamaño mínimo de los folículos para ser reclutados disminuye a unos 0,8 mm. También se produce una disminución del tamaño de los folículos preovulatorios, a unos 2-3 mm. Un trabajo reciente ha establecido que los folículos ovulatorios deben alcanzar mínimo 3 mm para producir ovocitos con buena viabilidad, en tanto que aquellos que miden 2 mm suelen asociarse a mayores tasas de degeneración embrionaria (Sanchez, *et al.* 2014).

El reclutamiento de folículos demasiado pequeños, que tendría lugar especialmente en ovejas con tasa ovulatoria elevada, no permitiría un adecuado desarrollo folicular y maduración del ovocito, aun cuando fueran capaces de ovular. Gonzalez, *et al.* (2000) citado por Simonetti (2008) señala que la cantidad de CL estaría relacionada con la población de folículos de al menos 4 mm al momento del inicio del celo, pero no con la clase más limitada de folículos iguales o >a 6 mm, tamaño referido como ovulatorio en ovinos.

La superovulación en ovinos ha sido realizada mediante la utilización de las hormonas más comúnmente empleadas (eCG y la FSH).

Gonadotrofina Corionica Equina (eCG)

La eCG es una gonadotrofina extra hipofisaria, producida en las copas endometriales de yeguas preñadas de 40 a 130 días. Pertenece al grupo de las



glicoproteínas, constituida por 2 cadenas polipeptídicas (subunidades α y β) en las cuales se han insertado azúcares y ácido siálico. Peso molecular elevado, de 68.000 a 75.000 daltons (Simonetti, 2008).

Su acción presenta actividad tanto de FSH como de LH cuando es inyectada en una especie distinta a la equina. Aunque predomina la actividad FSH, la relación FSH:LH resulta muy variable en función de factores tales como la raza y el momento de la gestación de las yeguas de las cuales se obtiene. La eCG actúa sobre la población folicular, de modo que promueve el desarrollo folicular, la secreción y la multiplicación de las células de la granulosa e induce la liberación endógena de LH (Jiménez, 2009).

En virtud de su elevado contenido en ácido siálico, la eCG no pasa el filtro renal, con lo cual su período de acción es largo, con una vida media de aproximadamente 21h. Esta característica le confiere utilidad práctica al permitir su administración en una única inyección. Se recomienda su aplicación 24 a 48 h previas a la finalización del tratamiento de sincronización, en una dosis que varía entre 1000 y 2000 UI (Mamani, *et al.* 2012).

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

La FSH es una hormona glicoproteica producida en las células gonadotrofas de la adenohipófisis, posee un bajo contenido de ácido siálico, lo que hace que su vida media en la circulación sea de sólo 3 a 5 horas (Simonetti, 2008).



La utilización de FSH se asocia con una menor variabilidad en la tasa ovulatoria y con una menor cantidad de folículos anovulatorios, de modo que no causaría una alteración importante en los procesos de esteroidogénesis, produciendo unas adecuadas tasas de fertilidad y recuperación (Mamani, *et al.* 2012).

Las fuentes comerciales de FSH disponibles en el mercado son extractos de pituitaria de diferentes especies, principalmente la porcina y la ovina. Son administradas en una dosis que varía entre 16 y 21 mg según las razas (Gibbons & Cueto, 2013).

Se sabe que la FSH comercialmente contiene cantidades altas de FSH y variables de LH, dependiendo del producto. De este modo, algunos autores destacan que las preparaciones de FSH lograrían una mejor respuesta si su contenido LH fuera inferior al 10% debido a que la relación FSH: LH sería crítica para el desarrollo preovulatorio de los folículos y la ovulación. Concentraciones elevadas de LH durante un lapso extenso antes del pico de LH alterarían éste y la habilidad de los folículos para ovular sin modificaciones en el reclutamiento y crecimiento (Simonetti, 2008).

La adición de eCG permitiría disminuir la dosis de FSH a administrar, con la ventaja de reducir el costo del tratamiento, debido a las diferencias en precios entre estas dos fuentes hormonales (la eCG es más económica que la FSH) (Peñaloza & Romero, 2015).



La FSH presenta una vida media corta, se requiere una administración frecuente de la misma con la finalidad de mantener concentraciones plasmáticas suficientes para lograr una respuesta ovárica adecuada (Mamani, *et al.* 2012). De este modo, debe ser repartida en un régimen de dosis múltiples constituido por inyecciones dos veces por día durante un lapso de 2 o 4 días (Conde, 2014).

Por otra parte, la habitual contaminación con LH de las preparaciones de FSH hace necesario la dosificación de la hormona en un régimen de concentraciones decrecientes, en tanto que las preparaciones más puras serían más laxas en su dosificación (Mamani, *et al.* 2012).

Estos regímenes de inyecciones de los tratamientos súper ovulatorios basados en FSH pueden resultar estresantes para los animales, laboriosos desde el punto de vista técnico y pueden conllevar errores en la dosificación y en los tiempos de inyección (Jiménez, 2009).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Biológicos

- 21 ovinos hembras, 4 ovinos machos.

3.1.2 Físicos

- Ecógrafo
- Computadora
- Ropa de trabajo
- Materiales de campo (jeringas, agujas, campos, cámaras fotográficas, sogas, etc.)
- Material de laboratorio
- Equipo de laboratorio (microscopio, vernier, placas, etc.).
- Suministros de oficina
- Instrumental quirúrgico, camilla para cirugía

3.1.3 Químicos

- Progesterona (Progesteron®).
- Progestágenos sintéticos (Acetato de medroxiprogesterona)/dispositivos intravaginales.

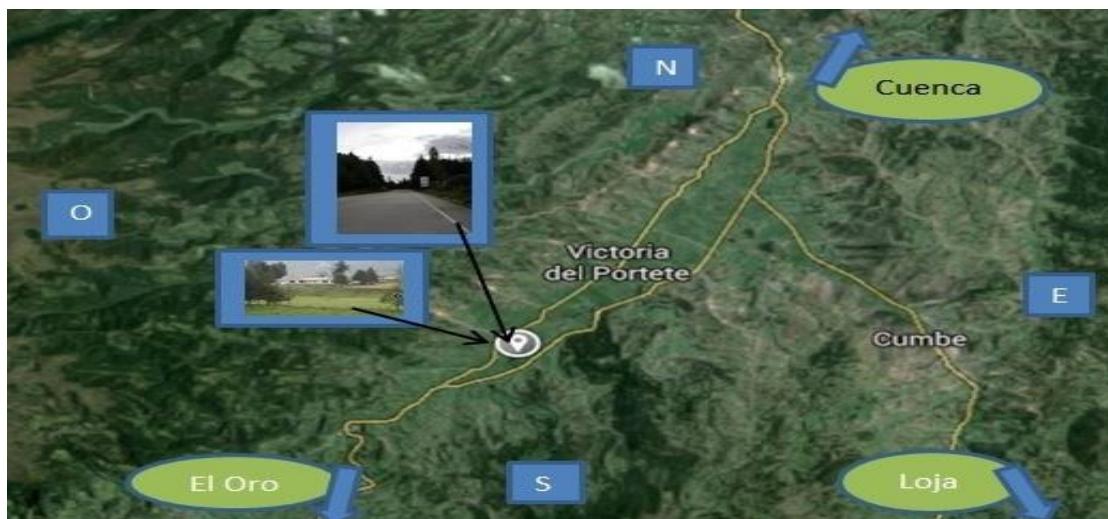


- Hormona folículo estimulante (Folltropin- v ®)
- Gonadotrofina corionica equina (Folligon®)
- Prostaglandinas
- Vitaminas (AD₃E., complejo B)
- Antiparasitarios (albendazol, levamisol)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Área de estudio

Área de estudio



La investigación se realizó en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, cuyas coordenadas son: 3044181 S y 79040813 O. Se encuentra ubicada en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, provincia del Azuay, en el km 23 vía Girón a 2.714msnm, con una temperatura que fluctúa entre 9°C 22°C, (humedad relativa



del 80% y pluviosidad de 800mm a 2.000mm. Este centro de producción dispone de 429,11 hectáreas entre bosques nativos y exóticos; 55 hectáreas de pasto; 18,49 hectáreas de pajonal; 5 hectáreas de vías (Universidad de Cuenca, 2015).

3.2.2 Metodología de la investigación

Fase de selección de los animales y acondicionamiento.

Se utilizaron hembras de raza Corriedale provenientes de las granjas experimentales de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y algunas fueron adquiridas de fincas de la zona que disponen de esta raza. Se prepararon corrales móviles con bastidores de alambre y se acondicionó un establo donde los animales eran ubicados por la noche y recibían la suplementación alimenticia. Los corrales móviles permitían desplazarlos en función de la disponibilidad de forraje de cada espacio utilizado.

Fase de adaptación

El grupo de ovejas fue ubicado en la granja Irquis 60 días antes del inicio de la etapa experimental con la finalidad de adaptarlas al nuevo sistema de manejo y mejorar su condición corporal. Se realizó un estudio ecográfico para descartar preñez. Adicionalmente todas las ovejas recibieron 0,5 ml (37,5 µg de d-Cloprostenol (Gestavet®Prost) y se las mantuvo separadas de los machos. Las hembras recibieron las mismas condiciones de manejo y sanidad, siendo alimentadas con pasturas (mezcla forrajera kikuyo, raygrass, trébol) y



suplementadas con silo de maíz a razón de un total de 0.8 kg por día/oveja. Seis semanas antes del inicio del experimento, los animales fueron vacunados con dosis de 2,5 ml/oveja de bacterina triple toxoide (Sintosept®), desparasitados con antihelmínticos en dosis de 10mg/kg (Albendazol 2,5%) y levamisol en dosis de 5mg/kg (levamisol 15% Genfar®), conjuntamente con la administración de vitaminas (vitamina AD₃; Complejo B;), y minerales (Energizante®). Durante este mismo periodo, las ovejas fueron esquiladas y arregladas las pezuñas. El período de adaptación fue de cuarenta y cinco días

El peso promedio de las hembras al inicio del estudio fue de $40,7 \pm 1,79$ kg, con una condición corporal de $3,3 \pm 0,09$ en escala de 1-5 puntos (Manazza, 2006) la edad promedio fue $20,9 \pm 1,16$ meses.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Peso
- Condición corporal
- Edad no > a 6 años y no < a 12 meses.
- Raza

Criterios de exclusión:

- Animales con problemas reproductivos
- Hembras con ausencia de respuesta ovulatoria.



Fase de preparación

Quince días antes del estudio las ovejas recibieron un flushing alimenticio, que consistía en un alimento balanceado a base de maíz, soja, afrecho, melaza, sema, cochinilla, prebióticos, antibióticos y sales minerales, con un estimado del 14 al 16% de proteína. Algunos autores, entre ellos Acurero, (2000), mencionan que el flushing estimula los ovarios para que produzcan un mayor número de óvulos, incrementando así el número de crías por parto. La cantidad de alimento suministrada durante la etapa de flushing fue de forma creciente, iniciando con 50gr/día/oveja en los primeros 5 días, llegando a un pico de 500gr día/oveja en los 5 días posteriores, para finalizar con un decremento hasta 50gr/día/oveja en los últimos 5 días. Dos días antes del servicio se disminuyó en su totalidad.

Las ovejas durante el día permanecieron en pastoreo y por las noches fueron confinadas en un establo de 25m², para suministrar el balanceado y evitar la presencia de un pastor durante las noches.

- Sincronización de celos

Se realizó un segundo estudio ecográfico para descartar gestación y luego de confirmar ausencia de la misma se procedió a la sincronización. A todas las hembras que ingresaron al experimento, se les aplicó un dispositivo intravaginal (espuma de poliuretano o esponja) impregnado con 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP). Para prevenir infecciones en el tracto reproductivo, se inyectó en cada implante 500 mg de oxitetraciclina al 20%, y se mantuvo una



correcta asepsia del aplicador en la colocación entre hembra y hembra. El implante fue retirado 12 días después de su colocación.

Con fines de aumentar el número de cuerpo lúteos y embriones las ovejas fueron sometidas un proceso estimulación ovárica, utilizando FSH (hormona folículo estimulante Folltropin®) y eCG (gonadotrofina corionica equina Folligon®). Este procedimiento se inició 10 días después de la colocación del implante intravaginal

Anexo 7.

- **Superovulación con FSH**

Se aplicó un total de 100 mg de (Folltropin-v®) por oveja fraccionado en 6 dosis decrecientes aplicadas cada 12h durante 3 días. Se inició el día uno con 20 mg, el día dos con 16 mg y el día tres con 14 mg (estas dosis fueron aplicadas 2 veces al día), coincidiendo con la penúltima dosis de FSH se aplicó 500 UI de eCG más 100 μ g de D-cloprostenol (CICLASE DL®) y se retiró del dispositivo.

- **Superovulación con eCG**

Se administraron 1000 UI de eCG (5ml) 10 días posteriores a la colocación del dispositivo intravaginal y 500 UI más 100 μ g de D-cloprostenol (CICLASE DL®) en el día 12 que coincidió con la retirada del implante de progesterona.

- **Servicio con carneros**

El celo fue detectado con ayuda de un macho detector 12 horas post-retiro de los implantes intravaginales. Se observaron en tres momentos del día (6: am, 12:pm,



16:pm) durante treinta minutos para precisar el inicio del celo en los dos métodos de superovulación. La fertilidad de los carneros fue previamente examinada de forma independiente mediante un examen de aptitud reproductiva. El servicio se realizó a las 12 horas posteriores al inicio de celo mediante el siguiente protocolo:

- Se realizó la adecuación de los corrales, seguido de la selección de las hembras por peso, tamaño y edad. Se dio monta voluntaria al grupo de hembras seleccionadas con un macho acorde a las condiciones de las ovejas, y posteriormente se dio monta asistida con los tres machos restantes.

La monta fue realizada con una diferencia de 12 horas a partir del primer servicio por cada oveja, con un promedio de 3 servicios. Los carneros fueron alternados en cada servicio para evitar el agotamiento. Cabe recalcar que los carneros fueron seleccionados de acuerdo al peso que presentaba cada grupo de ovejas al momento del servicio, utilizando un total de 4 machos. Su semen fue valorado macroscópicamente y microscópicamente antes de su uso.

3.2.3 Tratamientos

A los fines de cumplir con los objetivos planteados, los animales fueron ordenados en tres tratamientos:

- *Tratamiento 1* : grupo control



- *Tratamiento 2:* 6 mg/día/oveja/IM de P4 desde el día 2 al 4 posteriores al servicio.
- Tratamiento 3: 6 mg/día/oveja/IM de P4 desde el día 3 al 5 posteriores al servicio.

3.2.4 Diseño

Para el presente trabajo se utilizó un diseño de bloques al azar (DBA), en el que se realizó siete bloques o repeticiones de tres ovejas formados de acuerdo a ciertos criterios de homogenización, con los tratamientos (T1, T2, T3) distribuidos al azar. Con esto se buscó que exista la máxima homogeneidad dentro de los bloques Anexo 8.

3.2.5 Aplicación de P4 y toma de muestras sanguíneas

Todas las inyecciones se aplicaron por la mañana (6mg/día) de progesterona. Seis horas posteriores a la aplicación de la progesterona se realizó la extracción de 5 ml de sangre mediante punción de la vena yugular considerando la asepsia en todo el proceso, con agujas de 16-G y se utilizó tubos **Vacutainer™** sin heparina para su almacenamiento. Una vez consolidado el coágulo, los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm/10 min y el suero sobrenadante fue colocado en tubos eppendorf de 2 ml e inmediatamente las muestras fueron congeladas a -20°C. El dosaje de progesterona se llevó a cabo en el laboratorio CENBIOCLI mediante el



método de electroquimioluminiscencia, utilizando los reactivos Progesterona II (Cobas ®), con una sensibilidad de medición de 0.15 ng/ml.

Los muestreos de sangre se llevaron a cabo en los siguientes momentos.

- 1- En los tres días siguientes a la aplicación de progesterona para determinar el efecto de los tratamientos sobre la progesterona circulante.
- 2- El día 13 después del servicio para determinar la función del cuerpo luteo.

3.2.6 Técnica quirúrgica

Los animales fueron sometidos a ayuno completo 24h previo a la laparotomía. El día de la cirugía fueron tranquilizadas con 0.2mg/kg de xilazina al 2% intramuscular. Se ubicó en una camilla en posición decúbito dorsal y sus miembros atados a los costados de la misma. Una vez rasurada e higienizada la zona ventral por delante de las mamas se aplicó un anestésico por infiltración en el área de incisión (5 ml de lidocaína al 2%). En la primera parte de la cirugía, la camilla fue ubicada en plano inclinado con la cabeza del animal hacia abajo con el fin de desplazar las vísceras hacia craneal y facilitar la posterior búsqueda del tracto genital. Posteriormente se realizó la apertura de la cavidad abdominal y la exteriorización del útero que fue colocado sobre campos quirúrgicos preparados al efecto y fueron permanentemente rociados con solución fisiológica heparinizada para evitar futuras adherencias. En el resto del procedimiento la camilla fue nuevamente horizontalizada para mejorar el confort del animal.



3.2.7 Medición del cuerpo lúteo

Antes de comenzar con la recuperación embrionaria, se realizó la determinación de la respuesta ovulatoria (recuento del número de cuerpos lúteos, CL), mediante exteriorización de los ovarios. El tamaño de los cuerpos lúteos se midió con un calibrador o vernier.

3.2.8 Colecta de embriones

La recuperación embrionaria se realizó de la siguiente manera: Colocación de una sonda Foley 32 G (Nº. 8 Fr/Ch) de 3-5 ml/cc y 2,7mm con dos perforaciones laterales en su extremo. Para ello se realizó una punción en la región previa a la bifurcación cornual por la que fue insertada la sonda y después de introducida unos 3 cm se infló el globo que hay en su extremo con 5 ml de aire con el fin de fijar la sonda al cuerno y por otra parte, para formar una cavidad cerrada entre el globo y la región útero-tubárica.

En la región útero-tubárica se hizo un nuevo orificio por el que se introdujo una aguja roma conectada a una tubuladura y fijada en el lugar por los dedos pulgar e índice del operador.

A partir de este momento se introdujeron 40 ml de solución fosfatada buferada (PBS) a 37 °C en la región útero-tubárica y haciendo un leve masaje sobre el cuero uterino se procedió a la recuperación del líquido a través de la sonda Foley.



3.2.9 Búsqueda de embriones

El medio de lavado recolectado fue vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realizó bajo lupa estereoscópica con platina térmica a 38 °C. Ante la ausencia de embriones se hicieron algunas variantes en la metodología de lavado para tratar de corregir los posibles errores del sistema anterior:

1. Se realizó la colecta invirtiendo la dirección del líquido inyectado. Es decir inyectando por la sonda Foley y recogiéndolo por la tubuladura colocada en la unión útero-tubárica.
2. Se colocó una sonda Foley de mayor calibre en la bifurcación de los cuernos uterinos, recuperando el líquido de colecta por la misma sonda.
3. Se procedió a realizar una ovario histerectomía (OVH) y se hizo un lavado completo del útero.

Finalizada el procedimiento de recuperación embrionaria, se reintrodujo el útero en la cavidad abdominal previo rociado con solución fisiológica heparinizada, se suturo de los planos quirúrgicos y se administró una dosis de oxitetraciclina + flumixinmeglumina (10mg/kg/pv), a más de 0,5ml/oveja de Ciclase ® (125ug de D-cloprostenol).



3.2.10 Variables

Como se trató de un proceso de superovulación los valores generales de la variable tamaño de CL fue evaluada previamente y en los análisis posteriores se trabajó con valores promedios de cada oveja. Los niveles de P4 en metaestro y función del CL se trabajó con los valores generales, con el objetivo de evaluar el efecto de la P4 exógena en “n” más grande. Anexo 9.

Niveles de progesterona en sangre, ng/ml. Fueron medidos desde el día 2 al 5 post-servicio.

Tamaño del cuerpo lúteo, mm. Fue medido en su dimensión más amplia, utilizando un calibrador en el día 13 posteriores al servicio.

Función del cuerpo lúteo, ng/ml de P4 en sangre día 13. Se evaluó por medio de una muestra de sangre realizada en ese momento, y valorado los niveles de P4 en sangre.

Tamaño de los embriones, mm. Fue planteado que serían medidos en su dimensión más amplia con lupa con escala colocada en el lente de 40x.

3.2.11 Analisis estadistico

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si las variables cumplían la supuesta normalidad. Los resultados obtenidos se sometieron a las siguientes pruebas estadísticas: ADEVA, con dos efectos (efecto del tratamiento y efecto del



bloque). Se aplicó la prueba de o Post hoc: Tukey y Bonferroni (Prueba de desempate) en la variables que presentaron diferencias significativas.

Se consideró los valores promedios \pm DE, de los niveles de progesterona y del tamaño y función del CL. Se realizaron predicciones para el análisis de correlación con las variables dependientes. Los resultados obtenidos fueron sistematizados en el programa Excel y analizados en el software estadístico SPSS versión 22.0.



4. RESULTADOS

En el Anexo 10 se muestran los resultados obtenidos que incluyen las 7 unidades experimentales, de los 3 tratamientos con un total de 21 ovejas; a los cuales se les aplico el test de Shapiro-Wilk, los mismos que cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad.

Progesterona en metaestro expresada en ng/ml (P4 M)

Cuadro N° 3. Valores promedios \pm DE de los niveles de P4 en metaestro.

VARIABLE	TRATAMIENTOS		
	T1	T2	T3
	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
Niveles de P4 en metaestro temprano	8,2 \pm 7,9 ^a	21,0 \pm 7,1 ^b	13,6 \pm 9,1 ^{ab}

^{ab}: Diferente literal en la misma fila indica diferencia estadística con la prueba de Tukey ($p<0,05$).
 DE: Desviación estándar.

En el cuadro 3 se muestran los valores promedios de P4 en metaestro. Se obtuvieron las medias \pm DE, de los tres tratamientos, los mismos fueron analizados con un ADEVA y se comprobó diferencias significativas ($P<0,05$) únicamente entre T1 y T2, siendo las mayores concentraciones en el T2 (Anexo 11).

Al realizar la comparación de esta variable entre días durante el metaestro temprano, el ADEVA indica que hubo diferencias significativas en el día 3 entre T1 y T2 ($6,49\pm6,61$ vs. $23,6\pm3,80$ ng/ml, $P<0,05$). También existió diferencia significativa en el día 4 entre T1 y T2 ($7,9\pm7,86$ vs. $25,7\pm0,28$ ng/ml, $P<0,05$);



según se muestra en la (Grafico 8). No hubo diferencias entre T1 y T2 en día 2 entre T1 y T3 en el día 4 (Anexo 11).

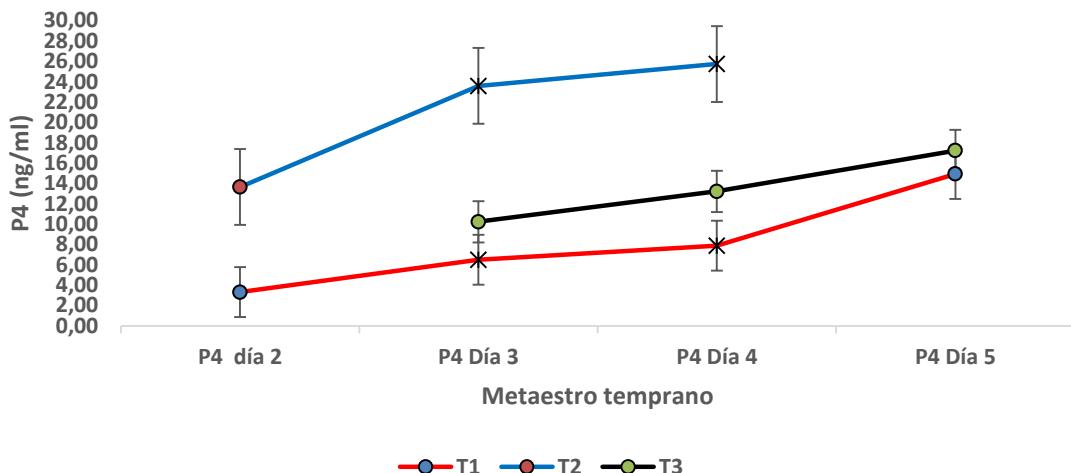


Grafico N° 8. Valores promedios de P4 sérica durante los días 2 a 5 del metaestro temprano por tratamiento. * muestra significación $P<0,05$ según Tukey.

Tamaño del cuerpo lúteo en el día 13 del metaestro (cm)

Cuadro N° 4. Valores promedios \pm DE del tamaño del cuerpo lúteo.

VARIABLE	TRATAMIENTOS		
	T1	T2	T3
	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
Tamaño del cuerpo lúteo	1,0 \pm 0,1 ^a	0,9 \pm 0,3 ^a	1,0 \pm 0,2 ^a

^{ab}: Diferente literal en la misma fila indica diferencia estadística con la prueba de Tukey ($p<0,05$).

DE: Desviación estándar.

En el cuadro 4 se muestran las medias \pm DE del tamaño del CL de cada tratamiento en el día 13, en donde T2 presentó los valores medios más bajos en relación a los obtenidos en T1 y T3. Sin embargo, al realizar el ADEVA se observó



que no existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos según Tukey (Anexo 11).

Tamaño de la masa del total de CL en el día 13 del metaestro (cm).

Cuadro N° 5. Valores promedios \pm DE del tamaño de la masa del total de CL.

VARIABLE	TRATAMIENTOS		
	T1	T2	T3
	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
Tamaño de la masa del total de CL en el día 13 del metaestro	5,5 \pm 4,3 ^a	7,3 \pm 4,6 ^a	5,5 \pm 2,2 ^a

ab: Diferente literal en la misma fila indica diferencia estadística con la prueba de Tukey ($p<0,05$).

DE: Desviación estándar.

Se obtuvieron los valores promedios \pm DE (Cuadro 5), del tamaño total de la masa de cuerpos lúteos en el día 13 por tratamientos. Los mismos que fueron analizados con un ADEVA y se comprobó que no existe diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) entre tratamientos (Anexo 11).

Función del cuerpo lúteo (niveles de P4 en día 13 medidos en ng/ml).

Cuadro N° 6. Valores promedios \pm DE, de los niveles de P4 en el día 13

VARIABLE	TRATAMIENTOS		
	T1	T2	T3
	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
Función del cuerpo lúteo	19,8 \pm 5,5 ^a	20,7 \pm 9,4 ^a	17,0 \pm 5,6 ^a

ab: Diferente literal en la misma fila indica diferencia estadística con la prueba de Tukey ($p<0,05$).

DE: Desviación estándar.

Se obtuvieron los valores promedios \pm DE (Cuadro 10) de los niveles de P4 en sangre en el día 13. Al realizar el ADEVA y se comprobó que no existe diferencias significativas ($p>0,05$) entre tratamientos (Anexo 11).



Desarrollo embrionario.

En esta variable no se pudo realizar los análisis estadísticos, descriptivos y de correlación por ausencia de embriones, por tanto no se evaluó el efecto de P4 exógena sobre el desarrollo embrionario temprano, sin embargo con los resultados de las otras variables y en base a la literatura podemos argumentarlo en la discusión.

No hubo efecto del bloque sobre las variables en estudio, lo cual indica que se realizó una distribución adecuada de las unidades experimentales en cada repetición para corregir las diferencias individuales.

En el cuadro 7 se muestra la correlación existente entre las variables estudiadas con una significación de ($P<0.05$).

Cuadro N° 7. Análisis de Correlación y regresión entre variables en estudio

VARIABLES	TRATAMIENTOS	CORRELACIÓN	SIG.	R
Correlación entre los niveles de P4 en metaestro y la función del CL.	T1	0,68	0,31	
	T2	-0,87	0,32	
	T3	0,97*	0,02	0,95
Correlación entre los niveles de P4 en metaestro y el tamaño de la masa del total de CL.	T1	0,73	0,26	
	T2	-0,29	0,80	
	T3	0,93	0,07	
Correlación entre tamaño promedio y la función Individual del CL.	T1	0,29	0,52	
	T2	0,72	0,10	
	T3	0,89*	0,04	0,79
Correlación entre el tamaño de la masa de CL y la función en masa del CL	T1	0,59	0,15	
	T2	0,68	0,13	
	T3	0,92*	0,02	0,85

cc: coeficiente de correlación

*: Significancia ($P<0.05$)



El tratamiento 3 presenta correlación significativa ($P<0,05$) entre las siguientes variables: niveles de P4 en metaestro y función del CL, con un valor de $r=0,95$. Tamaño promedio y la función Individual del CL, con un valor de $r= 0,79$. Tamaño de la masa del CL y función en masa del CL con un valor de $r=0,85$. Para los otros tratamientos no hay correlación en ninguna de las variables. (Anexo 12).



5. DISCUSIÓN

Existe una alta tasa de mortalidad embrionaria en los primeros días de la preñez en los rumiantes. La investigación realizada se planteó evaluar el efecto de la aplicación de P4 exojena en el metaestro temprano, sobre los niveles de P4 en sangre, el tamaño y función del CL en el día 13 y el desarrollo embrionario.

La aplicación de 6 mg de P4 en el metaestro temprano aumentó los niveles de P4 al inicio de la preñez en ovejas Corriedale con C.C 3,5. Los resultados obtenidos mediante el ADEVA y la Prueba de Tukey indican que existen diferencias significativas entre tratamientos. Estas diferencias ($P<0,05$) se presentó entre T1 y T2, por el contrario, no hubo diferencias ($P>0,05$) entre T1 y T3.

Estos resultados coinciden con los de Garrett *et al.* (1988) en un estudio realizado en vacas, donde encontró un incremento de los niveles de P4 en el plasma sanguíneo ($P<0,001$) en los días 2 a 5 de preñez ($3,40\pm0,09\text{ng/ml}$) vs., el control ($1,22\pm0,09\text{ ng/ml}$), cuando administraron P4 exógena en los días 1 al 4 de la gestación. Es sustancial considerar que aplicar P4 el día 1 del metaestro podría tener efectos dañinos sobre el CL, pues la ovulación se presenta hasta 32h luego al celo. Arroyo *et al.* (2006) afirman que la P4 inhibe los pulsos de la LH a nivel central y esto impide la maduración folicular y ovulación.

Estos resultados pueden explicarse bajo la hipótesis de que bajos niveles de P4 a principios de la preñez puede resultar en la pérdida embrionaria, y que la P4 complementaria disminuiría la pérdida de la preñez. Estudios previos han



demonstrado que altos niveles de P4 en el metaestro generan un aumento del tamaño embrionario pero al mismo tiempo puede acortar el intervalo inter estro (Nephew *et al.* 1991), esto lo demostró (Pope *et al.* 1995) en un trabajo en ovejas, en las que utilizó 6 mg/día de P4 entre los días 2 a 4 posteriores al servicio.

El incremento de la P4 en sangre no afectó la función y tamaño del CL, puesto que la evaluación de estas variables se hizo en el día 13, hace pensar que la duración del ciclo estral será normal y que el CL no ha sufrido regresión prematura, y en caso de haber gestación habrá un mejor desarrollo embrionario sin verse afectado el CL por efectos de la P4. Estos resultados difieren en parte con los de Pope, *et al.* (1995), pues este autor concluye que aplicar 6mg de P4 en los días 2 al 4 de la preñez acorta la duración del ciclo estral en ovejas no superovuladas.

También hay evidencias en la literatura que sugieren que la administración de P4 en la etapa temprana del ciclo estral puede comprometer la función del CL conduciendo, en última instancia a la luteólisis anticipada y pérdida de embriones (Ginther, 1970; Garrett *et al.* 1988; Macmillan & Peterson, 1993; Burke, 1993; Pope *et al.* 1995; Van Cleeff *et al.* 1996). Por su lado, Cárdenas *et al.* (1994) indicaron que el momento de la elevación de P4 durante el metaestro es fundamental para su efecto siguiente en la vida útil del CL.

O'Hara *et al.* (2014) observaron los efectos tanto paradójicos de la P4 cuando era administrada en el metaestro temprano en términos de su efecto positivo en el desarrollo embrionario y sus efectos negativos sobre la vida útil del CL. Burke *et al.* (1993) indican que la administración de P4 durante el metaestro en novillas



reduce el diámetro del CL en general, pero que en realidad se observó un acortamiento de la vida del CL solamente cuando se aplicó la P4 en forma más temprana. En nuestro estudio se observó que el tamaño de los CL en el día 13 fue similar entre los tres grupos, incluso entre el Control y el T2 que fue donde mayores diferencias en los niveles de P4 fueron observadas en el metaestro. Lo mismo se puede decir respecto a los niveles de P4 en el día 13 que fueron similares estadísticamente.

Para corroborar lo anterior, se realizaron los análisis de correlación y regresión correspondientes.

Correlación entre P4 en metaestro y función del CL.

No hay correlación entre los niveles de P4 en el metaestro y la función del CL en T1 y T2 que fueron los grupos con mayores diferencias en los niveles de P4 en el metaestro. Eso sugiere que la función del CL en el día 13 es independiente de los niveles de P4 en metaestro temprano. Sin embargo en T3 hay correlación positiva, con un valor de $r= 0,96$ lo que indica que, mayores niveles de P4 en la fase temprana podría inducir altos niveles de P4 en el último tercio del ciclo, en este tratamiento. Esto podría ser debido al momento en que estos niveles fueron incrementados en este grupo (días 3 a 5). Aunque no superan estadísticamente al control, tal vez podrían ser suficientes en esa etapa para modificar el funcionamiento del CL. Estos resultados un tanto contradictorios podrían ser debidos al tamaño de la muestra analizada en T3.



Correlación entre P4 en metaestro y el tamaño del CL.

No hay correlación en ningún tratamiento entre estas variables, lo que sugiere que el tamaño de CL, individual o en su conjunto, es independiente de los niveles de P4 en el metaestro. Woody & Ginther, (1968) mencionan que el peso del CL a los 15 días no se vio afectado significativamente por el tratamiento con P4 en la primera mitad del ciclo estral en vacas (100mg/día/en días 1a10).

Correlación entre tamaño del CL y función del CL.

No hay correlación entre estas variables en T1 y T2 es decir, la función del CL fue independiente del tamaño tanto individual como en masa, pues mayor tamaño no significa mayor función y viceversa. Esto fue ya descrito en bovinos en donde se determinó que hay estrecha correlación entre estructura y función al comienzo del desarrollo luteal, pero posteriormente esta relación se pierde (Mann, 2009). (Pesantez, 2015) reportó correlación entre tamaño del CL y los niveles de P4 en el 1/3 del ciclo pero observando que más tarde esta correlación se pierde. Además se ha visto que el descenso de la P4 precede en general al menos 2 días a la disminución del tamaño del CL (Kastelic, *et al.* 1990) lo cual sería una prueba de que el CL ha comenzado a decaer y produce menos P4 pero sin afectarse aún el tamaño del CL. Paredes *et al.* (2013) afirman que en la yegua no hay relación entre el tamaño del CL y la producción del P4 en el día 14 ($r=0,58$; $P>0,05$).

Sin embargo en T3 hay correlación con valor de $r= 0,85$ (individual) y $r=0,79$ (en masa) entre estas variables, aludiendo que la función de CL depende de su



tamaño. Quirke, et al. (1979) menciona que habrá mayores niveles de P4 al haber mayor tejido lúteo que los sintetiza. D'Enjoy *et al.* (2012), reportaron correlación positiva entre el diámetro del CL y los niveles de P4, aumentando los niveles de P4 a medida que aumenta el diámetro del CL y viceversa en vacas brahmán, sin embargo se nota claramente que a partir del día 12 del ciclo comienza a disminuir el tamaño del CL mientras la secreción de P4 sigue aumentando hasta el día 15. Esto que ocurre en las vacas *Bos indicus* es algo muy particular que no se observa en los *Bos taurus* en que el proceso es a la inversa.

Esta variación de resultados, podría deberse a aspectos fisiológicos individuales que difieren en dos tipos de bóvidos, igualmente como hay diferencia en esta especie, se puede esperar que los resultados en ovinos también difieran.

No se logró evaluar el efecto de la P4 exógena sobre el desarrollo embrionario temprano por ausencia de los mismos, debido a fallas en la fertilización. (Manes & Ungerfeld, 2015) mencionan que la fertilidad es más baja que la de una ovulación espontánea, cuando se sincroniza el celo con implantes vaginales de P4 o progestágenos, según (Robinson, 1968) hay fallas en la fertilización, causadas por la ovulación de un folículo envejecido (Johnson et al. 1996), perdida de espermatozoides en el tracto reproductivo (Hawk & Conley, 1971) o muerte de los espermatozoides en el cérvix, útero y oviducto. La inflamación y presencia de leucocitos en el epitelio vaginal afectan la viabilidad del espermatozoide perturbando la fertilidad (Manes y Ungerfeld, 2015). Los procesos inflamatorios liberan radicales libres, que ejercen efectos tóxicos sobre los espermatozoides.



(Fraczek &Kurpisz, 2007) ya que ocasiona la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, alterando su integridad, morfología y viabilidad (Salomon y Maxwell, 2000).

Además en los protocolos de superovulación se utilizó eCG, y en caso de haber fecundación pudo haber ejercido un efecto negativo sobre el embrión, causando menor desarrollo e incrementando la mortalidad (Lozano, Uribe & Osorio, 2012). Esto asociado a la larga vida media de la eCG y su efecto prolongado sobre la primera onda folicular después de la ovulación, la inducción de la presencia de grandes folículos anovulatorios y mayores concentraciones de estradiol en sangre lo que podría afectar el desarrollo embrionario (Menchaca, 2009).

Sin embargo los resultados de las otras variables indican que debería existir efecto positivo sobre el embrión, pues al incrementar los niveles de P4 en metaestro sin afectar el tamaño y función del CL, la P4 tendrá efecto positivo en el embrión. En el mismo sentido, y no habiendo correlación importante entre los niveles de P4 en metaestro y el tamaño y función del CL, habrá un mejor ambiente uterino y un mejor desarrollo embrionario, secreción temprana de interferón TAO concluyendo en un adelantamiento en el reconocimiento de la preñez.

Starbuck *et al.* (2001) concluyen que hay una relación lineal entre la P4 y la tasa de supervivencia de embriones en el día 5.Tovío *et al.* (2008) afirman que la P4 actúa en el útero estimulando y manteniendo las funciones necesarias para el desarrollo embrionario.



6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- El efecto de la P4 exógena aplicada en los primeros días del metaestro no influye sobre el tamaño y función del cuerpo lúteo, pero incrementa significativamente los niveles de P4 circulantes en el metaestro temprano. No se logró evaluar el efecto de la P4 exógena sobre el desarrollo embrionario temprano por falta de fertilización.
- La aplicación de 6mg de P4 exógena medida 6h después de su aplicación en los días 2 al 4 (T2) posteriores al servicio incrementó significativamente los niveles de P4 en el metaestro, en relación al tratamiento control. En cambio, cuando se aplicó en los días 3 a 5 (T3), aunque hubo aumento numérico con respecto al control, esta diferencia no fue significativa.
- La Correlación entre P4 en metaestro, función y tamaño del CL manifiesta que estas variables tienen comportamientos independientes, es decir que el tamaño y función del CL en el día 13 son independientes de los niveles de P4 en el metaestro temprano. Sin embargo hay que considerar la dosis y el momento preciso de su aplicación para evitar efectos negativos sobre el CL.



6.2 RECOMENDACIONES

- La aplicación de P4 exógena debería iniciarse a partir del día 2, teniendo en cuenta que al iniciar en el día 3 no tuvo diferencias significativas en relación al control, y por los efectos que el T3 tuvo sobre el CL al día 13 sin haber producido cambios significativos en el proestro.
- Al no conseguir extraer embriones en el día 13 en este estudio, se deja la puerta abierta para futuras investigaciones, en las que se debería modificar algunos aspectos como la metodología de sincronización de celos y colecta de embriones.
- Considerar el uso moderado de implantes intravaginales de progestágenos por sus efectos negativos en el ambiente uterino, y el riesgo de bloquear el pico de LH lo que impedirá la ovulación, y por tanto habrá fallas en la fertilidad.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Acurero, M. 2000. FONAIP. Estrategias de suplementación en ovejas. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015, de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd66/texto/estategias.htm.
2. Arroyo, J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en Mexico. Tropical and Subtropical Agroecosystems.14: 829-845.
3. Arroyo, J.; Gallegos, J.; Villa, A.; Valencia, J. 2006. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja. INCI, 31(1).
4. Ataman, M.B.; Aköz, M.; Saribay, M.K.; Erdem, H.; Bucak, M.N. 2013. Prevention of embryonic death using different hormonal treatments in ewes. Turk J Vet Anim Sci. 37: 6-8.
5. Baril, G.; Brebion, G.; Chesne, P. 1995. Estudio FAO producción y sanidad animal. Recuperado el 20 de Diciembre del 2015 de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=slkA2pHe1ywC&oi=fnd&pg=PA1&dq=superovulaci%C3%B3n+en+ovinos&ots=BGIVBejLC&sig=oajkTHDKyGGrDJaLtQ7Fjv4NfVQ#v=onepage&q&f=false>.
6. Beck, N.F.; Peters, A.R.; Williams, S.P. 1994. The effect of GnRH agonist (buserelin) treatment on day 12 post-mating on the reproductive performance of ewes. Animal . Prod.58: 243-247.



7. Beltman, M.E.; Roche, J.F.; Lonergan, P.; Forde, N.; Crowe, M.A. 2009. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology*. 72: 986 - 992.
8. Benjamín, M.M. 1988. Manual de Patología Clínica Veterinaria. Ed.Limus, Mexico. 240p.
9. Booth, N.; McDonald, L. 1988. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Ed.ACRIBIA SA, Zaragoza-España. 615-618pp.
10. Barañao, L. 2011. Conceptos y técnicas de Biotecnología. Departamento de FBMC. Recuperado el 25 de diciembre del 2015 de. http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/biotec1/teoricos/2011_22%20Biotecnologia%20de%20la%20reproducción%20animal.pdf.
11. Burke, C.R.; Mihm, M.; Macmillan, K. L.; Roche, J. F. 1994. Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the oestrous cycle in heifers. *Animal reproduction Science*. 35: 27 - 39.
12. Cam, M.A.; Kuran, M. 2004. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Small Rum. Res.* 52: 169-172.
13. Caraty, A.; Delaleu, B.; Chesneau, D.; Fabre, C. 2002. Sequential role of E2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology*. 143: 139-145.



14. Carter, F.; Forde, N.; Duffy, P.; Wade, M.; Fair, T.; Crowe, M.A.; Evans, A.C.; Kenny, D.A.; Roche, J.F.; Lonergan, P. 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*. 20: 368 - 375.
15. Clemente, M.; de La Fuente, J.; Fair, T.; Naib, A.; Gutierrez-Adan, A.; Roche, J.F.; Rizos, D.; Lonergan, P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium. *The journal of the society for reproduction and fertility*. 138: 507 - 517.
16. Conde, M. 2014. Respuesta ovarica y embrionaria en ovejas Pelibuey superovuladas con FSH y FSH:LH durante la época reproductiva. Recuperado el 14 de Diciembre del 2015 de [file:///C:/Users/casa/Downloads/Conde_Hinojosa_MP_MC_Ganaderia_2014%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/casa/Downloads/Conde_Hinojosa_MP_MC_Ganaderia_2014%20(1).pdf).
17. Córdova, A.; Córdova, M.; Córdova, C.; Guerra, J. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. Recuperado el 15 de Diciembre del 2015 de Sitio Argentino de Producción Animal. http://produccionbovina.com/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/20-Cordova-Procedimientos.pdf.



18. Cullinan-Bove, K.; Koos, R. 1993. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: Rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*. 133: 829 - 837.
19. Dadarwal, D.; Mapletoft, R.; Adams, G.; Pfeifer, L.; Creelman, C.; Singh, J. 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility. *Theriogenology*. 79: 859-866.
20. D'Enjoy, D.; Cabrera, C.; Vivas, I.; Díaz, T. 2012. Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in Brahman Cows. *Rev. Fac. Cs. Vets.* 53:39-47.
21. Diskin, M.; Morris, D. 2008. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod Dom Anim*. 43: 260 - 267.
22. Duran Ramirez, F. 2008. Manual de explotacion y reproducción de ovejas y borregos. Ed. Grupo Latino Editores, Bogota.245-256pp.
23. Forde, N.; Carter, F.; Fair, T., Crowe, M.A.; Evans, A.C.; Spencer, T.E.; Bazer, F.W.; McBride, R.; Boland, M.P.; O'Gaora, P.; Lonergan, P.; Roche, J.F. 2009. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. *Biology of reproduction*. 81: 784 - 794.
24. Fraczek, M.; Kurpisz, M. 2007. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl*. v.28, p.325-333.



25. Fraser, P.; Stamp, R. 1978. Ganado Reproducción y Enfermedades.Ed. Mundi Prensa,España. 102:104pp.
26. Galina, C.; Valencia, J. 2009. Reproduccion de animales domésticos.Ed. LIMUSA S.A, Mexico. 23-30pp.
27. Galora, A. 2006. Sincronización del celo con el método OV-SYNCH e inseminación artificial con semen diluido en ovejas criollas en la unidad ovina-caprina de las FCP. Recuperado el 8 de Julio del 2016 de <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1780/1/17T0763.pdf>.
28. Garrett, J.E.; Geisert, R.D.; Zavy, M.T.; Morgan,C.L. 1988.Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod.Fert.* 84:437-446.
29. Gibbons, A.; Cueto, M. 2013. Manual de tranferencia de embriones en ovinos y caprinos. Recuperado el 14 de de Diciembre del 2015 de INTA. http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/28-MANUAL.pdf.
30. Ginther, O.J. 1970. Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *American Journal of Veterinary Research.* 493-496.
31. Gonella, A. D.; Grajales, L.; Hernández, V. 2010. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ Córdoba.* 15: 1976-1984.



32. Góngora, A.; Grajales, H.; Hernández, A. 2002. Aspectos morfologicos y endócrinos durante la implantación embrionaria en rumiantes. Rev Med Vet Zoot. 49: 3 -12.
33. Gonzalez-Bulnes, A.; Santiago-Moreno, J.; Cocero, M.; Lopez, A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. Theriogenology. 54:1055-1064.
34. Harvey, M.B.; Leco, K.J.; Arcellana-Panlilio, M.Y.; Zhang, X.; Edwards, D.R.; Schultz, G.A. Roles of growth factors during peri-implantation development. Hum Reprod. 10: 712 - 718.
35. Hawk, H.; Conley, H. 1971. Loss of spermatozoa from the reproductive tract of the ewe and intensification of sperm 'breakage' by progestagen. Reprod Fert 27: 339 – 347.
36. Hawk, H.; Cooper, B.; Pursel, V. 1981. Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. Anim Sci. 3: 601-10.
37. Hernández, L.; Zarco, A. 1998. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. Portal de revistas científicas de la UNAM. Recuperado el 15 de Julio del 2015 de. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol8/CVv8c1.pdf>.



38. Hernández, J.; Morales, J. 2001. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. Redalyc. org. 32: 279-287.
39. Jiménez, C. 2009. Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos. Rev. Med. Vet. Zoot. 56: 195-214.
40. Johnson, S.; Dailey, R.; Inskeep, E.; Lewis, P. 1996. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. Domestic Animal Endocrinology. 1: 69 -79.
41. Kastelic, J.P.; Bergfelt, D.R.; Ginther, O.J. 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. Theriogenology. 33: 1269-1278.
42. Kayser, J.P.; Kim, J.G.; Cerny, R.L.; Vallet, J.L. 2006. Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy. Reproduction. 132: 379 - 388.
43. Kleemann, D.O.; Walker, S.K. 2005. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. Theriogenology. 63: 2075-2088.
44. Lindsay, D. 1991. Reproduction in the Sheep and Goat. Reproduction in Domestic Animals. 3: 491-515.
45. López, S.; Moreno, S.; de Bulnes, G.; López, M. 1993. Some aspects of the reproductive physiology of the ewes. FCV-LUZ. 2: 123-133.



46. Lozano, J.; Uribe, L.; Osorio, J. 2012. Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas (Ovisaries). Veterinaria y Zootecnia ISSN. 6: 134-147.
47. Macmillan, K.L.; Peterson, A.J. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. Animal reproduction Science.33: 1-25.
48. Malpaux, B.; Tricoire, H.; Mailliet, F.; Daveau , A.; Migaud, M.; Skinner, D. 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. Reprod. Suppl. 59: 167 - 179.
49. Malpaux, B.; Thiery, J.C.; Chemineau, P. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. Reprod. Nutr. 39: 355-366.
50. Mamani, E.; Alencastre, R.; Deza, H.; Perez, U.; Perez, M. 2012. Effect of eCG dose and food supplementation on ovarian response and embryo production in creole sheep. Recuperado el 14 de Diciembre del 2015 de. Asociacion Peruana de Reproduccion Animal. <http://www.reproducionanimal.org/site3/files/revistas/spermova2/51-52-mamani-ovejas.pdf>
51. Manazza, J. 2006. Condición corporal en ovinos. Recuperado el 13 de Julio del 2015 de: <http://cedivechascomus.com.ar/wp->



content/uploads/2013/04/ovinos-condicion-corporal-en-ovinos.pdf el 10 de Julio del 2016.

52. Manes, J.; Ungerfeld, R. 2015. Estrous synchronization with intravaginal devices in sheep and goats: alterations in vaginal environment and its' relation with fertility. Rev Bras Reprod Anim. 39: 104-108.
53. Mann, G.E.; Lamming, G.E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility. 121: 175-180.
54. Mann, G.E. 2009. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. Anim Reprod Sci. 115: 296-299.
55. Mediavilla, M.D. 1994. Cronobiología de Ciclos reproductores de la oveja. Patrones secretorios de las hormonas que intervienen en el ciclo estral de la oveja. Ed Caja Cantabria, Cantabria. 90-91pp.
56. Menchaca, A.; Vilariño, M.; Pinczak, A.; Kmaid, S.; Saldaña, J. 2009 Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and day 0 protocol for MOET programs in sheep. Theriogenolgy. 72: 477- 483.
57. Nava-Trujillo, H.; Chango-Villasmil, J.; Finol-Parra, G.; Maldonado-Suárez, J.; Torres-Rodríguez, P.; Carrillo-Fernández, F.; Gil-Huerta, L.; González, N. 2008. Efectt of post-manting progestagen administration on pregnancy rate in crossbred goats following an induced estrus. redalyc.org. 5: 578 - 581.



58. O'Hara, L.; Forde, A.; Carter, A.; Rizos, A. 2014. Paradoxical effect of supplemental progesterone between day 3 and day 7 in the corpus luteum function and embryo development in cattle. *Reproduction fertility and Development.* 26: 328 - 336.
59. Padilla, J.; Mapes, G.; Ximenez, F. 1988. Perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. *Técnica pecuaria en Mexico.* 26: 96-108.
60. Padilla, F. 2006. Crianza de ovinos en costa y sierra. Ed. Macro, Lima-Peru. 120p.
61. Palma, G.A. 2001. Biotecnología de la reproducción. Ed. Minera el Paraíso S.A, Argentina. 1- 47pp.
62. Paredes, P.; Jimenéz, C.; Hernandez, A. 2013. Corpus luteum diameter and serum progesterone level during the estrous cycle in Colombian criollo mares. *Rev.MVZ. Córdoba.*18: 3829-3835.
63. Pedersen, R.A. 1988. Early mammalian embryogenesis. Ed. Cambridge University Press, United States of America. 3-34 pp.
64. Peñaloza, P.; Romero, J. 2015. Reproducción en ovejas en la región Ecuatorial. Patente nº 1. Universidad de Cuenca-Ecuador.
65. Pesáñez, E. 2015. Relación entre el tamaño del folículo preovulatorio, diámetro del cuerpo lúteo y niveles de progesterona en el ganado bovino de la raza criolla. Cuenca, Azuay, Ecuador.



66. Pope, W.F.; Cárdenas, H.; Wiley, T.M.; McClure, K.E. 1994. Dose-response relationship of exogenous progesterone shortly after ovulation in estrous cycle length, blastocyst development and fertility in sheep. *Animal reproduction Science*. 38: 109 - 117.
67. Pope, W.F. 1988. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol.Reprod.*, 39: 999 - 1003.
68. Prieto, M.; Garcia, G.; Lateulade, I.; Villa, M. 2010. Sincronizacion de celos en ovinos con doble dosis de prostaglandina. Sitio Argentino de Producción Animal. Recuperado el 14 de Diciembre del 2015 de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/34-doble_prostaglandina.pdf.
69. Quirke, J.; Hanrahan, J.; Goslin, J. 1988. Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *Reprod.Fer.* 55: 37-44.
70. Rabbani, M.; Rogers, P. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction*. 122: 85 – 90.
71. Robinson, Mann, G.E.; Lamming, G.E, Wathes, D.C. 1999. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Society for Endocrinology*. 160: 21 - 33.



72. Robinson, T.J. 1968. The synchronization of the estrous cycle and fertility. ICAR. v2, p 1347.
73. Salomon, S.; Maxwel W. 2000. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci. 62: 77-111.
74. Sanchez, J.; Mejia, O.; Manzur, A. 2014. Programa de transferencia de tecnología en aplicación de técnicas asistidas para ovinos en el trópico. Manual de transferencia de embriones en ovino. Recuperado el 14 de Diciembre del 2015 de. http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/7/2013/anuales/anu_310-25-2014-05-2.pdf
75. Satterfield, M. C.; Bazer, F.W.; Thomas. 2006. Progesterone Regulation of Preimplantation Conceptus Growth and Galectin 15 (LGALS15) in the Ovine Uterus1. Biology reproduction. 75: 289–296.
76. Simonetti, L. 2008. Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. Animal Reroduction Science.: 227:239.
77. Spencer, T.; Burghardt, R.; Johnson, G.; Bazer, F. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Anim Reprod Sci. 83: 537-550.
78. Spencer, T.E.; Gray,C.A. 2006. Sheep uterine gland knockout (UGKO) model. Methods Mol Med. 121: 85–94.



79. Spencer, T.E.; Oliver, S.; Wolf, E. 2008. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*. 135: 165 - 169.
80. Spencer, T.; Bazer, F. 1996. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology*. 137: 1144 - 1147.
81. Starbuck, G.R.; Darwash, A.O.; Mann, G.E.; Lamming, G.E. 2001. The detection and treatment of post-insemination progesterone insufficiency in dairy cows. *Fertility in the high-producing dairy cow*. Brit Soc Anim Sci. 26: 447–500.
82. Thatcher, W.W.; Staples, C.R.; Danet-Desnoyers, G.; Oldick, B.; Schmitt, E. P. 1994. *Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle*. J . Anim.Sci.72: 16-30.
83. Tovío, N.; Duica, A.; Grajales, H. 2008. Embryonic development and hormonal antiluteolytic Strategies for embryo transfer programs in cattle. *Rev. MVZ Córdoba*.1: 1240-125.
84. Universidad de Cuenca. 2015. Portal. Recuperado el 23 Diciembre del 2015 de <http://www.ucuenca.edu.ec/la-oferta-academica/oferta-de-grado/facultad-de-ciencias-agropecuarias/granjas#irquis>.
85. Van Cleeff, J.; Macmillan, K.L.; Drots, M.; Lucy, M.; Thacher, W. 1996. Effects of administering progesterone at selected intervals after



- insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. *Theriogenology*. 46: 1117-1130.
86. Valencia, J.; Porras, A.; Mejia, O.; Berruecos, J.; Trujillo, J.; Zarco, L. 2009. Reproductive activity of pelibuey ewe during the anoestrus season: influence of the male presence. *Revista Cientifica*. 2: 136-141.
87. Vélez, M.; Hincapié, J.; Matamoros, I. 2009. Producción de ganado lechero en el tropico. Ed. Zamorano Academic Press, Tegucigalpa. 162 – 163pp.
88. Willingham, T.; Shelton, M.; Thompson, P. 1986. An assessment of reproductive wastage in sheep. *Theriogenology*. 26: 179 - 188.
89. Wilmut, I.D.; Sales, C.; Ashworth, J. 1986. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J. Reprod. Fert.* 76: 851-964.
90. Woody, C.; Ginther O. 1968. Effect of Exogenous Progesterone on Corpora Lutea in Unilaterally Hysterectomized Heifers. *Journal of animal Science*. 5:1387-1390.



8. ANEXOS

Anexo N° 1. Estudio Ecográfico.



Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Anexo N° 2. Flushing y conducción del rebaño al potrero y limpieza del establo.



Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

**Anexo N° 3.** Sincronización de celos y superovulación.

Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Anexo N° 4. Servicio con carneros.

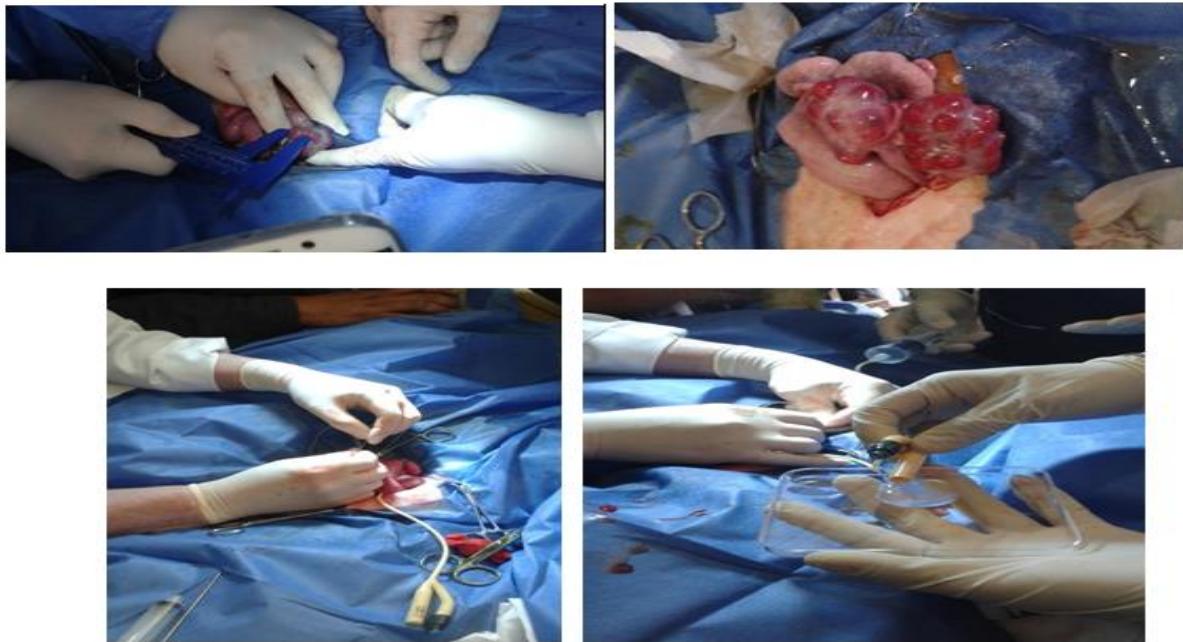
Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Anexo N° 5. Toma de muestras de sangre y procesamiento de las muestras en laboratorio de biotecnologías reproductivas.

Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)



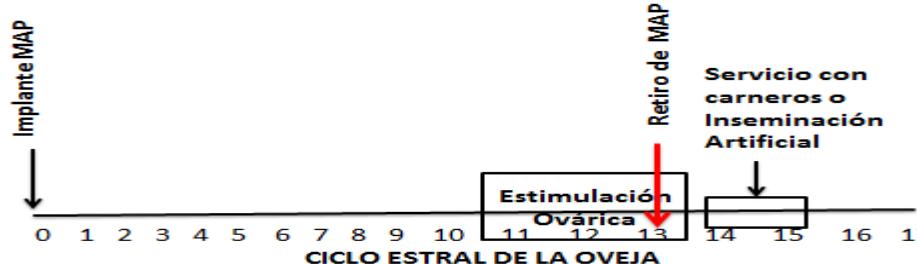
Anexo N° 6. Medición de los cuerpos lúteos y lavado de embriones.



Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Anexo N° 7. Protocolos de Superovulación

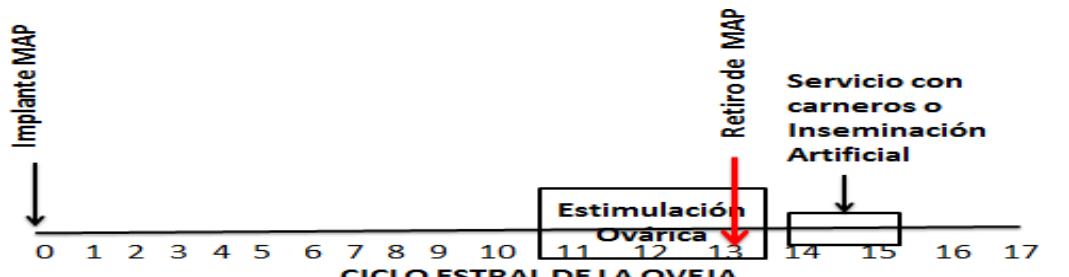
Protocolos de Superovulación con FSH



(Peñaloza & Romero, 2015).



Protocolo de superovulación con eCG



(Peñaloza & Romero, 2015).

Anexo N° 8. Resumen del Diseño Experimental

Diseño de bloques al azar (DBA)

Bloque 1			Bloque 2			Bloque 3			Bloque 4			Bloque 5			Bloque 6			Bloque 7		
T	N	P	T	N	P	T	N	P	T	N	P	T	N	P	T	N	P	T	N	P
T1	509	41	T3	508	36	T2	103	28	T1	513	33	T3	502	39	T2	25	45	T1	504	60
T3	515	41	T2	501	37	T1	512	33	T3	229	36	T2	231	38	T1	500	49	T3	227	54
T2	507	41	T1	510	37	T3	503	32	T2	506	35	T1	12	40	T3	206	42	T2	505	56

Anexo N° 9. Porcentaje de respuesta ovulatoria de las ovejas en estudio

Descripción	N	% ovejas que respondieron a la ovulación	Nro. de CL	Ta. de CL
			X±DE	X±DE
Tratamientos				
Tratamiento 1 (control)	7/7	100	5,85±5,04	1,02±0,3
Tratamiento 2 (2,3,4 días)	6/7	85,7	9,5±4,96	0,85±0,26
Tratamiento 3 (3,4,5 días)	5/7	71,4	6,20±3,27	0,96±0,17
Sin respuesta	3/21	14,3		
Previo al análisis de las variables se realizó un estudio del porcentaje de las ovejas que respondieron a la ovulación, teniendo un 14,3 % de animales sin respuesta ovulatoria por lo tanto fueron excluidas del estudio.				

**Anexo N° 10.** Prueba de normalidad.

Variables	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.
Edad	0,86	4	0,27
Condición corporal	0,72	4	0,02
Peso	0,89	4	0,42
Numero de cuerpos lúteos	0,84	4	0,22
Tamaño del cuerpo lúteo	0,95	4	0,72
Nivel de progesterona del metaestro (día 2)	0,80	4	0,11
Nivel de progesterona del metaestro (día 3)	0,90	4	0,44
Nivel de progesterona del metaestro (día 4)	0,91	4	0,50
Nivel de progesterona del metaestro (día 5)	0,86	4	0,27
Función del cuerpo lúteo (día 13)	0,82	4	0,16

Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Anexo N° 11. ANOVA de las variables.

ANOVA		
Variables	Sig.	
Niveles de P4 en metaestro.	0,003	
Tamaño del CL	0,52	
Tamaño total de la masa en cm del CL T1 –T2	0,48	
Tamaño total de la masa en cm del CL T1 – T3	0,97	
Función del CL	0,68	
Promedio de P4 en metaestro por días	T1 y T2 en día 2	
	0,05	
	T1 y T2 en día 3	
	0,00	
	T1 y T2 en día 4	
	0,01	
Promedio de P4 en metaestro por días	T1 y T3 en día 3	
	0,49	
	T1 y T3 en día 4	
Promedio de P4 en metaestro por días	0,43	
	T1 y T3 en día 5	
	0,76	

Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Informe de las medias de P4 en sangre en metaestro.

Niveles de Progesterona en sangre			
TRATAMIENTOS	Media	N	D. estandar
1	8,188	16	7,9349
2	21,000	9	6,9462
3	13,667	12	9,1585
Total	13,081	37	9,4351



Prueba Tukey

PROGESTERONA EN METAESTRO				
	TTO	N	Subconjunto	
			1	2
HSD Tukey ^{a,b,c}	1	16	8,188	
	3	12	13,667	13,667
	2	9		21,000
	Sig.		0,249	0,090
Duncan ^{a,b,c}	1	16	8,188	
	3	12	13,667	
	2	9		21,000
	Sig.		0,113	1,000

Pruebas de Post hoc para Niveles de P4 en metaestro.

Comparaciones múltiples							
HSD Tukey	(I) T	(J) comp. entre T	Dif. de X (I-J)	E.E	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	1	2	-12,81	3,39	0,00	-21,12	-4,50
		3	-5,47	3,10	0,19	-13,09	2,13
	2	1	12,81	3,39	0,00	4,50	21,12
		3	7,33	3,58	0,11	-1,46	16,12
	3	1	5,47	3,10	0,19	-2,13	13,09
		2	-7,33	3,58	0,11	-16,12	1,46

Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015)

Anexo N° 12. Correlaciones de Pearson entre variables.

<u>Correlación</u>		T1			T2			T3		
Variables		Función del CL.			Función del CL.			Función del CL.		
		Corr.	Sig.	Reg.	Corr.	Sig.	Reg.	Corr.	Sig.	Reg.
Niveles de P4 en el metaestro		0,68	0,31		-0,87	0,32		0,97	0,02	0,95
Tamaño del CL		0,29	0,52		0,72	0,10		0,89*	0,04	0,79
Tamaño total de la masa del CL		0,59	0,15		0,68	0,13		0,92	0,02	0,85
		Niveles P4 en el metaestro			Niveles P4 en el metaestro			Niveles P4 en el metaestro		
Tamaño de la masa del total de CL.		0.73	0,26		-0.29	0,80		0.93	0,07	

Fuente: (Peñaloza & Romero, 2015).